



UNIVERSITAS PANCASILA
PROGRAM MAGISTER ILMU KEFARMASIAN

TESIS

**PENGHAMBATAN ENZIM ASETILKOLINESTERASE DARI EKSTRAK
HERBA PEGAGAN (*Centella asiatica* Linn.) DAN EKSTRAK DAUN
KELOR (*Moringa oleifera* Lam.) SERTA KOMBINASINYA.**

Oleh:

YONATHAN TRI ATMODJO REUBUN

NPM: 5418220047

**Disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Farmasi pada Universitas Pancasila**

JAKARTA

2020

PERNYATAAN TESIS DAN SUMBER INFORMASI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa tesis dengan judul “Penghambatan Enzim Asetilkolinesterase dari Ekstrak Herba Pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) Serta Kombinasinya” adalah karya saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar akademik, baik di Universitas Pancasila maupun di Perguruan Tinggi lain. Informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah dicantumkan dalam daftar rujukan yang dituliskan dalam tesis ini.

Jakarta, 24 Agustus 2020

Materai 6000

Yonathan Tri Atmodjo Reubun

NPM: 5418220047

UNIVERSITAS PANCASILA
PROGRAM MAGISTER ILMU KEFARMASIAN

PERSETUJUAN TESIS
MAGISTER FARMASI
PEMINATAN: OBAT BAHAN ALAM

NAMA : YONATHAN TRI ATMODJO REUBUN

NPM : 5418220047

**JUDUL TESIS : PENGHAMBATAN ENZIM ASETILKOLIN
ESTERASE DARI EKSTRAK HERBA PEGAGAN
(*Centella asiatica* Linn.) DAN EKSTRAK DAUN
KELOR (*Moringa oleifera* Lam.) SERTA
KOMBINASINYA**

DISETUJUI OLEH

Pembimbing

(Prof. Dr. apt. Shirley Kumala., M.Biomed.)

Pembimbing

(Siswa Setyahadi., M.Sc., Ph.D)

UNIVERSITAS PANCASILA
PROGRAM MAGISTER ILMU KEFARMASIAN

PENGESAHAN TESIS
MAGISTER FARMASI
PEMINATAN: OBAT BAHAN ALAM

PENGHAMBATAN ENZIM ASETILKOLINESTERASE DARI EKSTRAK
HERBA PEGAGAN (*Centella asiatica* Linn.) DAN EKSTRAK DAUN
KELOR (*Moringa oleifera* Lam.) SERTA KOMBINASINYA

Oleh:

YONATHAN TRI ATMODJO REUBUN
NPM: 5418220047

Dipertahankan dihadapan Penguji Tesis
Program Magister Ilmu Kefarmasian Universitas Pancasila
Pada Tanggal 24 Agustus 2020

Mengesahkan,
Ketua Program Magister Ilmu Kefarmasian

Dr. apt. Ratna Djamil, M.Si.

Penguji Tesis:

- | | |
|---|---------|
| 1. Dr. apt. Dian Ratih Laksmiawati, M.Biomed. | 1. |
| 2. Dra. apt. Anny Victor Purba, M.Sc.,Ph.D | 2. |
| 3. Dr. rer. nat. apt. Chaidir, M.Sc. | 3. |
| 4. Prof. Dr. apt. Shirly Kumala., M.Biomed. | 4. |
| 5. Siswa Setyahadi.,M.Sc., Ph.D | 5. |

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis Magister Farmasi tidak dipublikasikan, namun terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Universitas Pancasila Jakarta dan terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada pengarang. Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin pengarang dan harus disertai dengan kebiasaan ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh isi tesis haruslah seizin Direktur Program Pascasarjana Universitas Pancasila.

Perpustakaan yang meminjamkan tesis ini untuk keperluan anggotanya harus mengisi nama dan tanda tangan peminjam dan tanggal peminjaman.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur dipanjatkan ke hadirat Tuhan Yesus Kristus yang telah memberikan segala limpahan kasih sayang, dan berkat-Nya sehingga penyusunan tesis dengan judul **“Penghambatan Enzim Asetilkolinesterase dari Ekstrak Herba Pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) Serta Kombinasinya”** dapat diselesaikan dengan baik.

Terima kasih kepada Ibu Prof. Dr. apt. Shirley Kumala, M. Biomed. dan Bapak Siswa Setyahadi, M.Sc., Ph.D. selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu dan perhatian dalam membimbing sampai penyelesaian tesis ini. Tidak lupa penulis ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Ibu Prof. Dr. apt. Shirley Kumala, M. Biomed.
2. Kepala Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian Ibu Dr. apt. Ratna Djamil, M.Si.
3. Seluruh Dosen dan staf karyawan Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian Universitas Pancasila yang membantu dalam urusan kampus dan tesis selama ini.
4. Alm. Ayah, Ibu yang tercinta, Patrick Widiyanto Reubun, dan Monika Agustin Lilian Colina atas doa dan semangat yang tak terhingga hingga dapat menyelesaikan tesis ini.
5. Teman-teman Magister Farmasi Universitas Pancasila angkatan 32.
6. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Cibinong, Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi, dan SMK Caraka Nusantara.

Penulis berharap semoga tesis ini dapat memberikan manfaat sebesar-besarnya bagi penulis, perkembangan kefarmasian di institusi dan seluruh pembaca.

Jakarta, Agustus 2020

Penulis

DAFTAR ISI

COVER	i
PERNYATAAN TESIS DAN SUMBER INFORMASI	ii
HALAMAN PERSETUJUAN TESIS	iii
HALAMAN PENGESAHAN TESIS	iv
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. PERUMUSAN MASALAH	2
C. PERTANYAAN PENELITIAN	3
D. TUJUAN PENELITIAN	3
E. RUANG LINGKUP PENELITIAN	4
F. MANFAAT PENELITIAN	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. TINJAUAN PUSTAKA	5
1. Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	5
2. Kelor (<i>Moringa oleifera</i>)	10

3. Penyakit Alzheimer	15
4. Pengujian penghambatan AChE dengan metode Ellman	21
B. KERANGKA / LANDASAN TEORI	22
C. HIPOTESIS	22
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	24
A. METODE YANG DIGUNAKAN	24
B. KERANGKA KONSEP	24
C. DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL	25
D. JENIS PENELITIAN YANG DIGUNAKAN	25
E. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN	25
F. INSTRUMEN PENELITIAN	26
G. RANCANGAN ANALISIS DATA	26
BAB IV. BAHAN, ALAT, DAN PROSEDUR PENELITIAN	27
A. BAHAN DAN ALAT YANG DIGUNAKAN	27
1. Bahan	27
2. Alat	27
B. PROSEDUR PENELITIAN	27
1. Determinasi Tumbuhan	27
2. Pengumpulan dan Penyediaan Bahan Penelitian	27
3. Pembuatan Ekstrak	28
4. Penapisan Fitokimia	28
5. Pengujian Mutu Ekstrak	30
6. Pengujian aktifitas penghambatan asetilkolinesteras.....	33
C. CARA PENGOLAHAN DAN ANALISIS DATA	34
1. Analisis Uji Aktivitas Penghambatan Asetilkolinesterase....	34
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
A. DETERMINASI TANAMAN	36
B. PEMBUATAN EKSTRAK	36
C. PENAPISAN FITOKIMIA	37
D. PENGUJIAN MUTU EKSTRAK	38

E. PENGUJIAN AKTIVITAS PENGHAMBATAN AChE OLEH EKSTRAK HERBA PEGAGAN, EKSTRAK DAUN KELOR, DAN KOMBINASI	43
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	45
A. KESIMPULAN	45
B. SARAN	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	50

DAFTAR TABEL

Tabel II.1.	Klasifikasi herba pegagan	6
Tabel II.2.	Komposisi Kimia Tumbuhan Pegagan	8
Tabel II.3.	Klasifikasi daun kelor	11
Tabel II.4.	Kandungan tanaman kelor tiap 100g	13
Tabel V.1.	Hasil ekstrak herba <i>Centella asiatica</i>	36
Tabel V.2.	Hasil ekstrak daun <i>Moringa oleifera</i>	37
Tabel V.3.	Hasil Penapisan Fitokimia	37
Tabel V.4.	Hasil pengujian mutu ekstrak etanol 96% herba pegagan..	38
Tabel V.5.	Hasil pengujian cemaran logam berat ekstrak pegagan	39
Tabel V.6.	Hasil pengujian mutu ekstrak etanol 96% daun kelor	41
Tabel V.7.	Hasil pengujian cemaran logam berat ekstrak daun kelor .	41
Tabel V.8.	Hasil pengujian aktivitas penghambatan AChE	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1.	Gambar tumbuhan pegagan	6
Gambar II.2.	Struktur Asiatikosida	9
Gambar II.3.	Daun Kelor	11
Gambar II.4.	Perbandingan Nutrisi daun kelor segar dan daun kelor kering dengan beberapa sumber energi lain	12
Gambar II.5.	Khasiat dari penggunaan obat tradisional daun kelor ...	14
Gambar V.1.	Hasil Pengujian Angka Kapang Khamir ekstrak herba pegagan (<i>Centella asiatica</i> Linn.)	40
Gambar V.2.	Hasil pengujian anka kapang khamir ekstrak daun kelor (<i>Moringa oleifera</i> Lam.)	43

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1	SKEMA PENELITIAN	50
LAMPIRAN 2	DETERMINASI HERBA PEGAGAN	51
LAMPIRAN 3	DETERMINASI DAUN KELOR	52
LAMPIRAN 4	CERTIFICATE OF ANALYSIS ETHANOL 96%	53
LAMPIRAN 5	HASIL ANALISIS SIMPLISIA DAUN KELOR	54
LAMPIRAN 6	HASIL PENGUJIAN EKSTRAK HERBA PEGAGAN	58
LAMPIRAN 7	HASIL PENGUJIAN EKSTRAK DAUN KELOR	66
LAMPIRAN 8	HASIL PENGUJIAN PENGHAMBATAN AChE	74
LAMPIRAN 9	HASIL REGRESI LINIER PENGHAMBATAN AChE	76

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	Nama Diri / Kepanjangan	Pemakaian pertama kali pada halaman
AD	<i>Alzheimer Disease</i> , Penyakit Alzheimer	xiv
AChE	Asetilkolinesterase	xiv
ACh	Asetilkolin	xiv
ATCh	Asetiltiokolin	xiv
DTNB	5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	xiv
IC ₅₀	Inhibitor Concentration 50%	xiv
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i>	12
ChE-I	Penghambat kolinesterase	18
USFDA	United States Food and Drug Administration	19
CNS	Central Nervous System, Sistem saraf pusat	20
PTFM	Pusat Teknologi Farmasi dan Medika	25
BPPT	Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi	25
ATCI	Asetilkolin Iodida	25
CHCL ₃	Chloroform	31
TLC	Thin Layer Chromatography	31
AlCl ₃	Alumunium Chloride,	31
HNO ₃	Nitric Acid, Asam Nitrat	32
HClO ₄	Perchloric Acid, Asam Perklorida	32
PDA	Potato Dextrose Agar	33

**PENGHAMBATAN ENZIM ASETILKOLINESTERASE DARI EKSTRAK
HERBA PEGAGAN (*Centella asiatica* Linn.) DAN EKSTRAK DAUN
KELOR (*Moringa oleifera* Lam.) SERTA KOMBINASINYA**

ABSTRAK

Penyakit Alzheimer (*Alzheimer Disease*, AD) adalah suatu penyakit dimana terjadinya kerusakan otak yang ditandai dengan penurunan dari perhatian, memori, dan kepribadian. Perubahan kepribadian sering muncul ketika penderita menjadi kurang spontan, lebih apatis, dan menarik diri. 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* Linn., ekstrak *Moringa oleifera* Lam. atau kombinasinya. Uji aktivitas penghambatan AChE dilakukan berdasarkan metode Ellman dimana pada metode ini didasarkan pada hidrolisis reaksi substrat ATCh oleh AChE dengan 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) yang dimana memberikan warna kuning dan diukur serapannya pada panjang gelombang 400 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. Sehingga dikatakan bahwa kombinasi ekstrak *Centella asiatica* Linn. dan ekstrak *Moringa oleifera* Lam. mempunyai efektivitas terhadap pengobatan AD.

Kata kunci: Alzheimer, asetilkolinesterase, *Centella asiatica*, *Moringa oleifera*.

**INHIBITION OF ACETYLCHOLINESTERASE ENZYME FROM
PEGAGAN EXTRACT (*Centella asiatica* Linn.), KELOR LEAF EXTRACT
(*Moringa oleifera* Lam.) AND BOTH OF COMBINATION.**

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a brain damage that decreases in attention, memory, and personality. Personality changes occur when the sufferer becomes less spontaneous, more apathetic, and withdrawn. In this case, the breakdown of acetylcholine into inactive forms (acetate and choline) by acetylcholinesterase. Measurement of AChE enzyme activity can describe the accumulation of ACh in the body, which is shown that in patients with AD. AChE activity is needed for preventing AD. The study aimed was to see the activity in the treatment of AD through AChE inhibition by *Centella asiatica* extract, *Moringa oleifera* extract, or a combination thereof. The AChE inhibitory activity test was carried out based on the Ellman method. This method is based on the hydrolysis of the ATCh substrate reaction by AChE with 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), which gives a yellow color, and its absorption is observed at a wavelength of 400 nm. The AChE inhibition showed that the combination of *Centella asiatica* extract and *Moringa oleifera* leaf extract with ratio 1:1 gave the best inhibition with 217.588 ppm of IC₅₀. Meanwhile, Eserin as a positive control with 5.010 ppm of IC₅₀. Thus, the combination of *Centella asiatica* extract and *Moringa oleifera* extract has effectiveness against AD treatment, although it is not as good as the positive control.

Keywords: Alzheimer's disease, Acetylcholinesterase, *Centella asiatica*, *Moringa oleifera*.

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Penyakit Alzheimer adalah suatu gangguan penyakit neurodegeneratif yang bersifat ireversibel dimana pada penyakit ini terjadi pada kelompok usia yang lebih tua dari populasi di seluruh dunia. Dengan meningkatnya angka harapan hidup secara global dan peningkatan populasi manusia lanjut usia, maka penyakit alzheimer ini menjadi masalah dari kesehatan secara global. Penyakit alzheimer secara klinis ditandai dengan penurunan progresif dalam fungsi kognitif seperti kehilangan memori dan kemampuan belajar, dan secara patologis dengan adanya neurofibrillary tangles (NFTs), pengendapan plak beta amiloid ($A\beta$) dan disfungsi sinaptik di otak.¹

Asetilkolin (ACh) adalah salah satu neurotransmitter paling berperan di dalam tubuh dan neurotransmitter utama di otak yang bertanggung jawab untuk transmisi kolinergik. Enzim asetilkolinesterase (AChE) berperan penting dalam hidrolisis neurotransmitter asetilkolin. Asetilkolinesterase yang tersimpan dalam sel saraf inilah yang mengakibatkan timbulnya plak amiloid yang pada akhirnya timbulah penyakit Alzheimer.²

Pada hasil penelitian Jeon tahun 2019 tentang obat kimia untuk penyakit alzheimer seperti donepezil, galantamin dan rivastigmin pada tahap uji praklinis atau klinis masih menunjukkan bahwa obat ini hanya berpotensi untuk menghambat dari inhibisi asetilkolinesterase.³ Berdasarkan kurangnya modifikasi obat untuk penyakit alzheimer, obat tradisional seperti produk herbal telah digunakan untuk meningkatkan pengobatan gejala dan proses patologi dari penyakit alzheimer. Obat tradisional seperti herba pegagan dan daun kelor yang juga terdapat di negara asia timur telah lama digunakan dan diharapkan dapat mengatasi gejala dari alzheimer.⁴

Herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.), adalah tanaman yang berasal dari keluarga Apiaceae (Umbelliferae), tanaman ini telah digunakan oleh ahli pengobatan tradisional di Asia selama lebih dari 2000 tahun.² Sejumlah fungsi pengobatan telah ditemukan di *Centella asiatica* Linn., baik di seluruh bagiannya seperti antioksidan, mempermudah penyembuhan luka, meningkatkan daya ingat, menurunkan inflamasi, dan meningkatkan aktivitas kognitif.⁵ Komponen aktif utama dari ekstrak *Centella asiatica* Linn. adalah triterpenoid, termasuk asam asiatik dan asiatikosida.² Pengujian ekstrak herba pegagan pada penelitian lain didapatkan kandungan asiatikosida pada *Centella asiatica* Linn. sebesar 9,3718 mg/g dengan nilai konsentrasi penghambatan enzim asetilkolinesterase yaitu sebesar 5,4054 %.⁶ Selain itu, penggunaan ekstrak etanol herba pegagan didapatkan bahwa nilai konsentrasi penghambatan terhadap enzim asetilkolinesterase adalah 481,5 ppm, 763,5 ppm, dan diatas 1.000 ppm.³¹

Daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.), adalah salah satu tanaman yang berasal dari keluarga Moringaceae dan diyakini berasal dari anak India tetapi saat ini sudah tersebar luas di banyak negara Afrika dan Asia. Senyawa bioaktif tersebut antara lain vitamin, karotenoid, polifenol, asam fenolat, flavonoid, alkaloid, glukosinolat, isotiosianat, tannin dan saponin. Sehingga berpotensi sebagai antimikroba, antihiperkolesterolemia, antitumor, antidiabetes, peningkatan memori otak, anti inflamasi, dan antioksidan.⁷ Penggunaan ekstrak etanol daun kelor pada penelitian lain didapatkan nilai penghambatan IC₅₀ terhadap enzim asetilkolinesterase adalah 0,2105 ppm.³²

Adanya pengujian dari ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) baik secara tunggal maupun kombinasi diharapkan mempunyai konsentrasi penghambatan yang terbaik terhadap enzim asetilkolinesterase dibandingkan dengan kontrol positif yang digunakan yaitu *eserin*.

