

## **Penghambatan Enzim Asetilkolinesterase Pada Penyakit Alzheimer Dari Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.)**

### **Inhibition of Acetylcholinesterase Enzymes in Alzheimer's Disease from Ethanolic Extract of Moringa Leaves (*Moringa oleifera* Lam.)**

Yonathan Tri Atmodjo Reubun<sup>1\*</sup>, Shirly Kumala<sup>1</sup>, Siswa Setyahadi<sup>2</sup>, Partomuan Simanjuntak<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila Jalan Raya Lenteng Agung, Jakarta.

<sup>2</sup> Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Serpong, Banten.

<sup>3</sup> Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, Jawa Barat

*e-mail: jonathanreubun90@gmail.com*

#### **INTISARI**

Daun kelor telah dikenal oleh masyarakat sebagai pengobatan. Salah satu penyakit tersebut adalah penyakit Alzheimer dimana cara kerja dari tanaman ini adalah dengan menghambat kerusakan yang terjadi di sistem saraf di otak. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan ekstrak etanol daun kelor dengan dilakukannya proses skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan kimia yang terkandung dalam tanaman tersebut.

Daun kelor yang diperoleh dilakukan proses grinding hingga di dapatkan serbuk simplisia. Setelah itu dilakukan ekstraksi dengan cara merendam daun kelor dengan etanol 96% selama 11 kali hingga di dapatkan ekstrak tersari sempurna. Setelah itu dilakukan pemekatan dengan *Rotary Evaporator* hingga di dapatkan ekstrak kental daun kelor. Setelah itu ekstrak kental dilanjutkan kembali proses *Freeze Drying* guna mendapatkan ekstrak kental yang stabil dan tahan dalam penyimpanan.

Setelah itu, ekstrak diujikan terhadap penghambatan enzim asetilkolinesterase berdasarkan metode Ellman didapatkan hasil  $IC_{50}$  ekstrak daun kelor sebesar 819.7517 ppm. Sementara itu, kontrol positif *eserin* dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 5,010 ppm. Kinetika penghambatan asetilkolinesterase adalah kompetitif. Sehingga dikatakan bahwa ekstrak *Moringa oleifera* mempunyai efek terhadap pengobatan penyakit alzheimer.

**Kata kunci:** Alzheimer; *Moringa oleifer*; asetilkolinesterase; Metode Ellman.

#### **ABSTRACT**

The public has recognized moringa leaves as a treatment. One such disease is Alzheimer's disease, where the way this plant works is to inhibit the damage that occurs in the brain's nervous system. This study aimed to obtain ethanol extract of Moringa leaves by carrying out a phytochemical screening process to determine the chemical content contained in these plants.

The moringa leaves obtained subjected to a grinding process to obtain simplicia powder. After that, the extraction is done by soaking the Moringa leaves with 96% ethanol 11 times until the extract is perfect. After that, the concentration is done with a Rotary Evaporator until you get a thick extract of Moringa leaves. After that, the thick extract is followed by the Freeze Drying process to get a thick extract that is stable and can hold in storage.

After that, the extract was tested against the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme based on the Ellman method. The  $IC_{50}$  yield of Moringa leaf extract was 819.7517 ppm. Meanwhile, Eserin positive control with an  $IC_{50}$  value of 5.010 ppm. Acetylcholinesterase inhibition kinetics were



competitive. So it is said that *Moringa oleifera* extract has an effect on the treatment of Alzheimer's disease.

**Keywords:** Alzheimer; *Moringa oleifera*; acetylcholinesterase; Ellman's Method.

## 1. PENDAHULUAN

Penyakit alzheimer adalah salah satu bagian dari penyakit demensia yang paling umum dan banyak terjadi. Dimana pada penyakit demensia merupakan sindrom yang ditandai dengan adanya gangguan fungsi otak seperti berkurangnya daya ingat seseorang, disorientasi, penurunan komprehensif, ketidakmampuan dalam hal menghitung, ketidakmampuan dalam berbicara, serta manifestasi lainnya (1). Penyakit Alzheimer merupakan salah satu akibat dari gangguan fungsi asetilkolin. Asetilkolinesterase (AChE) merupakan enzim yang berfungsi sebagai katalisator pada pemecahan asetilkolin (ACh) menjadi bentuk yang tidak aktif yaitu asetat dan kolin (2).