B. PERUMUSAN MASALAH

1. Ekstrak herba pegagan, ekstrak daun kelor, dan kombinasinya mempunyai efektivitas terhadap enzim asetilkolinesterase terhadap penyakit alzheimer.
2. Kombinasi ekstrak herba pegagan dan ekstrak daun kelor mempunyai efek yang sinergis atau antagonis terhadap penyakit alzheimer.
3. Kombinasi ekstrak herba pegagan dan ekstrak daun kelor mempunyai efektivitas terhadap penggunaan kontrol positif seperti *eserin* pada penyakit alzheimer.

C. PERTANYAAN PENELITIAN

1. Apakah kombinasi ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) akan meningkatkan aktivitas penghambatan asetilkolinesterase dan bersinergis?
2. Berapakah kombinasi ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) yang terbaik pada pengobatan penyakit alzheimer?
3. Apakah kombinasi ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) mempunyai efektivitas terhadap penggunaan kontrol positif seperti *eserin* pada penyakit alzheimer?

D. TUJUAN PENELITIAN

1. Tujuan Umum.
Mengetahui dan menggunakan kombinasi ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) sebagai bahan yang berperan dalam penyakit Alzheimer.
2. Tujuan Khusus
 - a. Memperoleh identitas (spesies dan varietas) melalui determinasi tanaman yang digunakan untuk membuat ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) sebagai peningkatan aktivitas penghambatan asetilkolinesterase.

- b. Memperoleh identitas fisika kimia dari kombinasi ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) sebagai pengobatan pada penyakit alzheimer.
- c. Mengetahui kombinasi ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) terhadap kontrol positif yaitu *eserin* apakah lebih baik terhadap penyakit alzheimer.

E. RUANG LINGKUP PENELITIAN

Penelitian ini meliputi pengujian ekstrak masing-masing tanaman yaitu ekstrak pegagan, ekstrak daun kelor dan kombinasinya dengan kontrol positifnya yaitu *eserin* dengan metode secara *in vitro* dimana menggunakan enzim asetilkolinesterase dengan jangka waktu penelitian satu tahun. Simplisia daun kelor diperoleh dari perkebunan Moringa Organik Indonesia, Blora, Jawa Tengah. Simplisia pegagan diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional di Tawangmangu, Jawa Tengah.

F. MANFAAT PENELITIAN

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang penggunaan ekstrak pegagan, ekstrak daun kelor, dan kombinasinya terhadap penyakit alzheimer.
2. Penelitian ini diharapkan dapat diteruskan untuk pengembangan ilmu dalam penelitian kedepannya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. TINJAUAN PUSTAKA

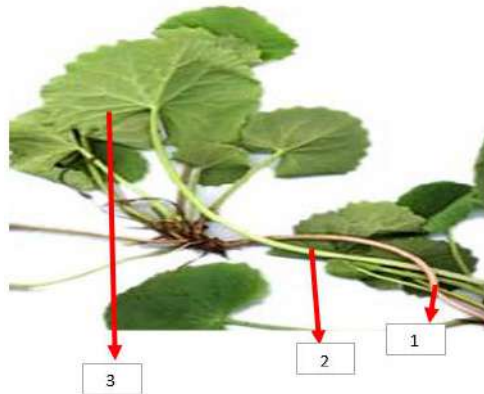
1. Pegagan (*Centella asiatica* Linn.)

Herba Pegagan (*Centella asiatica* Linn.) merupakan tanaman liar yang biasanya dapat tumbuh di perkebunan, ladang, tepi jalan, pematangan sawah ataupun di ladang yang basah. Pegagan merupakan suatu tumbuhan yang merayap menutupi tanah, tidak mempunyai batang, tinggi tanaman ini adalah 10 sampai 50 cm. Pegagan memiliki daun satu helaian dimana tersusun dalam roset akar dan terdiri dari 2 sampai 10 helai daun. Daun berwarna hijau dan berbentuk kipas, buahnya berbentuk seperti ginjal. Pegagan juga ada yang memiliki daun dimana permukaan dan bagian punggungnya licin, tepi daun agak melengkung ke atas, bergerigi, dan berambut, tulang daun yang berpusat di pangkal dan menyebar ke ujung serta memiliki diameter 1 sampai 7 cm.⁸

Pegagan memiliki tangkai daun yang berbentuk pelepah, agak memanjang dan berukuran 5 – 15 cm. Pada tangkai daun pegagan dipangkalnya terdapat daun sisik yang sangat pendek, licin, tidak berbulu, berpadu dengan tangkai daun. Pegagan memiliki bunga yang berwarna putih atau merah muda dimana tersusun dalam karangan yang berbentuk payung. Buah pegagan berbentuk lonjong atau pipih, berbau harum dan rasanya pahit, buah ini memiliki panjang 2 – 2,5 mm. Buah pegagan berdinding agak tebal. Kulitnya keras, berlekuk dua, berusuk jelas, dan berwarna kuning.⁸

Pegagan merupakan tumbuhan berbiji tertutup dan berkeping dua. Merupakan tanaman herba yang berpotensi dalam hal farmakologinya. Pegagan memiliki akar rimpang yang pendek serta mempunyai geragih, akar keluar dari buku dan berupa akar tunggang yang berwarna putih. Stolon tumbuh dari sistem perakaran, memiliki ukuran yang panjang dan

tumbuh menjalar. Pada setiap buku dari stolon akan tumbuh tunas yang akan menjadi cikal bakal tumbuhan pegagan yang baru.⁸



Gambar II.1. Gambar tumbuhan pegagan. 1) Herba pegagan dengan susunan daun dalam roset akar. 2) tangkai daun. 3) Susunan tulang daun.⁸

a. Klasifikasi Pegagan

Berdasarkan pemaparan tentang daun pegagan maka klasifikasi dari pegagan adalah sebagai berikut:

Tabel II.1. Klasifikasi herba pegagan	
Kingdom	Plantae
Division	Spermatophyta
Sub-division	Angiospermae
Klass	Dicotyledone
Ordo	Umbilales
Family	Apiaceae
Genus	Centella
Species	<i>Centella asiatica</i> (L)

Pegagan dikenal dengan nama latin *Centella asiatica* Linn.) Urban. atau *Hydrocotyle asiatica* Linn. Pegagan termasuk ke dalam famili Umbelliferae (Apiaceae). Pegagan memiliki nama asing asiatic pennywort dan Indian pennywort. Pegagan memiliki nama Hindi (India) gotu kola, di Cina pegagan disebut ji xue cau, di Belanda disebut

paardevoet, sedangkan di Indonesia, pegagan memiliki nama yang beragam, diantaranya pegago (Minangkabau); antanan gede, antanan rambat (Sunda); ganggagan, kerok batok, pantegowang, panegowang, rendeng, calingan rambat, pegagan, atau gagan-gagan (Jawa); taidah (Bali); balele (Sasak, Nusa Tenggara); kelai lere (Sawo, Nusa Tenggara); wisu-wisu, pegaga (Makasar); daun tungke-tungke, cipubalawo (Bugis); hisuhisu (Aselayar, Sulawesi); kos tekosan, gan gagan (Madura), sarowati, kori-kori (Halmahera), kolotidi menora (Ternate), dan dogakue, gogakue, atau sandanan (Papua). Pegagan sering disebut daun kaki kuda, hal ini dikarenakan bentuk daun pegagan yang menyerupai bentuk kaki kuda.⁹

b. Kandungan dan Manfaat Bahan Aktif

James, 2011 melaporkan bahwa pada penelitian tersebut menunjukkan bahwa herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) memiliki berbagai kandungan kimia utama seperti asiatikosida, madekasosida, asam asiatik dan asam madekasik.¹⁰ Kandungan kimia lainnya yang terdapat pada herba pegagan adalah brahmosida, oxiasiatikosida, thankunisida, isothankunisida, inositol, karotenoid, serta garam kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, vellarin, dan tanin.¹¹

Manfaat biologis dari herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) yaitu sebagai penyembuhan luka, antitumor, meningkatkan memori, kardioprotektif, antidepresi, pelangsing, imunomodulator, anti tuberkulosis, dan antiprotozoa.¹²

Dalam model praklinis penyakit Alzheimer, ekstrak *Centella asiatica* Linn. menurunkan kadar beta-amiloid dan stres oksidatif, mencegah penyusutan proses neuron.¹³ dan melindungi terhadap toksisitas yang terkait dengan beta-amiloid dan kelainan perilaku.¹⁴ Dalam model penurunan kognitif, pengobatan *Centella asiatica* Linn. secara signifikan meningkatkan kinerja memori, penurunan penanda kematian sel, peningkatan pertahanan antioksidan, dan membalikkan defisit mitokondria.¹⁵ Ada banyak komponen untuk *Centella asiatica*

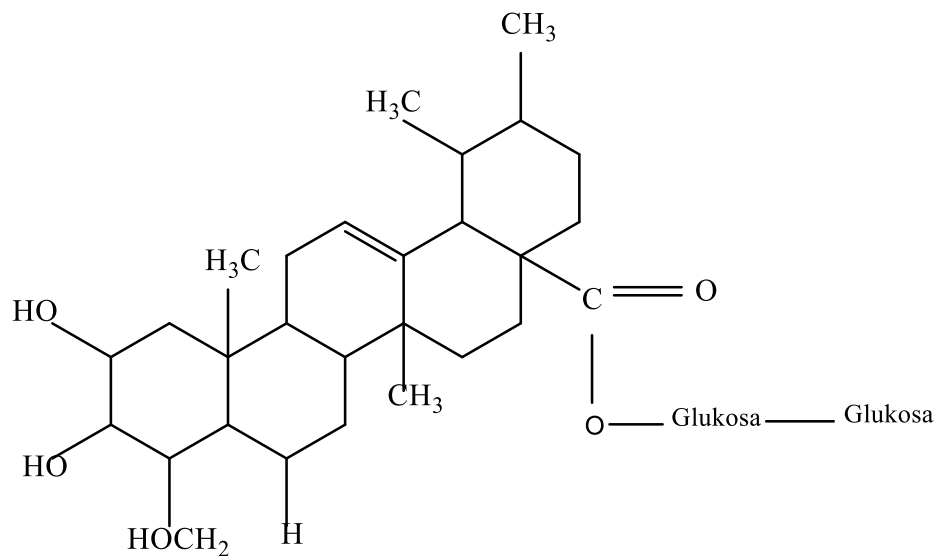
Linn, di mana asam asiatik paling banyak dipelajari dalam model praklinis. Asam asiatik tidak melintasi penghalang darah-otak dan menghasilkan efek antioksidan dan neuroprotektif.¹⁶

Komposisi senyawa kimia pegagan dalam 100 gram simplisia pegagan dapat dilihat pada Tabel 2:

Tabel II.2. Komposisi Kimia Tumbuhan Pegagan

Komposisi	Kandungan (g)
Air	89.3
Protein	1.6
Lemak	0.6
Karbohidrat	6.9
Serat	2.0
Abu	1.6
Kalsium	0.17
Fosfor	0.3
Besi	0.003
Kalium	0.414

Asiatikosida yang berasal dari tanaman *Centella asiatica* Linn. ini diketahui memiliki aktivitas yang baik dimana efektifitas zat aktif ini dapat meningkatnya antioksidan. Karena antioksidan telah dilaporkan memainkan peran penting dalam proses penyembuhan maka efek asiatikosida sebagai antioksidan tentu dalam pengobatan penyakit alzheimer.¹⁷



Gambar II.2. Struktur Asiatikosida¹⁷

c. Pegagan sebagai Neuroprotektif

Enzim asetilkolinesterase adalah faktor awal munculnya penyakit alzheimer. Kerusakan otak juga menunjukkan adanya peningkatan aktivitas dari enzim asetilkolinesterase.¹⁸ Hilangnya kemampuan memori memerlukan perawatan medis jangka panjang dan memiliki efek berbahaya bagi kesehatan manusia secara keseluruhan. Oleh karena itu perlu pengobatan dimana senyawa bioaktif yang digunakan untuk mengendalikan gejala penyakit menjadi lebih aman dan efektif.¹⁹

Ekstrak dari herba pegagan sebagai antioksidan memiliki efek meningkatkan fungsi kognitif. Turunan dari asam asiatik, triterpenoid yang diekstraksi dari herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) berperan dalam melindungi neuron dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh paparan berlebihan. Sehingga dalam penelitian tersebut sifat sitoprotektif dan antioksidan pada herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) mungkin bertanggung jawab atas pelindung saraf melawan kematian sel.²⁰

Penelitian dari herba pegagan yang diperoleh dari Malaysia didapatkan hasil bahwa kandungan senyawa zat aktif asiatikosida, asam madekasid, dan asam asiatik berperan dalam penghambatan terhadap enzim asetilkolinesterase sehingga dapat berperan sebagai neuroprotektif pada otak. Pada penggunaan ekstrak etanol herba pegagan didapatkan bahwa nilai konsentrasi penghambatan terhadap enzim asetilkolinesterase adalah 481,5 ppm, 763,5 ppm, dan diatas 1.000 ppm.³¹

d. Toksisitas Pegagan

Dilaporkan uji toksisitas akut menunjukkan bahwa pegagan tidak toksik sampai dengan dosis 2.000 mg/kgBB, karena tidak ada hewan uji yang mati dan tidak ada gejala klinis ketoksikan bermakna yang tampak pada seluruh kelompok hewan uji.²¹

2. Kelor (*Moringa oleifera* Lam.)

Tanaman Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) merupakan tanaman tropis yang tumbuh di daerah tropis seperti Indonesia. Tanaman kelor merupakan tanaman dengan ketinggian 7-11 meter dan tumbuh subur mulai dari dataran rendah sampai ketinggian 700 m di atas permukaan laut. Kelor dapat tumbuh semua jenis tanah dan tahan terhadap musim kering dengan toleransi terhadap kekeringan sampai 6 bulan.²² Di Indonesia tanaman kelor dikenal dengan nama yang berbeda di setiap daerah, diantaranya kelor, maronggi, moltong, kelo, ongge, murong atau barungai, dan hau fo. Kelor atau yang dikenal dengan nama Drumstick yang merupakan tanaman asli kaki gunung Himalaya bagian barat laut India, Afrika, Arab, Asia Tenggara, Amerika Selatan.²²



Gambar II.3. Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.).
Dokumentasi pribadi. 2019

a. Klasifikasi daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.)

Tabel II.3. Klasifikasi Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.)²²

Regnum	Plantae (Tumbuhan)
Division	Spermatophyta
Sub Division	Angiospermae
Classis	Dicotyledone
Sub Classis	Dialypetalae
Ordo	Rhoeadales
Famili	Moringaceae
Genus	Moringa
Spesies	<i>Moringa oleifera</i>

b. Kandungan dan khasiat daun kelor

Daun kelor mempunyai kandungan vitamin A, vitamin C, vitamin B, kalsium, kalium, besi, dan protein, dalam jumlah sangat tinggi yang mudah dicerna dan diasimilasi oleh tubuh manusia. Bahkan perbandingan nutrisi daun kelor segar dan serbuk, dengan beberapa sumber nutrisi lainnya yang tersaji pada gambar 4, jumlahnya berlipat-lipat dari sumber makanan yang selama ini digunakan sebagai sumber nutrisi untuk perbaikan gizi di banyak belahan negara. Tidak hanya itu, kelor pun diketahui mengandung lebih dari 40 antioksidan dalam pengobatan tradisional Afrika dan India serta telah digunakan dalam pengobatan tradisional untuk mencegah lebih dari 300 penyakit.²³

Daun Kelor Segar		3 kali Potassium Pisang	4 kali Vitamin A Wortel	25 kali Zat Besi Bayam	7 kali Vitamin C Jeruk	4 kali Calcium Susu	2 kali Protein yogurt
Serbuk Daun Kelor		15 kali Potassium Pisang	10 kali Vitamin A Wortel	25 times Zat Besi Bayam	1/2 kali Vitamin C Jeruk	17 kali Calcium Susu	9 kali Protein yogurt

Gambar II.4. perbandingan nutrisi daun segar dan serbuk daun kelor

Serbuk daun kelor mengandung vitamin A sebanyak 10 kali lebih banyak dibandingkan wortel, vitamin B₁ sebanyak 4 kali lebih banyak dari daging babi, vitamin B₂ sebanyak 50 kali lebih banyak dibandingkan oleh sardines, vitamin B₃ sebanyak 50 kali lebih banyak dibandingkan kacang, vitamin E sebanyak 4 kali lebih banyak dibandingkan minyak jagung, beta karoten sebanyak 4 kali lebih banyak dibandingkan oleh wortel, zat besi sebanyak 25 kali lebih banyak dibandingkan bayam, zinc sebanyak 6 kali lebih banyak dibanding almond, kalium 15 kali lebih banyak dibanding pisang, kalsium sebanyak 17 kali dan 2 kali lebih banyak dibanding *red wine*, serat dengan 5 kali lebih banyak dibanding sayuran pada umumnya, GABA 100 kali lebih banyak dibanding beras merah.²³

Tabel II.4. Kandungan tanaman kelor tiap 100g²³

Nutritional Analysis	Satuan	per 100 gram bahan		
		Polong	Daun Segar	Serbuk Daun
NUTRISI				
Kandungan Air	(%)	86.9	75.0	7.50
Kalori	Cal	26.0	92.0	205.0
Protein	gram	2.5	6.7	27.1
Lemak	gram	0.1	1.7	2.3
Karbohidrat	gram	3.7	13.4	38.2
Serat	gram	4.8	0.9	19.2
Mineral	gram	2.0	2.3	-
Kalsium (Ca)	mg	30.0	440.0	2003.0
Magnesium (Mg)	mg	24.0	24.0	368.0
Fospor (P)	mg	110.0	70.0	204.0
Potassium (K)	mg	259.0	259.0	1324.0
Copper (Cu)	mg	3.1	1.1	0.6
Zat Besi (Fe)	mg	5.3	0.7	28.2
Asam Oksalat	mg	10.0	101.0	0.0
Sulphur (S)	mg	137	137.0	870.0
VITAMIN				
Vitamin A - B carotene	mg	0.10	6.80	16.3
Vitamin B - Choline	mg	423.00	423.00	-
Vitamin B1 - Thiamin	mg	0.05	0.21	2.6
Vitamin B2 - Riboflavin	mg	0.07	0.05	20.5
Vitamin B3 - Nicotinic Acid	mg	0.20	0.80	8.2
Vitamin C - Ascorbic Acid	mg	120.00	220.00	17.3
Vitamin E - Tocopherols Acetate	mg	-	-	113.0
ASAM AMINO *)				
Arginine	mg	360	406.6	1325
Histidine	mg	110	149.8	613
Lysine	mg	150	342.4	1325
Tryptophan	mg	80	107	425
Phenylalanine	mg	430	310.3	1388
Methionine	mg	140	117.7	350
Threonine	mg	390	117.7	1188
Leucine	mg	650	492.2	1950
Isoleucine	mg	440	299.6	825
Valine	mg	540	374.5	1063

Penggunaan bagian-bagian tanaman kelor sebagai obat penyembuh disebutkan dari berbagai bagian tanaman yang mengandung mineral dan merupakan sumber protein yang baik, vitamin, β -karoten, asam amino *fenolat* dan berbagai asam amino essensial lainnya. Kelor menyediakan kombinasi yang kaya dan langka dari *zeatin*, *kuersetin*, β -sitosterol, *asam caffeoylquinic* dan *kaempferol*.²³



Gambar II.5. Khasiat dari penggunaan obat tradisional daun kelor.²³

Selain memiliki kekuatan sebagai pemurni air yang efektif dan nilai gizi yang tinggi. Kelor sangat penting untuk pengobatan alami. Berbagai bagian dari tanaman kelor seperti daun, akar, biji, kulit kayu, buah, bunga dan polong dewasa, bertindak sebagai stimulan jantung dan peredaran darah, memiliki anti-tumor, anti-piretik, anti-epilepsi, anti-inflamasi, anti-ulcer, anti-spasmodik, diuretik, anti-hipertensi, menurunkan kolesterol, antioksidan, anti-diabetik, hepatoprotektor, anti-bakteri, dan anti-jamur. Saat ini kelor sedang diteliti untuk digunakan dalam pengobatan berbagai penyakit dalam sistem kedokteran.²³

Penelitian pada daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) yang dilakukan menggunakan metode *in vitro* di Nigeria didapatkan hasil bahwa beberapa senyawa yang terdapat pada daun kelor seperti quersetin serta kampferol mampu memberikan efek penghambatan asetilkolinesterase sehingga berpotensi mencegah terjadinya penyakit alzheimer. Penggunaan ekstrak etanol daun kelor didapatkan nilai penghambatan IC₅₀ terhadap enzim asetilkolinesterase adalah 0,2105 ppm selain itu didapatkan juga senyawa flavonoid kuersetin dalam ekstrak etanol daun kelor yaitu sebesar 102,2 mg/g.³²

c. Toksisitas Daun Kelor

Dalam studi toksisitas akut, dosis total pemberian ekstrak daun kelor kepada tikus dalam waktu 24 jam adalah 20 g / kg yang tidak menyebabkan tanda-tanda terjadinya toksik akut, lesi kotor, organ visceral dan tingkat kematian yang diinduksi.²⁴

3. Penyakit Alzheimer

a. Definisi alzheimer

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. Munculnya penurunan perhatian terhadap diri sendiri dan masalah perilaku muncul ketika penderita menjadi sering berjalan dan tersesat. Penderita mengalami disorientasi dalam memperhatikan waktu, lokasi, dan identitas mereka. Penurunan ini semakin berkembang jika penderita mengalami kekurangan dalam bahasa atau mempunyai sejarah pada alkohol atau gangguan neurologis seperti stroke atau parkinson.²⁵

Memori merupakan suatu proses penyimpanan dan pengeluaran kembali informasi yang didapat dari proses belajar. Penyimpanan dan pemanggilan kembali informasi yang telah disimpan terjadi melalui sinyal-sinyal syaraf yang dijalankan melalui neuron ke neuron berikutnya melalui batas antar neuron (interneuronal junction) yang disebut sinaps. Sinyal-sinyal di antara neuron dihantar oleh senyawa neurotransmitter, salah satu neurotransmitter adalah asetilkolin (ACh). Asetilkolin disekresi sebagian besar di daerah otak.²⁵

Penyakit Alzheimer merupakan bentuk demensia yang paling umum, berjumlah kira-kira dua pertiga dari semua kasus. Hal ini dapat menyebabkan penurunan kemampuan kognitif secara berangsur-

angsur, sering bermula dengan kehilangan daya ingat. Penyebab dari 60 – 70% kasus demensia adalah Alzheimer yang dapat dikatakan sebagai salah satu bentuk penyakit spesifik dari demensia. Berbeda dengan beberapa penyakit atau gangguan fungsi tubuh akibat infeksi dan penggunaan obat yang menyebabkan demensia, 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 usia muda pun dapat mengalaminya. Hal ini dapat menyebabkan keadaan vegetatif total dan kemudian kematian.²⁵

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.²⁶

Tanda-tanda klasik yang dialami oleh kebanyakan penderita pada stadium awal antara lain kehilangan memori pendek yang merupakan kemunduran fungsi memori merupakan tanda yang paling awal. Memahami informasi yaitu keadaan saat penderita mengalami kesulitan untuk belajar hal yang baru. Akibatnya adalah mengulang-ulang sesuatu seperti pada pembicaraan dan janji. Selain itu kesulitan untuk menentukan waktu. Penderita mengalami kesukaran dalam menghitung, memasak, atau tugas. Penilaian ini ditandai dengan pasien yang mengalami kesukaran dalam kemampuan untuk mengantisipasi atau mempertimbangkan akibat suatu peristiwa atau tindakan serta tidak mampu memecahkan masalah sehari-hari. Kemampuan

berbahasa pada pasien alzheimer ditandai dengan sangat sulit menemukan kata yang benar dalam mengungkapkan pikiran. Hal ini menyebabkan dimana penderita yang dahulu pasif menjadi lebih agresif dan kadang-kadang berperilaku tidak wajar.²⁶

Berdasarkan beberapa gambaran mengenai penyakit Alzheimer di atas dapat disimpulkan bahwa penyakit Alzheimer merupakan penurunan kemampuan kognitif yang terjadi secara progresif dan penderita mengalami beberapa perubahan. Penyakit Alzheimer merupakan bentuk paling umum dari demensia. Dua pendekatan utama digunakan untuk mengidentifikasi penyebab penyakit tersebut, yaitu kolinergik dan nonkolinergik.²⁶

Salah satu strategi pengobatan Alzheimer adalah melalui peningkatan fungsi kolinergik dengan penggunaan inhibitor asetilkolinesterase (AChE) untuk meningkatkan jumlah asetilkolin dalam sinapsis antara saraf kolinergik. Menurut Wollen, 2010²⁶ melaporkan bahwa obat komersial yang telah banyak digunakan untuk pengobatan Alzheimer merupakan inhibitor AChE, yaitu donepezil, rivastigmine, galantamina, dan takrin. Donepezil HCl adalah inhibitor spesifik dan reversibel dari asetilkolinesterase (AChE), suatu kolinesterase utama di otak. Donepezil meningkatkan fungsi kolinergik dengan cara meningkatkan konsentrasi asetilkolin yaitu melalui efek penghambatan hidrolisis asetilkolin oleh AChE. Inhibitor AChE seperti takrin diketahui memiliki keterbatasan berupa efek samping seperti hepatotoksitas serta harga yang mahal. Oleh karena itu, penelitian untuk menemukan inhibitor AChE terus dilakukan, terutama inhibitor berbasis tanaman obat dengan harapan dapat mengurangi atau menghindari efek samping yang dapat ditimbulkan.²⁶

Inhibitor AChE merupakan pengobatan Alzheimer dengan pendekatan kolinergik. Sementara itu, pendekatan nonkolinergik dapat dilakukan melalui penggunaan antioksidan. Stres oksidatif yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif telah diketahui sebagai

penyebab oksidasi biomolekul sehingga terjadi kerusakan sel. Hal tersebut dapat menyebabkan proses neurodegeneratif termasuk defisiensi kognitif sebagai penyebab penuaan otak, Alzheimer, dan penyakit parkinson.²⁷

b. Enzim sebagai target pengobatan

Enzim menjadi target untuk pengobatan penyakit kronis baik sebagai defisiensi maupun kelebihan secara biokimia yang dapat diperbaiki dengan aktivasi atau penghambatan pada bagian tertentu untuk mengontrol kondisi patofisiologi keseluruhan tubuh. Informasi lebih lanjut tentang enzim, seperti struktur 3D, serta pengetahuan yang terperinci dari bagian aktif, kinetika enzim dan interaksi ligan dapat mempercepat penemuan target obat baru untuk penyakit kronis. Beberapa penyelidikan telah menemukan berbagai obat terhadap banyak penyakit yang tidak bisa disembuhkan. Namun, penelitian intensif masih dilakukan untuk mencari obat baru yang efektif untuk pengobatan berbagai penyakit. Pada era sekarang, penghambatan enzim adalah strategi pengobatan yang paling penting yang digunakan untuk pengobatan Alzheimer.²⁷

c. Kolinesterase (ChE)

Kolinesterase adalah kelompok enzim yang mengatur saraf kolinergik dan transmisi neuromuskular serta menghentikan terjadinya pemecahan asetilkolin (ACh). Asetilkolinesterase (AChE) dan Butirilkolinesterase (BuChE) adalah dua enzim kolinesterase yang penting terlibat dalam penghentian neurotransmisi kolinergik.²⁸ AChE adalah serin hidrolase yang terlibat dalam penghentian transmisi kimia di sinaps kolinergik dan organ sekretori yang mengkatalisis hidrolisis neurotransmitter asetilkolin. BuChE juga adalah serin hidrolase yang terlibat dalam hidrolisis ester kolin, termasuk asetilkolin, yang secara luas didistribusikan dalam sistem saraf dan dalam plasma.²⁸

Penghambat kolinesterase (ChE-I) yang pertama disetujui untuk pengobatan penyakit alzheimer adalah *tacrine* (Cognex[®]) pada tahun

1993, tapi mekanisme kerja dari obat tersebut berlangsung secara singkat dan kurang selektif antara kedua enzim ChE dan dikaitkan dengan tingginya insiden hepatotoksis reversibel. Sebaliknya, generasi kedua ChE-I yaitu *donepenzil HCl* (Aricept®), *rivastigmine* (Exelon®) dan *galantamine* (Reminyl®), disetujui oleh USFDA masing-masing pada tahun 1996, 2000, dan 2002 yang ditoleransi lebih baik dan telah digunakan dalam mengobati pasien dengan penyakit alzheimer ringan sampai sedang.²⁸

d. Asetilkolinesterase (AChE)

Asetilkolinesterase (AChE) merupakan enzim yang 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). Penghambat AChE adalah pendekatan yang paling efektif untuk mengobati gejala kognitif dari penyakit alzheimer ini. Aplikasi terapi lainnya dalam pengobatan antara lain penyakit parkinson, demensia dan juga penyakit ataksia. Penghambat AChE sebagai contoh *eserine*, *tacrine*, *donepezil*, *rivastigmine*, dan *galanthamine* adalah obat yang pada saat ini disetujui pada pengobatan dari penyakit alzheimer. Namun, pada obat ini juga diketahui mempunyai keterbatasan untuk penggunaan klinik karena waktu paruhnya pendek dan efek samping yang tidak menguntungkan.²⁸

e. Penghambat AChE sebagai Pengobatan Penyakit Alzheimer

Banyak alkaloid tumbuhan yang diturunkan dan bertindak sebagai AChE-I bisa dianggap sebagai model untuk pengembangan obat pada penyakit alzheimer, dan misalnya *galanthamine* dan *rivastigmine* yang tersedia untuk pengobatan pada pasien penyakit Alzheimer dengan gejala ringan sampai sedang.²⁹

Kegunaan donepezil, rivastigmine, dan galanthamine dalam pengobatan pasien dengan penyakit Alzheimer telah dilakukan studi meta 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. Adanya efek samping donepezil terendah dan tertinggi dengan rivastigmine.²⁹

Banyak tumbuhan yang telah dipelajari dalam *bioassay* nya untuk melakukan suatu identifikasi sebagai penghambatan AChE dan kelompok senyawa yang berbeda dari suatu bahan alam lainnya yang diturunkan dari beberapa tumbuhan yang dianggap mempunyai penghambatan AChE yang berpotensi untuk pengobatan pada penyakit Alzheimer. Baik senyawa nonalkaloid dan turunan alkaloid yang sudah dipelajari, tetapi yang paling ampuh yaitu adanya penghambatan AChE saat ini adalah alkaloid alami ataupun dari semisintesis.²⁹

AChE yang terdapat dalam CNS mengkatalis hidrolisis ACh menjadi kolin dan asetat, ACh dilepaskan dalam sinaptik, di mana akan mengaktifkan kedua reseptor kolinergik *postsynaptic* dan *presynaptic*, yaitu nikotinik dan muskarinik, yang bekerja untuk peningkatan transmisi kolinergik, sehingga menghasilkan perbaikan kognitif. Aktivitas stimulasi saraf diakhiri oleh enzim kolinesterase, yaitu AChE dan BuChE. Pada pasien dengan riwayat penyakit Alzheimer, terjadi penurunan neurotransmitter dan akan menjadi hipotesis penyebab terjadinya penyakit Alzheimer.²⁹ Kolinergik diklasifikasikan sebagai hidrolase serin, enzim AChE menggunakan tiga amino residu asam di bagian aktif histidin, serin dan asam glutamate. Dua asam amino yang pertama mengaktifkan rantai samping dari residu serin. Setelah bagian serin aktif maka akan membentuk tetrahedral dengan kelompok karbonil ACh, kolin dilepas kemudian molekul air yang digunakan

dalam bagian aktif untuk melepaskan asetat dan serin, yang mengembalikan enzim kembali ke keadaan semula. Enzim AChE adalah target dari penghambatan AChE untuk pengobatan penyakit Alzheimer dan tujuannya antara lain adalah untuk memulihkan, setidaknya sebagian tingkat neurotransmitter. Pendekatan ini dapat dianggap sebagai intervensi jangka pendek pada gejala, tetapi beberapa data yang muncul dari pengujian jangka panjang telah menunjukkan bahwa efeknya mungkin akan berkepanjangan. Untuk alasan ini, efek yang diamati dari stabilitas status kognitif pasien menunjukkan adanya mekanisme lanjut penghambatan kolinesterase yang mungkin dapat membantu pencegahan pembentukan plak A β .²⁹ mekanisme lain juga sedang diselidiki dan obat multi target karena patogenesis multifaktorial dari penyakit Alzheimer. Penggunaan penghambat AChE telah dikaitkan dengan efek antiinflamasi yang dimediasi oleh α -7- nAChRs. Komponen inflamasi pada penyakit Alzheimer sangat penting dan peran peradangan dan penghambat AChE menekankan peran keseimbangan kolinergik dalam patologi ini.²⁹