Terapi Alzheimer menggunakan beberapa obat sintesis yang dapat menghambat asetilkolinesterase seperti fisostigmin, donepezil, atau takrin. Obat ini diketahui masih memiliki efek samping seperti hepatotoksisitas, gangguan pada saluran pencernaan, serta harga yang cukup mahal. (2). Senyawa bioaktivitas antara lain vitamin, karotenoid, polifenol, asam fenolat, flavonoid, alkaloid, glukosinolat, isotiosianat, tanin dan saponin, dari berbagai bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kulit kayu, getah, bunga, buah-buahan, biji-bijian, dan tanah benih telah dilaporkan memiliki efek terhadap penyakit Alzheimer (3).

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 (10). Kelor menyediakan kombinasi yang kaya dan langka dari *zeatin*, *kuersetin*,  $\beta$ -sitosterol, *asam caffeoylquinic* dan *kaempferol* (14)

Pada penyakit alzheimer, daun kelor dilaporkan memiliki efek nootropik dengan meningkatkan peroksidasi lipid terdisregulasi yang diinduksi oleh kolkisin, pengurangan enzim glutathione, katalase, superoksida dismutase (SOD), asetilkolin, dan asetilkolinesterase (4)(5). Tanaman daun kelor yang mengandung senyawa kuersetin mampu menghambat enzim asetilkolinesterase yang merupakan penyebab utama dari terjadinya penyakit Alzheimer. Dalam studi toksisitas akut pemberian dosis kepada tikus dalam waktu 24 jam sebanyak 20g / kg tidak menyebabkan gejala toksisitas akut, lesi kotor dan kematian (15).

Pengeringan beku atau liofilisasi atau juga dikenal dengan freeze drying adalah suatu proses di mana air yang dibekukan untuk dihilangkan dari sampel, awalnya

proses ini diawali dengan proses sublimasi (pengeringan primer) dan kemudian dilanjutkan lagi dengan proses desorpsi (pengeringan sekunder).

Pengeringan beku adalah proses pengeringan di mana air disublimasikan dari sampel setelah dibekukan. Proses pengeringan ini berlaku untuk pembuatan obat-obatan dan proses biologi tertentu yang termolabil atau tidak stabil dalam larutan air untuk periode penyimpanan yang lama, tetapi yang stabil dalam kondisi kering (11).

Mekanisme ini berbeda dengan proses pengeringan biasa; dimana pengeringan biasa terjadi melalui mekanisme penguapan (evaporasi) yang biasanya terjadi pada suhu tinggi. Perbedaan antara proses pengeringan beku dengan pengeringan biasa Proses pengeringan biasa terjadi melalui mekanisme penguapan pada suhu panas, sehingga bagian pangan yang kering akan terjadi perubahan kimia (gelatinisasi pati, karamelisasi gula, dan denaturasi protein) yang menyebabkan terbentuknya kerak (crust) di permukaan; yang akan memberikan hambatan bagi difusi uap dari bagian basah ke udara lingkungan. Akibatnya, proses pengeringan akan terhambat dan terhenti, menghasilkan produk yang bagian luar sudah kering, bahkan terlalu kering dan menjadi kerak- tetapi bagian tengahnya masih basah. Kasus demikian sering disebut sebagai casehardening.

Proses pengeringan beku terjadi melalui mekanisme sublimasi yang terjadi pada suhu dingin. Karena itu, proses gelatinisasi, karamelisasi, dan denaturasi tidak terjadi, sehingga pada bagian pangan yang kering tidak terjadi perubahan pembentukan kerak. Dengan demikian, uap air bisa berdifusi dengan baik dari bagian basah ke udara lingkungan, sehingga bisa dihasilkan produk yang kering dengan baik (12)

Berdasarkan uraian diatas, pada penelitian ini dilakukan pengujian penghambatan enzim asetilkolinesterase dari ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) hasil freeze drying. Dimana pada sebelum dilakukan uji IC<sub>50</sub> dilakukan pengujian skrining fitokimia. Pengujian yang dilakukan berupa uji penghambatan enzim asetilkolinesterase dengan menggunakan metode Ellman.

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1. ALAT DAN BAHAN

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

Bahan uji yaitu daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diperoleh dari Moringa Organik Indonesia, Blora, Jawa Tengah. Serta di determinasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Jawa Barat, etanol 96% (sigma aldrich), metanol p.a (Merck), DTNB ((5,5'-ditiobis-(asam 2-nitrobenzoat) (Sigma aldrich), AchI (asetilkolin iodida) (Sigma aldrich), Bovine Serum Albumin 0,1% (Sigma aldrich), AchE (asetilkolinesterase) (Sigma aldrich); Natrium hidroksida (Sigma aldrich), eserin (Sigma aldrich).

## 2.2. CARA KERJA

### **Determinasi Tanaman.**

Dilakukan determinasi tanaman untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian. Determinasi daun kelor dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Jawa Barat.

### **Ekstraksi daun kelor.**

Daun kelor yang diperoleh dimasukan kedalam wadah dan dilakukan ekstraksi dimana serbuk daun kelor dilarutkan dengan etanol 96% selama sebelas hari. Setelah itu dilakukan pemekatan hasil ekstrak maserasi dengan menggunakan rotary evaporator.

### **Freeze drying ekstrak daun kelor.**

Liofilisasi atau freeze drying dilakukan pada kondisi suhu dan tekanan di bawah tiga titik atau 0°C, untuk memungkinkan sublimasi es. Seluruh proses dilakukan pada suhu dan tekanan rendah, karenanya cocok untuk pengeringan senyawa termolabil. Langkah-langkah yang terlibat dalam liofilisasi dimulai dari persiapan sampel diikuti dengan pembekuan, pengeringan primer dan pengeringan sekunder, untuk mendapatkan produk akhir yang dikeringkan dengan kadar air yang diinginkan. Gradien konsentrasi uap air antara bagian depan pengeringan dan kondensor adalah kekuatan pendorong untuk menghilangkan air selama proses liofilisasi. Tekanan uap air meningkat dengan peningkatan suhu selama pengeringan primer. Oleh karena itu, suhu pengeringan primer harus dijaga setinggi mungkin, tetapi di bawah suhu proses kritis, untuk menghindari hilangnya strukturnya. Temperatur ini adalah suhu runtuh untuk zat amorf, atau leleh eutektik untuk zat kristalin. Selama pembekuan, kristal es mulai berpisah hingga larutan terkonsentrasi secara maksimal. Pada pendinginan lebih lanjut, pemisahan fase antara zat terlarut dan es terjadi (11).

### **Penapisan fitokimia**

**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 dimasukan 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 Baughardat akan terbentuk endapan coklat. Tabung reaksi ketiga ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorf akan terbentuk endapan putih. Sampel dikatakan mengandung alkaloid jika terjadi endapan atau kekeruhan pada paling sedikit dua dari tiga percobaan di atas.

**Identifikasi saponin.** Sampel uji ditimbang sebanyak 0,5 g dan dimasukan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat selama 10 detik. Jika berbusa dan tidak hilang dengan ditambahkan asam klorida 2N menunjukkan adanya kandungan saponin.



**Identifikasi Tanin.** 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.

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

**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.

**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.

**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.

#### **Pengujian aktivitas penghambatan AChE.**

Pengujian aktivitas penghambatan AChE dengan Metode Ellman. Pengujian ekstrak menggunakan substrat ATCh, indikator warna DTNB, dan enzim AChE. Sebagai pembanding digunakan donepezil HCl. Absorbansi warna hasil reaksi tersebut diukur pada menit ke 30 dengan panjang gelombang 400 nm (6).