4. Pengujian Aktivitas Penghambatan Ache Dengan Metode Ellman

Penghambatan aktivitas dengan menggunakan alat *microplate reader* berdasarkan metode Ellman. Prinsip kimia dari reaksi ini adalah enzim menghidrolisis substrat asetiltiokolin (ATCh) menjadi tiokolin dan asam asetat. Tiokolin yang bereaksi dengan 5,5' -ditiobis-(asam 2-nitrobenzoat) (DTNB) dan dari hasil tersebut memberikan warna kuning. Intensitas warna kuning dari reaksi tersebut dapat di deteksi pada panjang gelombang 412 nm untuk mendapatkan aktivitas enzim.³⁰

B. KERANGKA / LANDASAN TEORI

Ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) telah dilakukan penelitian terhadap aktivitas penghambatan enzim asetilkolinesterase yang merupakan penyebab dari penyakit alzheimer. Penelitian aktivitas dari herba pegagan dilakukan dengan menggunakan metode *in silico* dan *in vitro*. Pada tanaman herba pegagan ini terdapat beberapa senyawa aktif yang berperan dalam penghambatan enzim asetilkolinesterase seperti asiatikosida, asam madekasid, dan asam asiatik.³¹

Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) telah dilakukan penelitian terhadap aktivitas antikolinesterase dan antioksidan dimana pengujian yang dilakukan menggunakan metode *in vitro*. Pada tanaman ini didapatkan beberapa senyawa yang terdapat pada daun kelor seperti quersetin serta kampferol.³² Untuk itu perlu dilakukan pengujian terhadap penghambatan asetilkolinesterase dari kombinasi ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.). Simplisia herba pegagan dan daun kelor masing-masing dimaserasikan dengan pelarut etanol 96%. Dari hasil ekstrak tersebut diuapkan dan dikeringkan dan dilakukan proses freeze drying. Kemudian dilakukan pengujian dengan empat sampel kombinasi terhadap aktivitas penghambatan asetilkolinesterase dengan menggunakan metode Ellman. Ekstrak yang mempunyai aktivitas penghambatan terbaik diidentifikasi dengan microplate reader.

C. HIPOTESIS

Penelitian terhadap aktivitas penghambatan asetilkolinesterase pada herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) sudah dilakukan di Malaysia. Pada daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) sudah dilakukan di Nigeria. Hasil penelitian menunjukkan bahwa adanya penghambatan dari asetilkolinesterase pada masing-masing ekstrak baik herba pegagan maupun ekstrak daun kelor. Pada penelitian tersebut juga didapatkan kandungan zat aktif dari masing-masing tanaman tersebut yang berperan dalam penghambatan dari enzim asetilkolinesterase yaitu asiatikosida, madekosida, asam asiatik pada herba pegagan serta kuersetin

yang terdapat ekstrak daun kelor.^{31,32} Data penelitian tersebut akhirnya dibuatlah hipotesis dalam penelitian ini dimana diharapkan pada senyawa yang terkandung pada masing-masing tanaman dapat dikombinasikan untuk dapat menghambat enzim asetilkolinesterase sehingga menurunkan terjadinya penyakit alzheimer pada masyarakat khususnya pada manusia lanjut usia.

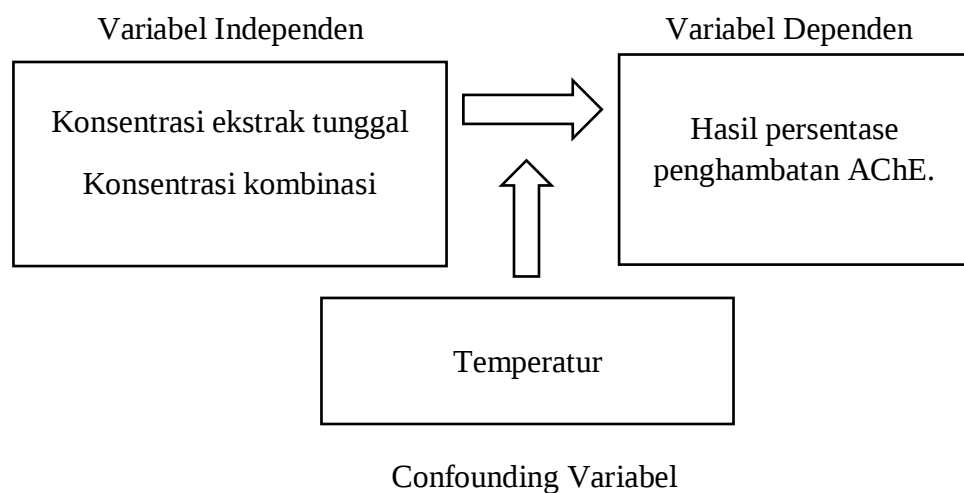
BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. METODE YANG DIGUNAKAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen dimana bertujuan untuk memperoleh kombinasi dari ekstrak herba pegagan dan ekstrak daun kelor yang mempunyai aktivitas penghambatan pada enzim asetilkolinesterase. Simplisia herba pegagan dan daun kelor diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% setelah itu ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dilanjutkan dengan metode *freeze drying* untuk mendapatkan ekstrak yang stabil. Masing-masing ekstrak diuji aktivitas penghambatan asetilkolinesterase dengan metode Ellman. Prinsip dari metode ini adalah pengukuran tingkat produksi tiokolin sebagai hasil hidrolisis asetiltiokolin oleh enzim asetilkolinesterase. Hasil reaksi tiokolin dengan asam 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoat (DTNB) dimana menghasilkan anion kuning asam 5-tio-2-nitrobenzoat. Warna kuning hasil reaksi diukur pada Panjang gelombang 400 nm spektrofotometer UV-Vis. Ekstrak yang paling aktif kemudian diuji aktivitas penghambatan terhadap enzim asetilkolinesterase.

B. KERANGKA KONSEP



C. DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL

No	Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat ukur	Skala	Kriteria
1	Konsentrasi Ekstrak Tunggal	Konsentrasi ekstrak tunggal adalah konsentrasi dari sampel yang digunakan yaitu ekstrak pegagan dan ekstrak daun kelor. Dimana pada konsentrasi ekstrak tunggal diujikan terhadap aktivitas penghambatan asetilkolinesterase	- Konsentrasi sample: 100 ppm 500 ppm 250 ppm 125 ppm 62,25 ppm 31,25 ppm 15,625 ppm - Nilai inhibisi ekstrak	Mikroplate reader	Interval	Nilai absorbansi semakin kecil maka prosentase penghambatan semakin tinggi
	Konsentrasi Kombinasi Ekstrak	Konsentrasi kombinasi ekstrak digunakan untuk mendapatkan beberapa perbandingan yang digunakan pada ekstrak pegagan dan ekstrak daun kelor untuk diujikan terhadap aktivitas penghambatan asetilkolinesterase	- Konsentrasi sample: 100 ppm 500 ppm 250 ppm 125 ppm 62,25 ppm 31,25 ppm 15,625 ppm - Nilai inhibisi ekstrak	Mikroplate reader	Interval	Nilai absorbansi semakin kecil maka prosentase penghambatan semakin tinggi
	Aktivitas penghambatan AChE	Aktivitas penghambatan asetilkolinesterase dilakukan untuk mendapatkan nilai IC_{50} dari suatu sample yang digunakan	Nilai inhibisi ekstrak	Mikroplate reader	Rasio	Nilai absorbansi semakin kecil maka prosentase penghambatan semakin tinggi

D. JENIS PENELITIAN YANG AKAN DIGUNAKAN

Penelitian ini berdasarkan tujuannya adalah penelitian terapan. Berdasarkan metode penelitian, penelitian ini adalah penelitian eksperimen kuantitatif.

E. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium PTFM, BPPT Puspitek Serpong. Selain itu pengerjaan pada penelitian ini dimulai dari bulan Maret 2019 sampai dengan bulan Juli 2020.

F. INSTRUMEN PENELITIAN

Instrumen dan pengumpulan data adalah panjang gelombang maksimal dan serapan dari microplate reader pada metode Ellman, dan freeze dry.

G. RANCANGAN ANALISIS DATA

Data yang diperoleh dibuat regresi linier untuk menentukan IC_{50} . Nilai IC_{50} yang terkecil menunjukan aktivitas terbesar. Didasarkan pada metode Ellman yang menggunakan substrat asetilkolin iodida (ATCI) dan 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). Dimana dengan adanya reaksi kolorimetri yang terjadi antara ATCI dan DTNB menghasilkan warna kuning dari asam 5-tio-2-nitro-benzoat. Metode ini mengukur aktivitas AChE dalam sampel yang diberi perlakuan.

BAB IV

BAHAN, ALAT, DAN PROSEDUR PENELITIAN

A. BAHAN DAN ALAT YANG DIGUNAKAN

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia herba pegagan; daun kelor; etanol 96% (sigma aldrich); aqua destilata; metanol p.a (Merck), DTNB ((5,5'-ditiobis-(asam 2-nitrobenzoat); AchI (asetilkolin iodida) (Sigma aldrich); Bovine Serum Albumin 0,1% (Sigma aldrich); AchE (asetilkolinesterase) (Sigma aldrich); Natrium hidroksida (Sigma aldrich), eserin.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary evaporator* (IKA), *freeze dry* (New Brunswick), *ELISA reader* (EL_x 800), Shaker (Innova 40), peralatan gelas, micro pipet (Eppendorf).

B. PROSEDUR PENELITIAN

1. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tanaman herba pegagan dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Jawa Tengah. Simplisia daun kelor dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Jawa Barat.

2. Pengumpulan dan Penyediaan Bahan Penelitian

Tanaman herba pegagan diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Jawa Tengah. Simplisia daun kelor diperoleh dari Moringa Organik Indonesia, Blora, Jawa Tengah. Daun kelor dan herba pegagan yang diambil dibuat dalam bentuk serbuk simplisia sesuai dengan ketentuan dari Farmakope Herbal Indonesia.

3. Pembuatan Ekstrak

a. Ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.)

Ekstrak Herba Pegagan (*Centella asiatica* Linn.) yang diperoleh dari B2P2TOOT, Tawangmangu dihaluskan dengan grinding pada mesh 80. Setelah itu, simplisia di ekstraksi dengan menggunakan cara maserasi. Simplisia seberat 990g direndamkan dengan etanol 96% sebanyak 1.000ml 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. Kemudian ekstrak kental dilakukan *freeze dry* untuk mendapatkan ekstrak yang stabil. kemudian ekstrak ditimbang untuk dihitung rendemen (%).

b. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.)

Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) yang diperoleh dari Moringa Organik Indonesia, Blora diekstraksi dengan menggunakan cara maserasi. Simplisia seberat 1.000g direndamkan dengan etanol 96% sebanyak 1.000ml 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. Kemudian ekstrak kental dilakukan *freeze dry* untuk mendapatkan ekstrak yang stabil. kemudian ekstrak ditimbang untuk dihitung rendemen (%).

4. Penapisan Fitokimia³³

Penapisan fitokimia dilakukan pada sampel uji yang terdiri dari ekstrak etanol 96% herba pegagan dan daun kelor:

a. Identifikasi Alkaloid

Sampel uji ditimbang 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 Dragendorff akan terbentuk endapan putih. Sampel dikatakan mengandung alkaloid jika terjadi endapan atau kekeruhan pada paling sedikit dua dari tiga percobaan di atas.

b. Identifikasi Saponin

Sampel uji ditimbang 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.

c. Identifikasi Tanin

Sampel uji ditimbang 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.

d. Identifikasi Fenolik

Identifikasi senyawa fenolik dapat dilakukan dengan penambahan natrium hidroksida. Sampel yang mengandung senyawa fenolik ditunjukkan dengan timbulnya warna merah.

e. Identifikasi Flavonoid

Sebanyak 10 g sampel uji ditambahkan 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.

f. Identifikasi Glikosida

Identifikasi senyawa glikosida dilakukan dengan penambahan asam asetat glasial lalu ditambahkan besi (III) klorida dan ditambahkan asam

sulfat pekat dan dikocok. Sampel dikatakan mengandung senyawa glikosida ditunjukkan dengan timbulnya cincin warna ungu.

g. Identifikasi Triterpenoid/Steroid

Sebanyak 1 g sampel dimaserasi 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.

5. Pengujian Mutu Ekstrak³⁴

Pengujian mutu ekstrak herba pegagan dan daun kelor meliputi:

a. Penetapan kadar sari larut air

Sampel ditimbang sebanyak 5 g, sampel dilarutkan dengan air kloroform sampai batas tara 100 mL, sampel di kocok selama 6 jam dimana di kocok setiap 30 menit sekali, sampel dipipet 25 mL ke dalam cawan porselen, dan sampel dapat ditentukan bobot tepatnya dalam suhu 105°C, sampel ditimbang setelah 3 jam dan 1 jam untuk seterusnya sampai bobot tetap. Setelah itu sampel dihitung kadar sari larut air dengan rumus dibawah ini:

$$\text{Kadar Sari Air} = \frac{(\text{cawan+sari})-(\text{cawan kosong})}{\text{ekstrak}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

b. Penetapan kadar sari larut etanol

Sampel ditimbang sebanyak 5 g, sampel dilarutkan dengan etanol 96% sampai batas tara 100 mL, sampel di kocok selama 6 jam dimana di kocok setiap 30 menit sekali, sampel dipipet 25 mL ke dalam cawan porselen, dan sampel dapat ditentukan bobot tepatnya dalam suhu 78°C, sampel ditimbang setelah 3 jam dan 1 jam untuk seterusnya sampai bobot tetap. Setelah itu sampel dihitung kadar sari larut etanol dengan rumus dibawah ini:

$$\text{Kadar Sari Alkohol} = \frac{(\text{cawan+sari})-(\text{cawan kosong})}{\text{ekstrak}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

c. Penetapan Kadar Asiatikosida

Timbang sampel sebanyak 0,25 g ke dalam labu ukur 25 mL, tambahkan aquadest sebanyak 1/3 volume labu ukur, dikocok selama dua jam dan setelah itu di saring. Filtrat ditotolkan ke dalam lempeng plat kromatografi lapis tipis sebanyak 5 µL. standar saponin 100 ppm di totolkan sebanyak 5 µL. elusi dengan eluen CHCl₃ ; etanol ; etil asetat selama lebih kurang 45 menit. Ukur dengan TLC Scanner λ= 276 nm. Penetapan kadar asiatikosida dihitung dengan rumus dibawah ini:

$$\text{kadar asiatikosida} = \frac{\text{konsentrasi uji}}{\text{ekstrak}} \times \text{fp} \times 100\%$$

d. Penetapan kadar Flavonoid sebagai Kuersetin

Timbang sampel sebanyak 1g dalam labu didih 100ml, tambahkan 20mL aseton p.a dan 2mL asam klorida 25%, direfluk dipenangas air dengan suhu 70°C selama 30 menit, dinginkan dan disaring dengan kertas saring kasar lakukan pengulangan selama 2 kali, filtrat disatukan dan ditambahkan aseton p.a sampai 100 mL, filtrat dipipet 20mL ke dalam corong pemisah dan tambahkan 20 mL aqua destilata dan 15 mL etil asetat kocok selama 15 menit. Fase aseton-air pada lapisan bawah dipisahkan ke dalam corong pisah, fase etil asetat di lapisan atas dibiarkan dalam corong pemisah. Fase aseton air diekstrak selama 2 kali dengan 10 mL etil asetat dalam corong pisah. Fase etil asetat di corong lainnya ditambahkan 40 mL aqua destilata dan dikocok selama 2 kali. Laspisan atas ditampung dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan etil asetat p.a sampai tanda batas. Lapisan diatas di pipet 10mL dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan 0,5 mL larutan natrium asetat 0,5% dalam air dan 2 mL larutan AlCl₃ dalam metanol p.a. setelah itu ditambahkan larutan asam asetat 5% dalam metanol p.a sampai tanda batas. Larutan

didiamkan selama 25 menit dan diukur panjang gelombang 425 nm.
Kadar flavonoid dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Flavonoid} = A \times \frac{0,735}{g}$$

Keterangan = A : absorbansi sampel

g : berat kering sampel yang ditimbang (gram)

e. Penetapan kadar tanin

Timbang sampel sebanyak 2g kedalam labu didih 500mL, tambahkan aqua destilata sebanyak 350mL dan di refluks selama 3 jam setelah itu di dinginkan dan dipindahkan secara kuantitatif kedalam labu ukur 500mL. setelah itu disaring dan dipipet 2mL natrium karbonat jenuh dan dibiarkan selama 40 menit lalu diukur absorbansinya pada 725nm.

f. Penentuan susut pengeringan.

Ekstrak diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol hingga lapisan 5 sampai 10 mm. ekstrak di timbang sebanyak 1-2 g dalam botol timbang tertutup yang sebelumnya dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara, biarkan botol dalam keadaan tertutup untuk dingin dalam eksikator hingga suhu kamar, kemudian masukan ke dalam ruang pengering, buka tutup dan keringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Susut pengeringan dalam nilai persen dihitung dengan rumus dibawah ini:

$$\% = \frac{(\text{botol} + E_0) - (\text{botol} + E_1)}{\text{ekstrak}} \times 100\%$$

Keterangan: E₀ = ekstrak sebelum pemanasan

E₁ = ekstrak sesudah pemanasan

g. Penentuan Kadar Air

Masukan 10 g ekstrak dan timbang seksama dalam wadah yang telah ditara. Keringkan dalam suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%.

h. Penentuan Kadar Abu

Timbang seksama 2 g ekstrak, masukan ekstrak ke dalam krus silikat dan ratakan, pijarkan perlahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang. Jika arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas. Saring dengan kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama, masukan filtrat ke dalam krus dan diuapkan. Pijarkan hingga bobot tetap. Timbang dan hitung kadar abu terhadap bahan yang dikeringkan di udara.

i. Penentuan Cemaran Logam Berat

0,5 g contoh tanah dimasukan ke dalam labu destruksi, ditambahkan 5 mL HNO_3 dan 0,5 mL HClO_4 . Dibiarkan semalam dan keesokan harinya di destruksi diatas *block digest*. Mula – mula pada suhu 150°C selama 150 menit sampai uap kuning habis. Kemudian suhu dinaikan kembali menjadi 170°C selama 1 jam, dan ditingkatkan lagi menjadi 200°C sampai uap putih. Dinginkan, diencerkan dengan air suling dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas dan dikocok serta dibiarkan semalam.

j. Pengujian Angka Kapang Khamir

Ditimbang 10 g ekstrak ke dalam erlenmeyer steril. Ditambahkan 90 mL *Lethen Broth* dikocok homogen hingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Disiapkan 3 tabung yang masing-masing telah diisi 9 mL ASA. Dari hasil homogenisasi dipipet 1 mL pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung ASA pertama, dikocok homogen hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10^{-3} . Dari masing-masing pengenceran dipipet 0,5 mL, pada permukaan *PDA*, segera digoyang sambil diputar hingga suspensi tersebar merata, dan dibuat duplo. Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer, dilakukan uji blangko pada satu lempeng *PDA*.

6. Pengujian Aktivitas Penghambatan AChE

Pengujian aktivitas penghambatan enzim asetilkolinesterase yang dilakukan dengan menggunakan *well microplate*. Pengujian aktivitas penghambatan ini dilakukan oleh ekstrak etanol 96%. Hasil uji aktivitas

penghambatan asetilkolinesterase oleh kombinasi ekstrak herba pegagan dan ekstrak daun kelor dapat ditunjukkan dengan menggunakan persamaan linier dan dengan mengetahui IC₅₀. Pengujian aktivitas penghambatan AChE dilakukan dengan cara berikut:

1. Pipet 25 µL sampel,
2. Pipet 50 µL BSA 0.1%,
3. Pipet 25 µL enzim asetilkolinesterase,
4. Lakukan proses pencampuran di dalam well menggunakan mikropipet,
5. Shake plate dengan temperature 37 °C, selama 15 menit (150 rpm),
6. Pipet 125 µL DTNB,
7. Pipet 25 µL AChI,
8. Lakukan proses pencampuran di dalam well menggunakan mikropipet,
9. Shake plate dengan temperature 37 °C, 30 menit (150 rpm),

Dilakukan pengukuran dengan alat elisa reader ($\lambda = 400 \text{ nm}$). Pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang 400 nm.

C. CARA PENGOLAHAN DAN ANALISIS DATA

1. Analisis Uji Aktivitas Penghambatan Asetilkolinesterase

Pada ekstrak kombinasi yang diperoleh dilakukan pengujian penghambatan AChE.

- a. Serapan kontrol, uji (kontrol positif dan sampel) dan blanko yang telah diukur pada microplate reader, dicatat dan kemudian dihitung persentase penghambatan AChE dengan cara memasukan hasil serapan masing-masing konsentrasi pada rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{uji}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Dimana:

A kontrol : serapan enzim + substrat

A uji : serapan uji + enzim + substrat – serapan blanko uji

- b. persamaan regresi linear dicari dengan memasukan nilai konsentrasi larutan uji sebagai sumbu x dan persentase hambatan sebagai sumbu y.

- c. IC_{50} dihitung dengan cara memasukan persentase hambatan sebesar 50% pada regresi linear.
- d. Ekstrak ditentukan dengan adanya aktivitas penghambatan AchE tertinggi.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. DETERMINASI TANAMAN

Hasil determinasi menyatakan bahwa tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Centella asiatica* Linn. (Apiaceae) dan *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 2 dan lampiran 3.

B. PEMBUATAN EKSTRAK

Hasil maserasi simplisia herba *Centella asiatica* Linn. dengan pelarut etanol 96% diperoleh ekstrak kental sebanyak 333,4 g dengan rendemen sebesar 33,68%. Setelah itu ekstrak kental herba *Centella asiatica* Linn. dilakukan *freeze drying* sehingga diperoleh ekstrak sebanyak 123,9 g dengan rendemen sebesar 12,51%. Pada maserasi daun *Moringa oleifera* Lam. dengan menggunakan pelarut etanol 96% diperoleh ekstrak kental daun *Moringa oleifera* Lam. sebanyak 467,12 g dengan rendemen sebesar 46,71%. Setelah itu ekstrak kental daun *Moringa oleifera* Lam. dilakukan *freeze drying* sehingga diperoleh ekstrak sebanyak 152,39g dengan rendemen sebesar 15,24%. pemilihan etanol 96% dalam proses maserasi kedua simplisia ini adalah untuk menarik senyawa yang terkandung dalam masing-masing simplisia tersebut. Data penimbangan dan rendemen ditunjukkan pada tabel V.1 pada herba *Centella asiatica* Linn. dan tabel V.2. pada ekstrak daun *Moringa oleifera* Lam.

Tabel V.1. Hasil ekstrak herba *Centella asiatica* Linn.

No	Sampel	Bobot (g)	Rendemen 1 (%)*
1	Ekstrak etanol 96%	333,4	33,68

Keterangan: * dihitung terhadap 990 g simplisia kering.

Tabel V.2. Hasil ekstrak daun *Moringa oleifera* Lam.

No	Sampel	Bobot (g)	Rendemen 1 (%)*
1	Ekstrak etanol 96%	467,12	46,71

Keterangan: * dihitung terhadap 1000 g simplisia kering.

C. PENAPISAN FITOKIMIA

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa (*Class of compound*) yang terkandung di dalam ekstrak yang diperoleh dari *Centella asiatica* Linn. dan *Moringa oleifera* Lam. Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol 96% *Centella asiatica* Linn. dan *Moringa oleifera* Lam. memiliki kemampuan untuk menarik kandungan senyawa flavonoid, tanin, saponin, 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 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 V.3.

Tabel V.3. Hasil Penapisan Fitokimia

No	Kandungan Senyawa	Ekstrak Herba Pegagan	Ekstrak Daun Kelor
1	Alkaloid	+	+
2	Saponin	+	+
3	Tanin	+	+
4	Fenolik	+	+
5	Flavonoid	+	+
6	Glikosida	+	+
7	Triterpenoid	+	-
8	Steroid	+	+

Pada hasil penapisan fitokimia didapatkan bahwa pada ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) terdapat banyak kandungan 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 betulunik, asam tankunik, dan asam isotankunik.¹⁷ selain itu, juga terdapat beberapa turunan senyawa flavonoid seperti kuersetin, kaempferol, patuletin, rutin, apigenin, dan mirisetin yang terdapat pada herba pegagan ini.¹⁷

Pada ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) 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.³²

D. PENGUJIAN MUTU EKSTRAK

Pengujian mutu ekstrak dilakukan untuk mengetahui beberapa parameter spesifik dan non spesifik dari yang meliputi kadar air, kadar abu, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar sari larut etanol, kadar asiaticosida, kadar flavonoid sebagai quersetin, kadar tanin, kadar susut pengeringan, cemaran logam Pb, Cd, As, Hg, dan pengujian angka kapang khamir.

Tabel V.4. Hasil pengujian mutu ekstrak etanol 96% herba pegagan

No	Kandungan Senyawa	Kadar (%)	Syarat
1	Kadar air	14,65	≤ 10
2	Kadar abu	27,35	$\leq 16,6$
3	Kadar sari larut air	26,56	≥ 18
4	Kadar sari larut etanol	40,56	$\geq 12,5$
5	Kadar asiaticosida	1,99	$\geq 0,90$
6	Kadar susut pengeringan	14,28	-

Tabel V.5. Hasil pengujian cemaran logam berat ekstrak pegagan

No	Kandungan Senyawa	Hasil (ppm)	Syarat
1	Cemaran logam Pb	12,55	< 10
2	Cemaran logam Cd	TTD	< 0,3
3	Cemaran logam Hg	TTD	< 0,3
4	Cemaran logam As	TTD	< 10

Keterangan: TTD: Tidak terdeteksi

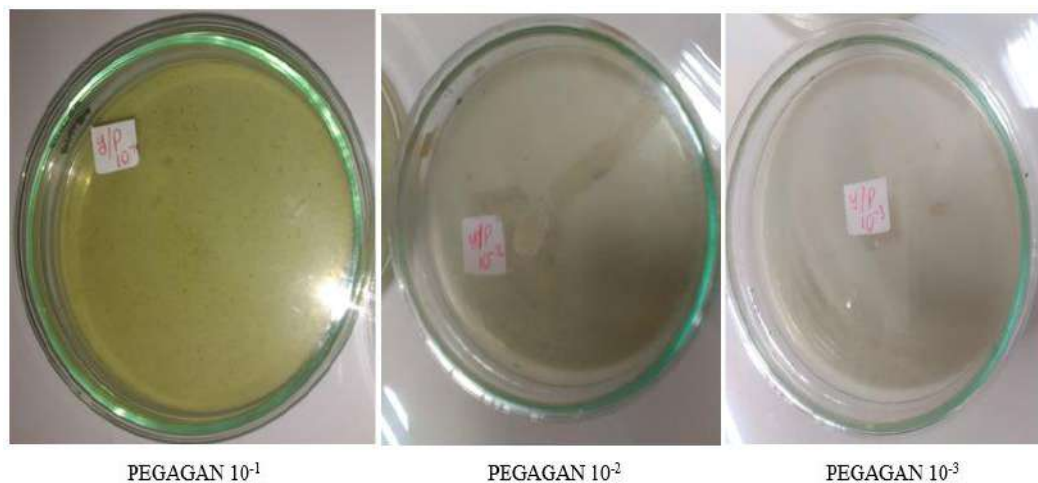
Pada ekstrak herba pegagan didapatkan kadar air yang diatas persyaratan yang sudah ditetapkan oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia dimana kadar air yang tinggi ini dapat menjadi media tumbuhnya bakteri dan jamur yang dapat merusak senyawa yang terkandung di dalam ekstrak ini.³⁴ pada persyaratan kadar abu yang tinggi dimana bersumber dari pengotor dapat berpotensi dalam kerusakan senyawa yang terkandung pada herba pegagan.³⁴ pada cemaran logam berat Pb dari ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) didapatkan melebihi dari persyaratan yang ditentukan oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Penetapan kadar sari larut air dan etanol dilakukan dengan tujuan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa yang dapat tersari dengan pelarut air dan etanol dari suatu ekstrak simplisia.³⁴ dari hasil pengujian menunjukan kadar sari larut air ekstrak herba pegagan adalah 26,56%, sedangkan kadar sari larut etanol sebesar 40,56%. Hal ini menunjukan bahwa jumlah senyawa yang terlarut dalam etanol lebih besar daripada jumlah senyawa yang terlarut dalam air. Hasil pengujian ini masih memenuhi syarat standar dalam literatur pustaka.

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal mengenai besarnya senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan.³⁴ dari hasil pengujian diperoleh bahwa nilai susut pengeringan sebesar 14,28%. Hal ini menunjukan bahwa jumlah senyawa yang hilang (menguap) pada saat proses pengeringan adalah 14,28%.

Pengujian kadar asiatikosida pada ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dilakukan dengan tujuan memberikan informasi kadar golongan kandungan kimia sebagai parameter mutu ekstrak dalam kaitannya dengan efek farmakologis.³⁴ dari hasil pengujian diperoleh bahwa kadar asiatikosida yang terkandung dalam ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) adalah sebesar 1,99%. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan asiatikosida dalam ekstrak herba pegagan ini memenuhi persyaratan dalam literatur pustaka.

Pada pengujian cemaran logam berat dilakukan dengan tujuan untuk memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu yang melebihi nilai yang ditetapkan karena berbahaya bagi kesehatan.³⁴ Hasil pengujian mutu ekstrak herba pegagan didapatkan hasil bahwa adanya cemaran logam Pb yang tidak sesuai dengan persyaratan yang berlaku di Farmakope Herbal Indonesia. Pada pengujian penghambatan asetilkolinesterase adanya beberapa logam berat yang masuk dalam kategori berbahaya diantaranya adalah logam berat Cu^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , dan Zn^{+2} dapat bereaksi dengan gugus tiol yang terdapat pada tiokolin dan memberikan peningkatan reaktivitas dengan tiokolin dan 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB).



Gambar V.1. Hasil pengujian angka kapang khamir ekstrak herba pegagan

Pengujian angka kapang khamir dilakukan dengan tujuan agar memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung cemaran jamur melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan aflatoksin yang berbahaya bagi kesehatan.³⁴ pada ekstrak herba pegagan didapatkan hasil bahwa pada pengujian ini tidak terjadinya pertumbuhan kapang khamir pada ekstrak pegagan dengan konsentrasi 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} .

Tabel V.6. Hasil pengujian mutu ekstrak etanol 96% daun kelor

No	Kandungan Senyawa	Kadar (%)	Syarat
1	Kadar air	8,08	≤ 10
2	Kadar abu	5,61	≤ 9
3	Kadar sari larut air	12,54	≥ 10
4	Kadar sari larut etanol	50,21	$\geq 12,5$
6	Kadar susut pengeringan	8,48	$\leq 10,28$

Tabel V.7. Hasil pengujian cemaran logam berat ekstrak daun kelor

No	Kandungan Senyawa	Hasil (ppm)	Syarat
1	Cemaran logam Pb	24,80	< 10
2	Cemaran logam Cd	TTD	$< 0,3$
3	Cemaran logam Hg	TTD	$< 0,3$
4	Cemaran logam As	TTD	< 10

Keterangan: TTD: Tidak terdeteksi

Pengujian kadar air dilakukan dengan tujuan memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam ekstrak.³⁴ Hasil pengujian pada ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) didapatkan bahwa kadar air sebesar 8,08%. Hal ini menunjukkan bahwa kadar air dalam ekstrak daun kelor ini memenuhi persyaratan dalam literatur pustaka.

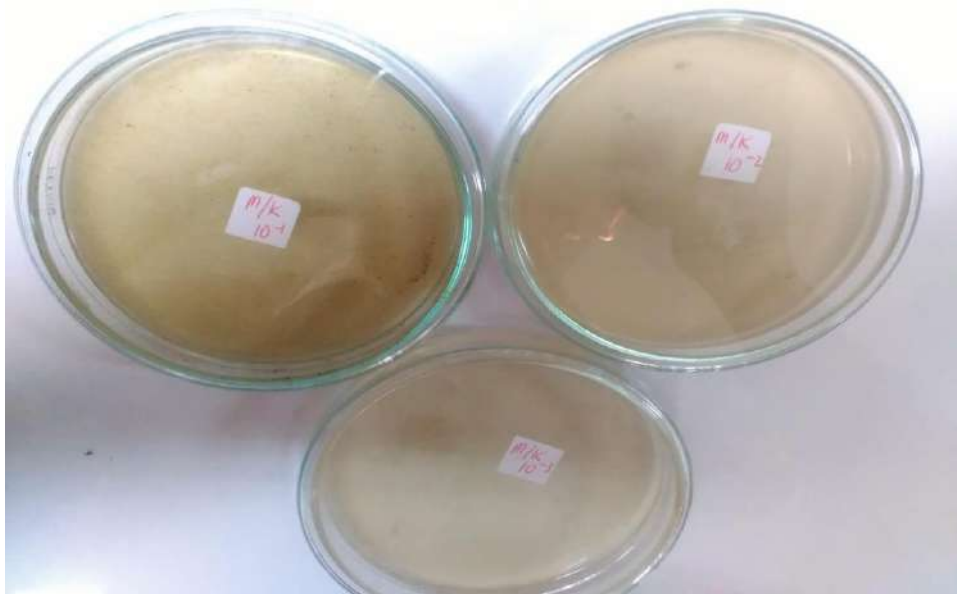
Pengujian kadar abu dilakukan dengan tujuan memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak.³⁴ Hasil pengujian pada ekstrak daun kelor (*Moringa*

oleifera Lam.) didapatkan bahwa kadar abu sebesar 5,61%. Hal ini menunjukkan bahwa kadar air dalam ekstrak daun kelor ini memenuhi persyaratan dalam literatur pustaka.

Penetapan kadar sari larut air dan etanol dilakukan dengan tujuan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa yang dapat tersari dengan pelarut air dan etanol dari suatu ekstrak simplisia.³⁴ dari hasil pengujian menunjukkan kadar sari larut air ekstrak daun kelor adalah 12,54%, sedangkan kadar sari larut etanol sebesar 50,21%. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah senyawa yang terlarut dalam etanol lebih besar daripada jumlah senyawa yang terlarut dalam air. Hasil pengujian ini masih memenuhi syarat standar dalam literatur pustaka.

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal mengenai besarnya senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan.³⁴ dari hasil pengujian diperoleh bahwa nilai susut pengeringan sebesar 8,48%. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah senyawa yang hilang (menguap) pada saat proses pengeringan adalah 8,48%.

Hasil pengujian mutu ekstrak daun kelor didapatkan hasil bahwa cemaran logam Pb tidak sesuai dengan persyaratan yang berlaku di Farmakope Herbal Indonesia. Penelitian lain menunjukkan bahwa adanya beberapa logam berat dapat mempengaruhi penghambatan enzim asetilkolinesterase, dari hasil penelitian tersebut dijelaskan bahwa logam berat Cu^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , dan Zn^{+2} cenderung bereaksi dengan gugus tiol yang terdapat pada tiokolin dan memberikan peningkatan reaktivitas dengan tiokolin dan 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB).



Gambar V.2. Hasil pengujian angka kapang khamir ekstrak daun kelor

Pengujian angka kapang khamir dilakukan dengan tujuan agar memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung cemaran jamur melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan aflatoksin yang berbahaya bagi kesehatan.³⁴ pada ekstrak daun kelor didapatkan hasil bahwa pada pengujian ini tidak terjadinya pertumbuhan kapang khamir pada ekstrak pegagan dengan konsentrasi 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} .

E. PENGUJIAN AKTIVITAS PENGHAMBATAN AChE OLEH EKSTRAK HERBA PEGAGAN, EKSTRAK DAUN KELOR, DAN KOMBINASI.

Pengujian aktivitas penghambatan asetilkolinesterase dilakukan dengan menggunakan *microplate*. Pengujian aktivitas penghambatan ini dilakukan oleh ekstrak etanol 96%. Hasil uji aktivitas penghambatan AChE oleh kombinasi ekstrak ditunjukkan pada tabel V.8 di bawah ini:

Tabel V.8. hasil pengujian aktivitas penghambatan AChE

No	Sampel Uji	Persamaan Regresi	Nilai IC ₅₀
1	Eserin	$y = 5.0196x + 24.851$	5.010 ppm
2	Ekstrak Etanol Pegagan	$y = 0.0146x + 20.631$	2011.575 ppm
3	Ekstrak Etanol Daun Kelor	$y = 0.0443x + 13.685$	819.7517 ppm
4	Kombinasi ekstrak 1:1	$y = 0.0568x + 37.641$	217.588 ppm
5	Kombinasi ekstrak 1:2	$y = 0.0288x + 5.9241$	1530.4 ppm
6	Kombinasi ekstrak 1:3	$y = 0.0376x + 10.882$	1040.372 ppm
7	Kombinasi ekstrak 2:1	$y = 0.0111x + 27.496$	2027.387 ppm

Nilai IC₅₀ merupakan satuan standar yang dipergunakan untuk menentukan suatu ekstrak yang dapat dijadikan sebagai obat Alzheimer berdasarkan aktivitasnya. Pada penelitian ini ekstrak yang dipilih untuk pengobatan penyakit Alzheimer adalah ekstrak kombinasi herba pegagan dan daun kelor dengan perbandingan 1:1 karena pada ekstrak etanol ini mempunyai IC₅₀ yang paling rendah dibandingkan dengan ekstrak etanol kombinasi yang lain. Nilai IC₅₀ dari ekstrak kombinasi 1:1 ini masih jauh dari nilai IC₅₀ kontrol positifnya yaitu Eserin.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Hasil dari penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Hasil determinasi simplisia yang digunakan adalah herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) dan daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.).
2. Hasil identitas fisika kimia dari ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* Linn.) meliputi pengujian kadar air sebesar 14,65%, kadar abu 27,35%, kadar sari larut air 26,56%, kadar sari larut etanol 40,56%, kadar asiatikosida 1,99%, kadar susut pengeringan 14,28%, uji cemaran logam berat Pb 12,55 ppm, Cd, Hg, dan As yang tidak terdeteksi, dan tidak adanya pertumbuhan kapang dan khamir pada pengujian angka kapang khamir dengan perbandingan 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} .

Hasil identitas fisika kimia dari ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) meliputi pengujian kadar air sebesar 8,08%, kadar abu 5,61%, kadar sari larut air 12,54%, kadar sari larut etanol 50,21%, kadar susut pengeringan 8,48%, uji cemaran logam berat Pb 24,80 ppm, sedangkan Cd, Hg, dan As yang tidak terdeteksi. Tidak adanya pertumbuhan kapang dan khamir pada pengujian angka kapang khamir dengan perbandingan 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} .

3. Kombinasi ekstrak etanol 96% pegagan dan daun kelor 1:1 didapatkan hasil aktivitas penghambatan asetilkolinesterase dengan IC_{50} yaitu sebesar 217,588 ppm dibandingkan dengan kontrol positif yaitu *eserin* sebesar 5,010 ppm.

B. SARAN

Perlu dilakukan pengujian ekstrak pegagan dan ekstrak daun kelor dari lokasi yang diambil untuk diujikan agar mendapatkan nilai parameter spesifik dan non spesifik serta nilai IC_{50} yang terbaik untuk penghambatan asetilkolinesterase (AChE).

DAFTAR PUSTAKA

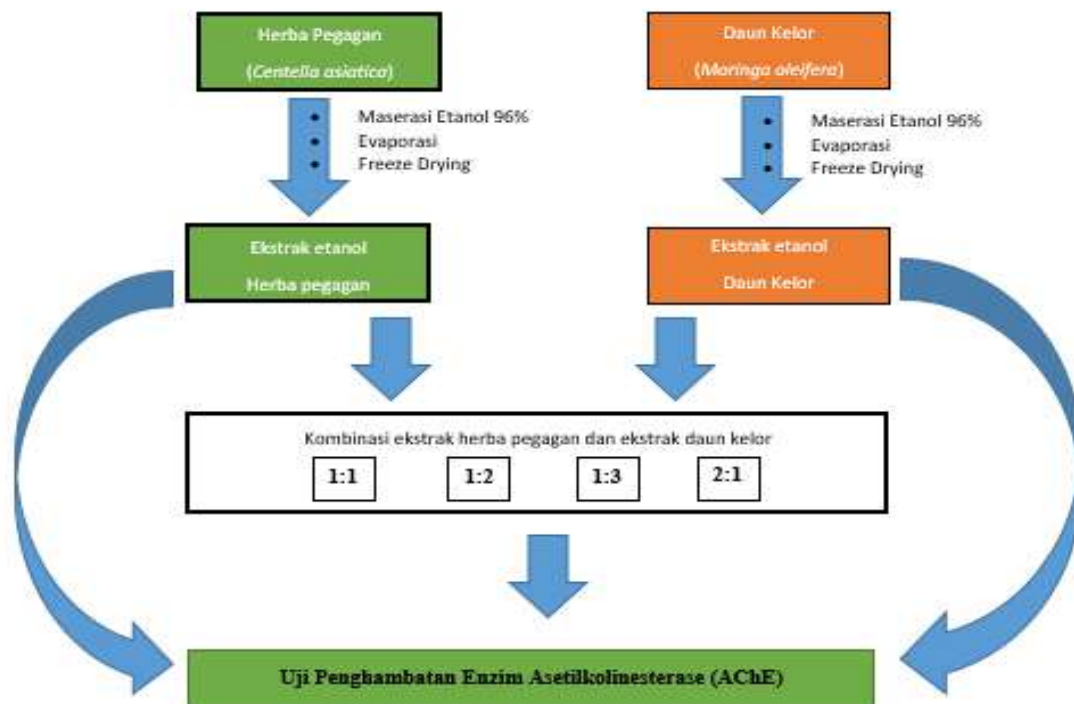
1. Chiroma SM, Baharuldin MTH, Taib CNM, Amom Z, Jagadeesan S, Adenan MI. *Centella asiatica* Protects d-Galactose/ AlCl_3 Mediated Alzheimer's Disease-Like Rats via PP2A/GSK-3 β Signaling Pathway in Their Hippocampus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20: 1871.
2. Chien LC, Wen HT, Chun JC, Tzu MP. *Centella asiatica* extract protects against amyloid β 1e40-induced neurotoxicity in neuronal cells by activating the antioxidative defence system. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2016; 6: 362-369.
3. Jeon SG, Song EJ, Lee D, Park J, Nam Y, Kim JI. Traditional Oriental Medicines and Alzheimer Disease. *Aging and Disease Journal*. April 2019; 10(2): 307-328.
4. Zhi KS, Hong QY, Sheng DC. Traditional Chinese medicine: a promising candidate for the treatment of Alzheimer's disease. *Translational neurodegeneration Journal*. 2013; 2(6): 1-7.
5. Lisiswanti R, Fiskasari SR. Manfaat pegagan (*Centella asiatica*) terhadap pengobatan penyakit Alzheimer. *Medical Journal of Lampung University*. Maret 2017; 6(2): 133.
6. Rahminiwati M, Darusman LK. The determination of asiaticoside content and screening of acetylcholinesterase inhibitory potency of gotucola (*centella asiatica*) harvested from different location. Dalam: International Seminar and Expo on Jamu. Bandung: Fakultas Biofarmaka Institut Pertanian Bogor; 2010, 105-110.
7. Razak MY, Salissou MTM, Yuman W, Liu R. *Moringa oleifera* alleviates homocysteine induced alzheimer disease like pathology and cognitive impairments. *Journal of Alzheimer disease*. April 2018; 63(3): 1-20.
8. Sutardi, S. Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 2017; 35: 121.

9. Zulkarnaen P, Alifia, EO. Penetapan Kadar Asiatikosida Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) menggunakan Metode LC – MS. Jurnal Ilmu Farmasi. 2009; 1: 99–107.
10. James J, Dubery IA. Identification and qualification of triterpenoid centelloids in *Centella asiatica* (L.) urban by densitometric TLC. Journal of Planar Chromatography. 2011; 24 (1):82-87.
11. Mustika A, Indrawati R. Standarisasi Ekstrak Etanol *Centella asiatica* dengan Identifikasi Kandungan Asiaticoside, Asiatic acid dan Madecasic acid. Dalam: Annual Scientific Meeting 2015. Yogyakarta: Universitas Airlangga; 2015, 36-43.
12. Singh S, Gautam A, Sharma A, Batra A. *Centella asiatica* L. a plant with immense medicinal potential but threatened. International journal of pharmaceutical sciences review and research. 2010; 4(2): 9-17.
13. Gray NE, Zweig JA, Murchison C. *Centella asiatica* attenuates Abeta-induced neurodegenerative spine loss and dendritic simplification. Neurosci Lett. 2017; 646: 24-29.
14. Soumyanath A, Zhong YP, Henson E. *Centella asiatica* Extract Improves Behavioral Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease: Investigation of a Possible Mechanism of Action. Int J Alzheimers Dis. 2012; 38: 19-74.
15. Prakash A, Kumar A. Mitoprotective effect of *Centella asiatica* against aluminum-induced neurotoxicity in rats: possible relevance to its anti-oxidant and anti-apoptosis mechanism. Journal of Neurological Science. 2013; 34: 1403-1409.
16. Mashoque AR, Arokiasamy JT, Manivasagam T. Asiatic acid nullified aluminium toxicity in in vitro model of Alzheimer's disease. Frontiers in Bioscience (Elite Ed). 2018; 10: 287-299.
17. Orhan IE. *Centella asiatica* (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. Hindawi Publishing Corporation. 2012; 2: 1-8

18. Kumalo, HM, Soliman ME. A Comparative Molecular Dynamics Study on BACE1 and BACE2 Flexibility. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2016; 36(5):505- 514.
19. Mawaddani N, Wibowo NRK, Nadhira QHH, Pramifta RA. Study of *Centella asiatica* Active Compound as BACE1 Inhibitor in Alzheimer's Disease. *Journal of Smart Bioprospecting and Technology*. April 2020; 1(2): 36-40.
20. Hemamalini, Rao MS. Anti stress effect of *Centella asiatica* leaf extract on hippocampal neurons. *International Journal of Pharmacology and Clinical Sciences*. 2013; 2(1): 25-32.
21. Deshpande PO, Mohan V, Thakurdesai P. Preclinical safety assesment of standardized extract of *Centella asiatica* (L.) Urban leaves. *Journal toxicology int*. 2015; 22(1): 10-20.
22. Aminah S, Ramdhan T, Yanis M. kandungan nutrisi dan sifat fungsional tanaman kelor (*Moringa oleifera* L.). *jurnal buletin pertanian perkotaan*. 2015; 5(2): 35-44.
23. Krisnadi D. Kelor Super Nutrisi. 1st ed. Blora: Pusat Informasi dan Pengembangan Tanaman Kelor Indonesia. 2012, h 1-126.
24. Chivapat S, Sincharoenpokai P, Saktiyasuthorn N, Shuaprom A, thongsrirak P, Sakpetch A. Acute and Chronic Toxicity of *Moringa oleifera* Linn Leaves Extracts. *Journal of Thai Veterinary Medicine*. 2011; 41(4): 417-424.
25. Kitphati W, Wattanakamolkul K, Lomarat P, Phanthong P, Anantachoke N, Nukoolkam. Anticholinesterase of essential oil and their constituents from Thai medicinal plants purified and selular enzymes. *Journal of Asian Association of Schools of Pharmacy*. 2012; 1: 58 – 60.
26. Wollen K.A. Alzheimer disease: The pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Journal of Alternative Medicine*. 2010; 15(3): 223 – 224.
27. Shakil S, Khan R, Tabrez S, Alam Q, Jabir NR, Sulaiman Mi. interaction of human acetylcholinesterase with cyclophosphamide; a molecular modeling and

- docking study, *CNS & Neurological Disorders Drug Targeting*, 2011; 10(7): 845-848.
28. Aisen PS, Cummings J, Schneider LS. Symptomatic and nonamyloid/tau based pharmacologic treatment for alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012; 2(3): 1-21.
 29. Ali R, Sheikh I, Jabir NR, Kamal, MA. Comparative Review of Decade's and Neuroregeneration. 2012; 4(2): 136-44.
 30. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase inhibitor activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961; 7 :88-95.
 31. Jusril NA, Suhari AN, Bakar SIA, Saad WN, Adenan MI. Combining in silico and in vitro studies to evaluate the acetylcholinesterase inhibitory profile of different accessions and the biomarker triterpenes of *Centella asiatica*. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Journal*. 2020; 25(15): 3353.
 32. Nwidu LL, Elmorsy E, Aprioku JS, Siminialayi I, Carter WG. In vitro anticholinesterase and antioxidant activity of extracts of *Moringa oleifera* plants from River State, Niger Delta, Nigeria. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Journal*. Juli 2018; 5: 71.
 33. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Materia Medika Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1995.
 34. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Parameter Standarisasi Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2000.

LAMPIRAN 1. SKEMA PENELITIAN



LAMPIRAN 2. DETERMINASI HERBA PEGAGAN



KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL
Jalan Raya Lawu No. 11 Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah 57792
Telepon : (0271) 697010 Faksimile : (0271) 697451
Surat Elektronik b2p2to2t@gmail.com / b2p2to2t@litbang.depkes.go.id
Laman www.b2p2to2t.litbang.kemkes.go.id

Nomor : YK.01.03/2/ 281 /2020
Hal : Keterangan Determinasi

9 Januari 2020

Yth. Ketua Program Magister Ilmu Kefarmasian
Universitas Pancasila
Srengseng Sawah, Jagakarsa
Jakarta 12640

Merujuk surat Saudara nomor: 489/Mag/UP/IX/2019 tanggal 11 September 2019 hal permohonan determinasi, dengan ini kami sampaikan bahwa hasil determinasi sampel tanaman sebagai berikut:

Nama Sampel	: Pegagan
Sampel	: Simplisia
Spesies	: <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.
Sinonim	: <i>Centella hirtella</i> Nannf.; <i>Glyceria asiatica</i> Nutt.; <i>Chondrocarpus triflorus</i> Nutt.
Familia	: Apiaceae
Nama Pemohon	: Yonathan Tri Atmodjo Reubun
Penanggung Jawab Identifikasi	: Nur Rahmawati Wijaya, S.Si.

Hasil determinasi tersebut hanya mencakup sampel tumbuhan yang telah dikirimkan ke B2P2TOOT.

Atas perhatian Saudara, kami sampaikan terima kasih.

Kepala Balai Besar Litbang
Tanaman Obat dan Obat Tradisional,


Akhmad Saikhu, MSc.PH.
NIP.196805251992031004

LAMPIRAN 3. DETERMINASI DAUN KELOR



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)
Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911
Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612
Website : www.biologi.lipi.go.id



Cibinong, 12 September 2019

Nomor : 4694/LIPI.L.01/II.07/IX/2019
Lampiran :
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth,
Bpk. / Ibu / Sdr(i). **Yonathan Tri Atmojo Reubun**
NPM : 5418220047
Mhs. Univ. Pancasila
Program Magister Ilmu Kefarmasian
Srengseng Sawah, Jagakarsa
Jakarta - 12640.

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Pegagan	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Apiaceae
2	Kelor	<i>Moringa oleifera</i> Lam.	Moringaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,



Dr. Irena Setiyo Rahajoe
NIP. 196706241993032004

LAMPIRAN 4. CERTIFICATE OF ANALYSIS ETHANOL 96%

PT. INDO ACIDATAMA Tbk.

CERTIFICATE OF ANALYSIS

No : 1948/OQA/IA/07/19
 Subject : ETHANOL INDO ACIDATAMA Tbk. PT.
 ETHANOL NEUTRAL
 Date Received : 30-07-2019
 Date Of Testing : 30-07-2019
 Tested For : FULL ANALYSIS
 Description Of Sample : 1 BOTTLE 500 ml
 LOT. No : 30071903K01, MANUF.29.07.2019 EXP.30.07.2022 ✓

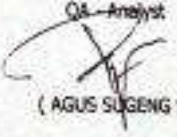
This sample was analysed in our QA Analytical laboratory and the following results were obtained

No	PARAMETER	DIMENTION	TEST METHOD	RESULT	SPECIFICATION
1	Purity	% v/v	Alcoholmeter 20 °C	96.2	Min 95.0
2	Potassiumate Test Time 20 °C	Minute	ASTM D-1363	31	Min 20
3	Aldehyde	ppm	Gas Chrom	nd	Max. 4
4	Methanol	ppm	Gas Chrom	nd	Max. 8
5	Acidity as Acetic Acid	ppm	ASTM D - 1613	5	Max 20
6	Residue After Evaporation	ppm	ASTM D - 1353	1	Max 20
7	Specific Gravity at 20/20 °C	-	ASTM D-891	0.80814	Max 0.810
8	n-propanol	ppm	Gas Chrom	nd	Max. 5
9	Iso Amyl Alcohol	ppm	Gas Chrom	nd	Max. 5
10	Iso Butanol	ppm	Gas Chrom	nd	Max. 5
11	Appearance	-	VISUAL	clear	Clear
12	N-butanol	ppm	Gas Chrom	nd	Max. 5

Store (Temperature) : Store at 20 °C to 35 °C

Surekarta, 30 Juli 2019


 (ANIK SULISTIQWATI, SSI)
 Head Of Laboratory


 (AGUS SUGENG S)
 Qs-Analyst

Head Office :
 Gedung Kencana Sulo 5-A
 Jl. Raya Parungpan No. 88 Jakarta 11535, Indonesia
 Phone : (82-21) 53860777
 Fax : (82-21) 53860998

Factory :
 Jl. Raya Solo - Sragen Km. 11.4 Kemiri Kebekkramat,
 Karanganyar 57762, Surekarta, Indonesia
 Phone : (82-271) 648400 (hunting) Fax : (82-271) 648700
 Mail : P.O. Box 302, Surekarta 57100 Indonesia
 E-mail : acidatama@acidatama.co.id

LAMPIRAN 5. HASIL ANALISIS SIMPLISIA DAUN KELOR



PT. SARASWANTI INDO GENETECH
The First Indonesian Molecular Biotechnology Company

GRAHA SIG 2, Resonansi No. 20 Taman Yustin Bogor 16113, INDONESIA.
Phone: +62-251-7532148 (during) - 662 111 510 515, Fax: +62-251-7546 927, <http://www.siglaboratory.com>

No. 28.1/F-PP/SMM-SIG
Revisi 3

Result of Analysis
No: SIG.LHP.VIII.2016.44707

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
1.	Energi total	kcal / 100 g	377.33	-	Calculation
2.	Energi dari lemak	kcal / 100 g	80.73	-	Calculation
3.	Kadar air	%	6.95	-	SNI 01-2891-1992 butir 5.1
4.	Kadar abu	%	10.03	-	SNI 01-2891-1992 butir 6.1
5.	Lemak total	%	8.97	-	SNI 01-2891-1992 butir 8.2
6.	Protein	%	24.38	-	18-8-31/MU/SMM-SIG, Kjeltac
7.	Karbohidrat total	%	49.77	-	18-8-9/MU/SMM-SIG
8.	Polifenol	%	2.14	-	SNI 3143 2011 butir A.3
9.	EGCG	%	2.05	-	18-5-41/MU/SMM-SIG, HPLC
10.	Serat pangan	%	38.02	-	18-8-6-2/MU/SMM-SIG
11.	Vitamin A	mcg / 100 g	926.42	-	18-5-1/MU/SMM-SIG, HPLC
12.	Vitamin D	mcg / 100 g	Not detected	0.67	18-5-1/MU/SMM-SIG, HPLC
13.	Vitamin E	mg / 100 g	210.00	-	18-5-1/MU/SMM-SIG, HPLC
14.	Vitamin C	mg / 100 g	Not detected	0.16	18-5-2/MU/SMM-SIG, HPLC
15.	Vitamin K	mcg / 100 g	19.23	-	18-5-1/MU/SMM-SIG, HPLC
16.	Vitamin B12	mcg / 100 g	1.45	-	18-12-6/MU/SMM-SIG, LC MSMS
17.	Vitamin B1	ppm	Not detected	0.52	18-5-2/MU/SMM-SIG, HPLC
18.	Vitamin B2	ppm	Not detected	0.35	18-5-2/MU/SMM-SIG, HPLC
19.	Vitamin B3	ppm	Not detected	0.03	18-5-2/MU/SMM-SIG, HPLC
20.	Vitamin B5	ppm	Not detected	0.7	18-5-2/MU/SMM-SIG, HPLC
21.	Vitamin B6	ppm	Not detected	0.61	18-5-2/MU/SMM-SIG, HPLC
22.	Vitamin B7	mcg / 100 g	27.84	-	18-5-7/MU/SMM-SIG, HPLC
23.	Vitamin B9	mcg / 100 g	Not detected	27	18-5-38/MU/SMM-SIG, HPLC
24.	Natrium	mg / 100 g	42.83	-	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP-OES
25.	Kalsium	mg / 100 g	2358.75	-	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP-OES
26.	Kalium	mg / 100 g	1799.97	-	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP-OES
27.	Magnesium	mg / 100 g	439.89	-	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP-OES
28.	Fosfor	ppm	2653.25	-	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP-OES
29.	Cu	ppm	4.49	-	18-4-1/MU/SMM-SIG, AAS
30.	Fe	ppm	110.60	-	18-4-1/MU/SMM-SIG, AAS
31.	Zn	ppm	19.37	-	18-4-1/MU/SMM-SIG, AAS
32.	Mn	ppm	65.08	-	18-4-1/MU/SMM-SIG, AAS
33.	Cr	ppb	245.53	-	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP-OES

Bogor, August 11, 2016
PT Saraswanti Indo/Genetech



Dwi Yulianto Laksono, S.Si
Manager Laboratorium



PT. SARASWANTI INDO GENETECH

The First Indonesian Molecular Biotechnology Company

GRANA SIG Jl. Sasamala No. 35 Taman Yamin Bogor 16113, INDONESIA
Phone: +62-251-7532348 (tunting) - 082 111 516 516 Fax: +62-251-7540 927, <http://www.siglaboratory.com>

No. 28.1/F-PP/SMM-SIG

Revisi 3

Result of Analysis

No: SIG.LHP.I.2019.000315

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
1	Calcium	mg / 100 g	2250.83	-	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP OES
2	Potassium	mg / 100 g	2041.86	-	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP OES
3	Beta carotene	mg / kg	0.59	-	18-5-40/MU/SMM-SIG, HPLC

Bogor, January 02, 2019

PT Saraswanti Indo Genetech



Dwi Yulianto Laksono, S.Si

Laboratory Manager



PT. SARASWANTI INDO GENETECH

The First Indonesian Molecular Biotechnology Company

GRANA SIG 8, Rasmala No. 20 Taman Yasmin Super 16115, INDONESIA
Phone: +62-251-7532548 (marketing) - 082 111 516 518; Fax: +62-251-7543 937; <http://www.sigbiotech.com>

No. 28, 1/F-PP/SMM-SIG
Revisi 3

Result of Analysis

No: SIG.LHP.I.2019.000313

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
1	L-Serine	mg / kg	15455.29	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
2	L-Glutamic acid	mg / kg	35284.69	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
3	L-Phenylalanine	mg / kg	20237.27	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
4	L-Isoleucine	mg / kg	12255.13	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
5	L-Valine	mg / kg	15940.35	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
6	L-Alanine	mg / kg	15567.93	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
7	L-Arginine	mg / kg	18959.74	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
8	Glycine	mg / kg	15201.06	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
9	L-Lysine	mg / kg	12996.66	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
10	L-Aspartic Acid	mg / kg	23767.69	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC



PT. SARASWANTI INDO GENETECH

The First Indonesian Molecular Biotechnology Company

OSAMA SIG A. Rosanata No. 28 Taman Yustin Bogor 16115, INDONESIA
Phone: +62-251-7532548 (Pusat) - 082 111 516 516 Fax: +62-251-7543 827 <http://www.sigbiotech.com>

No. 28.1/F-PP/SMM-SIG
Revisi 3

Result of Analysis

No: SIG.LHP.I.2019.000313

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
11	L-Leucine	mg / kg	22867.17	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
12	L-Tyrosine	mg / kg	10543.19	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
13	L-Proline	mg / kg	13317.38	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
14	L-Threonine	mg / kg	13886.98	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
15	L-Histidine	mg / kg	7401.62	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
16	L-Cystine	mg / kg	542.76	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
17	L-Methionine	mg / kg	2274.28	-	18-5-17/MU/SMM-SIG, UPLC
18	L-Tryptophan	mg / kg	4595.20	-	18-5-63/MU/SMM-SIG, HPLC

Bogor, January 02, 2019
PT Saraswanti Indo Genetech



Dwi Yulianto Laksono, S.Si
Laboratory Manager



PT. SARASWANTI INDO GENETECH

The First Indonesian Molecular Biotechnology Company

GRAHA SIG II, Pasarmala No. 20 Taman Yasmin Bogor 15113, INDONESIA.
Phone: +62-251-7532348 (Hunting) - 082 111 516 516. Fax: +62-251-7540 927. <http://www.siglaboratory.com>

No. 28.1/F-PP/SMM-SIG
Revisi 3

Result of Analysis

No: SIG.LHP.I.2019.000314

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
1	Hg	mg / kg	Not detected	0.004	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP OES
2	Cd	mg / kg	Not detected	0.00011	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP OES
3	As	mg / kg	Not detected	0.008	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP OES
4	Sn	mg / kg	Not detected	0.45	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP OES
5	Pb	mg / kg	Not detected	0.009	18-13-1/MU/SMM-SIG, ICP OES

Bogor, January 02, 2019
PT Saraswanti Indo Genetech



Dwi Yulianto Laksono, S.Si
Laboratory Manager

LAMPIRAN 6. HASIL PENGUJIAN EKSTRAK HERBA PEGAGAN



Kementerian Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
 Jalan Tereos Pegagan No. 1 Komplek Penelitian Pertanian Citarangsa, Bogor 16131
 Telpone : (0251) 8024879 Faxsimile : (0251) 8025930 E-mail : lab@brro.bptp.go.id

DF 5.10.1.2

SERTIFIKAT PENGUJIAN
CERTIFICATE OF ANALYSIS
No. Adm : 2167/LAB/020

Kepada Yth
 Yonathan Tri Atmodjo Resbun
 Universitas Pancasila

Kondisi / Identifikasi Contoh : Ekstrak
 Tanggal Penerimaan : 16 Maret 2020
 Tanggal Pengujian : 22 April – 12 Juni 2020

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian / Pemeriksaan	Hasil Pengujian / Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Ekstrak Etanol 96% Herba Pegagan	- Sari Air (%)	26,56	Gravimetri
		- Sari Alkohol (%)	40,56	Gravimetri
		- Asiatikosida (%)	1,99	TLC Scanner
		Uji Fitokimia :		Kualitatif
		- Alkaloid	+	
		- Saponin	+	
		- Tanin	+	
		- Fenolik	+	
		- Flavonoid	+	
		- Glikosida	+	
		- Triterpenoid	+	
		- Steroid	+	

Bogor, 18 Juni 2020
 Manajer Teknis

Hikmat Muhrana, S.Si

Laporan hasil uji ini berlaku selama 90 hari sejak diterbitkan. Surat ini harusnya juga menunjukkan nomor penerimaan.
 Hasil Pengujian ini di atas hanya berdasarkan contoh uji yang bersangkutan. Laporan ini dianggap dipertanggungjawabkan sesuai dengan peraturan yang berlaku.
 Laboratorium Penelitian / Balitro

[Lampiran tidak terlampirkan]



Laboratorium Tanah, Tanaman, Pupuk, Air

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN



Laboratorium Penguji BALAI PENELITIAN TANAMAN REMPAH DAN OBAT

Jl. Terowong Petak No.2, Kampus Penelitian Pertanian, Caringin, Bogor 16131

Telp. (0251) 8323879 Fax. (0251) 8327010 e-mail: baltan@peltan.net

SERTIFIKAT PENGUJIAN

CERTIFICATE OF ANALYSIS

No. Adm: 216/T/LAB/20

Kepada Yth
Yonathan Tri Atmodjo
Universitas Pancasila

Kondisi / Identifikasi Contoh : Ekstrak
Tanggal Penyerahan : 16 Maret 2020
Tanggal Pengujian : 6 April - 5 Mei 2020

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian / Pemeriksaan	Hasil Pengujian / Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Ekstrak Etanol 95%	- Pb (ppm)	12,55	AAS
	Herba Pegagan	- Cd (ppm)	TTD	AAS

Ket: TTD= tidak terdeteksi

Bogor, 6 Mei 2020
Manajer Teknis

Ir. Octavia Trisilawati, M.Sc

Laporan hasil uji ini berlaku selama 90 hari sejak diterbitkan. Untuk memvalidasi hasil pemeriksaan contoh administrasi:
- Hasil Pengujian / di atas hanya berdasarkan contoh uji yang bersangkutan. Laporan ini dianggap dipertanggungjawabkan oleh penanggung jawab dari
- Laboratorium / Balai Penelitian Pertanian

Laporan ini disimpan oleh Manajer Administrasi



PT. SARASWANTI INDO GENETECH

The First Indonesian Molecular Biotechnology Company

GRAMA SIG 8, Kawasan Industri 20 Liris Puri, Bogor 16113, INDONESIA.
Phone: +62 251 7552346 (mainline), 082 111 535 535, Fax: +62 251 7546 927, <http://www.siglaboratory.com>

No. 28.1/F-PP/SMM-SIG
Revisi 3

Result of Analysis

No: SIG.LHP.VII.2020.066754

No	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
1	Hg	mg / kg	Not detected	0.004	18-13-1/MU/SMM-SIG (ICP OES)
2	As	mg / kg	Not detected	0.008	18-13-1/MU/SMM-SIG (ICP OES)
3	Susut Pengeringan	%	14.28	-	18-8-1/MU/SMM-SIG (Gravimetry)
4	Kadar Air	%	14.65	-	SNI 01-2891 - 1992, point 5 . 1
5	Kadar Abu	%	27.35	-	SNI 01-2891-1992, 8.1

Bogor, 10 July 2020
PT Saraswanti Indo Genetech



Dwi Yulianto Laksono, S.Si
Manager Laboratorium

Metode Acuan : Terlampir

[illegible]

*) Coret yang tidak perlu.

[illegible]

*) Coret yang tidak perlu

Metode Acuan : Terlampir

[illegible]

Perhitungan

$$Kadar Abu = \frac{C-A}{B} \times 100\%$$

$$\text{Kadar LOI (\%)} = \frac{(A + B) - C}{B} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Bobot wadah kosong (g)

B = Bobot sampel (g)

C = Bobot tetap wadah + sampel setelah pemi-

*) Coret yang tidak perlu

FORMULIR REKAMAN PENGUJIAN LOGAM



No. 15-13-11F-M/ISMA-SIG
Revisi : 0

Paraf Analis	Paraf Spv
<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>

$$\text{Kadar} = \frac{C \times \text{Vol} \times \text{FP}}{\text{Bobot sample}}$$

Metode Acuan Inductively Coupled Plasma
Tanggal Estimasi
Tanggal Analisis

Sampel	Matriks	Element	Bobot	Vol	FP	Intensitas	C larutan	satuan ukur	Kadar	satuan
006.P.685	Ekstrak	As	0.5044	50	1	15.1919	4.0314	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.685 d	Ekstrak	As	0.5042	50	1	11.7389	-1.7184	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.686	Ekstrak	As	0.5606	50	1	16.0257	5.4198	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.686 d	Ekstrak	As	0.5603	50	1	12.5546	-0.3601	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.687	Ekstrak	As	0.5009	50	1	16.2488	5.7914	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.687 d	Ekstrak	As	0.5003	50	1	8.1033	-7.7724	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.688	Ekstrak	As	0.5179	50	1	9.2635	-5.8403	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.688 d	Ekstrak	As	0.5176	50	1	21.0249	13.7446	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.689	Ekstrak	As	0.5005	50	1	14.8868	3.5234	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.689 d	Ekstrak	As	0.5003	50	1	16.5451	6.2848	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.685	Ekstrak	Hg	0.5044	50	1	15.5768	2.8663	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.685 d	Ekstrak	Hg	0.5042	50	1	12.8211	1.4597	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.686	Ekstrak	Hg	0.5606	50	1	13.27	1.6888	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.686 d	Ekstrak	Hg	0.5603	50	1	13.78	1.9492	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.687	Ekstrak	Hg	0.5009	50	1	15.215	2.6816	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.687 d	Ekstrak	Hg	0.5003	50	1	14.4103	2.2709	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.688	Ekstrak	Hg	0.5179	50	1	16.4471	3.3105	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.688 d	Ekstrak	Hg	0.5176	50	1	12.5801	1.3367	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.689	Ekstrak	Hg	0.5005	50	1	11.7042	0.8896	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.689 d	Ekstrak	Hg	0.5003	50	1	6.5781	-1.7269	ppb	Not detected	mg / kg

LAMPIRAN 7. HASIL PENGUJIAN EKSTRAK DAUN KELOR



Kementerian Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Setiabudi No. 7 Komplek Penelitian Pertanian Cendekia, Bogor - 16131
 Telpom : (0251) 9523479 (Pusat) : (0251) 8117000 Email : lab@brt.pertanian.go.id

SERTIFIKAT PENGUJIAN
CERTIFICATE OF ANALYSIS
No. Agm. 315/LAB/2020

DF 5.10.1.2

Kepada Yth:
 Yonathan Tri Atmodjo
 Universitas Pancasila

Kondisi / Identifikasi Contoh : Ekstrak
 Tanggal Penerimaan : 18 Maret 2020
 Tanggal Pengujian : 22 April – 12 Juni 2020

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian / Pemeriksaan	Hasil Pengujian / Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Ekstrak Etanol 90% Daun Kelor	- Sari Air (%) - Sari Alkohol (%) - Flavonoid sebagai Quercetin (%) - Tannin (%) Uji Fitokimia : - Alkaloid - Saponin - Tanin - Fenolik - Flavonoid - Glikosida - Terpenoid - Steroid	12,54 50,21 4,85 5,75 + + + + + + + +	Gravimetri Gravimetri Spektrofotometri Spektrofotometri Kualitatif

Bogor, 18 Juni 2020
 Manajer Teknis

Hikmah Mulyana, S.Si

1. Lembar Hasil uji/analisis ini berlaku sebagai dokumen. Sifatnya merupakan dokumen resmi pemerintah.
 Hasil Pengujian / Analisis harus disampaikan kepada pihak yang bersangkutan. Laporan ini tidak dapat dipertanggungjawabkan kecuali ada penyetoran tertulis dari Laboratorium, Pengujian / Analisis.

☐ **LABORATORIUM PENELITIAN TANAMAN REMPAH DAN OBAT**



Laboratorium Tanah, Tanaman, Pupuk, Air

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN



Laboratorium Penguji BALAI PENELITIAN TANAMAN REMPAH DAN OBAT

Jl. Tirta Widyadarmas No. 3, Kampus Penelitian Pertanian, Cileungsi, Bogor 16113
Telp. (0251) 8321879 Fax. (0251) 8321030 e-mail: buktirel@tokomart

SERTIFIKAT PENGUJIAN

CERTIFICATE OF ANALYSIS

No. Adm.: 219/TA.AB/0020

Kelada Ym
Yonathan Tri Kemedjo
Universitas Pancasila

Kondisi / Identifikasi Contoh : Ekstrak
Tanggal Pengetahuan : 16 Maret 2020
Tanggal Pengujian : 6 April - 5 Mei 2020

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian / Pemeriksaan	Hasil Pengujian / Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Ekstrak Etanol 95%	- Pb (ppm)	24,80	AAS
	Daun Kelor	- Cd (ppm)	TTD	AAS

Ket: TTD= tidak terdeteksi

Bogor, 6 Mei 2020
Manajer Teknis

E. Octavia Triandani, M.Sc.

Laporan hasil uji ini berlaku selama 30 hari sejak diterbitkan. Untuk keperluan agar tidak terdapat kecurangan dalam proses pengujian, maka hasil pengujian ini akan terdapat tanda tangan dan stempel resmi dari Laboratorium Pengujian ini.

Untuk lebih jelasnya, lihat lampiran yang terdapat di bawah ini.



PT. SARASWANTI INDO GENETECH

The First Indonesian Molecular Biotechnology Company

GRANA SIG Jl. Peneleh No. 20 Tarkim Selatan Bogor 16113, INDONESIA
Phone: +62-251-7532348 (tuntang) - 882 111 516 518, Fax: +62-251-7540 937, <http://www.siglaboratory.com>

No. 28.1/F-PP/SMM-SIG
Revisi 3

Result of Analysis

No: SIG.LHP.VII.2020.066748

No.	Parameter	Unit	Result	Limit of Detection	Method
1	Ethyl alkohol	mg / kg	47604.00	-	18-6-4/MU/SMM-SIG (GC Head space)
2	Hg	mg / kg	Not detected	0.004	18-13-1/MU/SMM-SIG (ICP OES)
3	As	mg / kg	Not detected	0.008	18-13-1/MU/SMM-SIG (ICP OES)
4	Susut Pengerinan	%	8.48	-	SNI 3140.3 2010 point 7.6
5	Kadar Air	%	8.08	-	SNI 01-2891 - 1992, point 5.1
6	Kadar Abu	%	5.61	-	SNI 01-2891-1992, 6.1

Bogor, 10 Juli 2020
PT Saraswanti Indo Genetech

Dwi Yulianto Laksono, S.Si
Manager Laboratorium



FORMULIR REKAMAN PENGUJIAN LOGAM

No.18-13-1.1F.AM/ISML-SIG
Revisi : 0

Paraf Analis	Paraf Spv

Kadar	=	C x Vol x FP Bobot sample
-------	---	------------------------------

Inductively Coupled Plasma

Metode Acuan
Tanggal Estimasi
Tanggal Analisis

Sampel	Matriks	Element	Bobot	Vol	FP	Intensitas	C larutan	satuan ukur	Kadar	satuan
006.P.685	Ekstrak	As	0.5044	50	1	15.1919	4.0314	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.685 d	Ekstrak	As	0.5042	50	1	11.7389	-1.7184	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.686	Ekstrak	As	0.5606	50	1	16.0257	5.4198	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.686 d	Ekstrak	As	0.5603	50	1	12.5546	-0.3601	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.687	Ekstrak	As	0.5009	50	1	16.2488	5.7914	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.687 d	Ekstrak	As	0.5003	50	1	8.1033	-7.7724	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.688	Ekstrak	As	0.5179	50	1	9.2635	-5.8403	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.688 d	Ekstrak	As	0.5176	50	1	21.0249	13.7446	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.689	Ekstrak	As	0.5005	50	1	14.8868	3.5234	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.689 d	Ekstrak	As	0.5003	50	1	16.5451	6.2848	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.685	Ekstrak	Hg	0.5044	50	1	15.5768	2.8663	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.685 d	Ekstrak	Hg	0.5042	50	1	12.8211	1.4597	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.686	Ekstrak	Hg	0.5606	50	1	13.27	1.6888	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.686 d	Ekstrak	Hg	0.5603	50	1	13.78	1.9492	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.687	Ekstrak	Hg	0.5009	50	1	15.215	2.6816	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.687 d	Ekstrak	Hg	0.5003	50	1	14.4103	2.2709	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.688	Ekstrak	Hg	0.5179	50	1	16.4471	3.3105	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.688 d	Ekstrak	Hg	0.5176	50	1	12.5801	1.3367	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.689	Ekstrak	Hg	0.5005	50	1	11.7042	0.8896	ppb	Not detected	mg / kg
006.P.689 d	Ekstrak	Hg	0.5003	50	1	6.5781	-1.7269	ppb	Not detected	mg / kg

[illegible]

*^a) Coret yang tidak perlu

[illegible]

*) Coret yang tidak perlu

[illegible]
$$\text{Kadar Abu} = \frac{C - A}{B} \times 100\%$$

Keterangan :
A = Bobot wadah kosong (g)

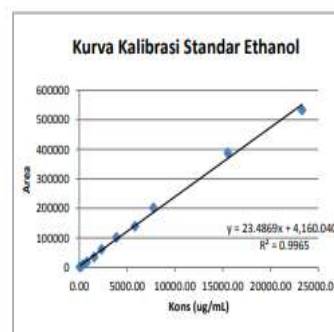
*) Coret yang tidak perlu

REKAMAN PENGUJIAN GC

Parameter Uji	: Residu Solvent
Metode Acuan	: IK No.18-6-4/MU/SMM-SIG
Analit	: Ethyl alkohol
Tanggal Pengujian	: 08 Juli 2020
% Standar	: 99.900 %
BJ Standar	: 0.789 g/mL
Konsentrasi standar induk	: 788211.00 mg/L
Volume pemipetan standar induk	: 0.985
Volume Labu	: 10.00
Konsentrasi standar max 1000xLOQ	: 77638.78 mg/L
Volume pemipetan standar induk	: 1.00 mL
Volume Labu	: 10.00 mL
Konsentrasi standar max 100xLOQ	: 7763.88 mg/L

Kurva 1

Volume Pemipetan Standar 1 (mL.)	Volume Labu Ukur 1 (mL.)	Kons. Standar (µg/mL.)	RT (Menit)	Luas Area Etanol
0.01	1	77.64	4.81	1723.92
0.02		155.28	4.75	3066.03
0.05		388.19	4.73	8763.3
0.1		776.39	4.72	18151.51
0.02		1552.78	4.7	35285.99
0.03		2329.16	4.71	61207.12
0.05		3881.94	4.7	101460.49
0.075		5822.91	4.75	139294.24
0.1		7763.88	4.69	201699.65
0.2		15527.76	4.69	387952.67
0.3		23291.64	4.69	533185.95
			Slope	23.4869
			Intercept	4160.0404
			R ²	0.9965
			R	0.9983



Sampel	Matriks	Bobot Sampel (g)/(mL)	FP	RT (Menit)	Luas Area Analit	Kons. Injeksi Sampel (µg)	Kadar Sampel (mg/kg)
Sampel Blank	DMF 50%	1.0000	1	0	0	0.00	0.00
006.P.685a	Ekstrak	0.5158	1	4.68	459745.04	19397.42	37606.47
006.P.685b	Ekstrak	0.5180	1	4.68	478944.92	20214.89	39024.88
006.P.687a	Ekstrak	0.5725	1	4.69	660189.90	27931.75	48789.08
006.P.687b	Ekstrak	0.5701	1	4.69	625703.75	26463.43	46418.93

LAMPIRAN 8. HASIL PENGUJIAN PENGHAMBATAN AChE

Konsentrasi sampel (ppm)	Abs	% penghambatan AChE				Persamaan regresi	R ²	IC ₅₀
		1	2	3	Σ			
Eserin								
31.250	0.747	68.76	68.76	68.76	68.76	y = 5.0196x + 24.851	0.8908	5.010
15.625	0.828	65.42	65.37	65.37	65.39			
7.813	0.953	60.65	59.69	60.06	60.13			
3.906	1.160	51.49	51.37	51.62	51.49			
1.953	1.469	38.57	39.41	37.78	38.58			
0.977	1.728	28.32	26.99	27.91	27.74			
0.488	1.858	23.56	22.51	20.80	22.29			
Herba Pegagan								
1000	1.957	22.64	15.90	15.90	18.15	y = 0.0443x + 13.685	0,9511	819.7517
500	1.800	27.11	22.72	24.39	24.74			
250	1.788	17.91	31.59	26.15	25.22			
125	1.963	10.97	26.53	16.20	17.90			
62,25	1.972	23.22	13.94	15.44	17.54			
31,25	2.045	14.27	14.06	15.07	14.47			
15,625	2.038	12.68	17.45	14.19	14.78			
Daun Kelor								
1000	1.584	35.35	33.43	32.46	33.75	y = 0.0146x + 20.631	0,7929	2011.575
500	1.695	30.46	28.41	28.49	29.12			
250	1.752	13.27	21.59	45.34	26.74			
125	1.778	25.36	26.11	25.44	25.63			
62,25	1.860	20.21	20.80	25.61	22.21			
31,25	1.919	16.78	18.96	23.56	19.77			
15,625	2.003	10.84	18.41	19.50	16.25			
Herba Pegagan : Daun Kelor (1:1)								
1000	1.252	46.06	49.36	47.52	47.64	y = 0.0568x + 37.641	0,865	217,588
500	1.073	50.15	55.55	59.69	55.13			
250	1.175	48.86	54.63	49.15	50.88			
125	1.300	52.87	34.39	49.69	45.65			
62.25	1.347	37.90	50.36	42.75	43.67			
31.25	1.432	35.39	43.67	41.29	40.12			
15.625	1.545	27.99	38.36	39.82	35.39			

Konsentrasi sampel (ppm)	Abs	% penghambatan AChE				Persamaan regresi	R ²	IC ₅₀
		1	2	3	Σ			
Herba Pegagan : Daun Kelor (1:2)								
1000	2.233	8.10	9.76	10.01	9.29	y = 0.0288x + 5.9241	0.879	1530.413
500	2.239	9.89	9.76	7.49	9.05			
250	2.146	12.00	11.84	14.60	12.81			
125	2.196	9.76	12.00	10.62	10.79			
62.25	2.299	6.27	6.76	6.76	6.60			
31.25	2.310	7.53	5.78	5.13	6.15			
15.625	2.283	6.68	7.57	7.45	7.23			
Herba Pegagan : Daun Kelor (1:3)								
1000	2.065	11.92	22.60	13.75	16.09	y = 0.0376x + 10.882	0,906	1040.372
500	1.680	28.58	24.39	42.23	31.73			
250	2.064	12.12	15.86	20.45	16.14			
125	2.097	13.62	14.92	15.82	14.79			
62.25	2.122	15.66	12.16	13.50	13.77			
31.25	2.127	8.34	12.85	19.52	13.57			
15.625	2.160	11.02	13.54	12.16	12.24			
Herba Pegagan : Daun Kelor (2:1)								
1000	1.738	39.42	39.22	41.58	40.07	y = 0.0111x + 27.496	0.8068	2027.387
500	1.698	27.19	30.40	30.57	29.39			
250	1.734	22.56	35.85	34.59	31.00			
125	1.750	30.36	27.76	30.57	29.56			
62.25	2.233	27.76	27.52	31.42	28.90			
31.25	2.333	8.67	4.81	14.40	9.29			
15.625	2.461	2.13	8.55	4.97	5.21			

LAMPIRAN 9: REGRESI LINIER PENGHAMBATAN AChE