#### **Pengujian Kinetika Penghambatan AChE.**

Ekstrak etanol daun kelor diinkubasi selama 10 sampai 30 menit pada suhu kamar, terlindung dari cahaya. Pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang 410 nm. Persamaan dibuat dengan sumbu x sebagai  $1/Kecepatan (1/V)$  dan sumbu y sebagai  $1/Konsentrasi Substrat (1/[S])$  dari masing-masing konsentrasi larutan uji. Titik potong persamaan tersebut menentukan kinetika AChE-I. Titik potong persamaan dengan sumbu x adalah  $-1/K_m$ . Titik potong persamaan dengan sumbu y adalah  $1/V_{maks}$  (7)(8).

### **3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Determinasi Tanaman**

Determinasi bertujuan untuk mengetahui atau memastikan kebenaran identitas tanaman yang akan diteliti, untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan penelitian. Hasil dari determinasi tersebut menyatakan bahan tanaman yang akan

digunakan dalam penelitian ini adalah benar - benar tanaman daun kelor dari keluarga Moringaceae spesies *Moringa oleifera* Lam.

### Hasil Ekstraksi Daun Kelor.

Ekstrak daun kelor seberat 1.000g dimaserasi dengan pelarut etanol 96% selama 11 hari. Didapatkan data seperti di bawah ini (Tabel 1):

**Tabel 1. Hasil ekstraksi daun kelor dengan etanol 96%**

Hari Ke-	Jumlah pelarut	Filtrat maserat
Maserasi ke 1	3.000 mL	450 mL
Maserasi ke 2	2.000 mL	2.000 mL
Maserasi ke 3	2.000 mL	2.200 mL
Maserasi ke 4	2.000 mL	2.000 mL
Maserasi ke 5	2.000 mL	2.000 mL
Maserasi ke 6	1.800 mL	1.800 mL
Maserasi ke 7	2.000 mL	1.500 mL
Maserasi ke 8	2.000 mL	1.500 mL
Maserasi ke 9	2.000 mL	1.800 mL
Maserasi ke 10	2.000 mL	1.700 mL
Maserasi ke 11	2.000 mL	1.300 mL
<b>Total</b>	<b>22.800 mL</b>	<b>18.250 mL</b>

Pada ekstraksi ini didapatkan ekstrak daun kelor yang sempurna ditunjukkan dengan filtrat yang sudah tidak mengandung zat aktif dengan melakukan pengujian di kromatografi lapis tipis. Ekstrak cair hasil maserasi yang didapat dilanjutkan kembali dengan menggunakan rotary evaporator untuk mendapatkan hasil ekstrak kental. Ekstrak kental yang didapatkan adalah sebagai berikut (Tabel 2):

**Tabel 2. Hasil ekstrak kental daun kelor**

Nama bagian	Jumlah
Berat wadah + ekstrak daun kelor	766.80 g
Berat wadah	299.68 g
<b>Berat ekstrak daun kelor</b>	<b>467.12 g</b>

Berdasarkan tabel 2 didapatkan hasil ekstrak kental daun kelor sebanyak 467.12 g dari 1.000 g dengan persentase rendemen sebesar 46.71%. hasil ini dikatakan memenuhi persyaratan literatur pada Farmakope Herbal Indonesia dimana rendemen ekstrak daun kelor tidak kurang dari 10%.

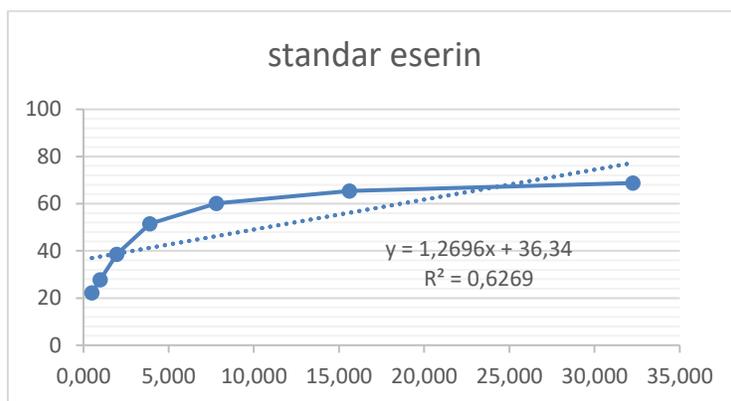
Ekstrak kental hasil evaporasi lalu dilakukan tahapan *freeze drying* dengan tujuan agar menjaga kualitas mutu dari suatu ekstrak sehingga dapat dibuat menjadi

sediaan yang stabil dalam penyimpanan. Dari hasil pengujian diperoleh hasil ekstrak *freeze drying* adalah sebagai berikut:

**Tabel 3. Hasil ekstrak daun kelor dengan metode freeze drying**

Nama bagian	Jumlah
Berat wadah + ekstrak daun kelor	467.42 g
Berat wadah	181.39 g
<b>Berat ekstrak daun kelor</b>	<b>286.03 g</b>

Berdasarkan tabel 3 hasil dari ekstrak daun kelor dengan metode *freeze drying* maka didapatkan berat ekstrak sebanyak 286.03 g dengan persentase rendemen sebesar 28,60%. Hasil ini dikatakan memenuhi persyaratan pada Farmakope Herbal Indonesia dimana rendemen ekstrak tidak kurang dari 10%.



Gambar 2. Grafik regresi linier larutan standar eserin

Ekstrak yang dihasilkan dari metode freeze dry ini merupakan ekstrak yang stabil dimana mempunyai densitas yang rendah serta mempunyai keunggulan dimana pada pembuatan menjadi produk sediaan memiliki waktu penyimpanan yang lebih lama. Hal ini berawal dari produk segar yang diubah menjadi produk beku dan dengan proses penyubliman akan menghilangkan kadar uap air pada produk beku untuk menjadi produk kering beku(11).

### **Skrining Fitokimia.**

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa (*Class of compound*) yang terkandung di dalam ekstrak yang diperoleh dari *Moringa oleifera*. Hasil uji penapisan fitokimia ditampilkan pada tabel 4.

Pada hasil penapisan fitokimia didapatkan bahwa 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 (9).

**Tabel 4. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Kelor**

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

Keterangan:

(+) : terdapat kandungan kimia

(-) : tidak terdapat kandungan kimia

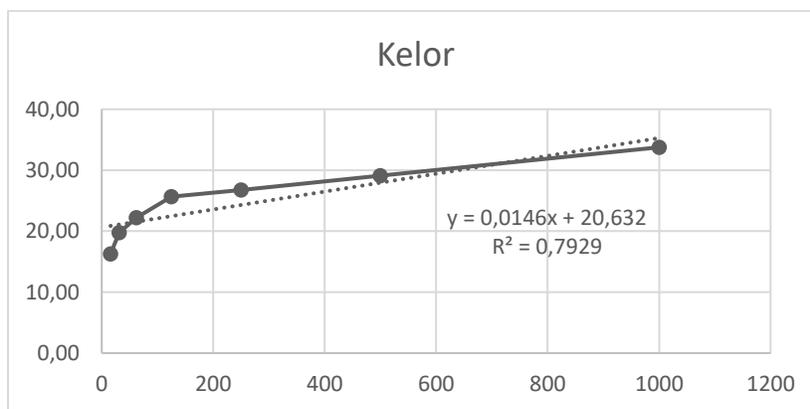
**Pengujian Aktivitas Penghambatan AChE.**

Pengujian aktivitas penghambatan AChE dilakukan dengan menggunakan microplate reader. Hasil pengujian aktivitas penghambatan AChE oleh ekstrak *Moringa oleifera* ditunjukkan pada Tabel 5 berikut:

**Tabel 5. Hasil uji aktivitas penghambatan AChE**

No	Sampel Uji	Persamaan Regresi	Nilai IC <sub>50</sub>
1	Eserin	$y = 5.0196x + 24.851$	5.010 ppm
2	Ekstrak Etanol Daun Kelor	$y = 0.0443x + 13.685$	819.7517 ppm

Pada tabel 5, Satuan standar yang digunakan adalah nilai IC<sub>50</sub> dimana merupakan satuan standar yang dipergunakan untuk menentukan suatu ekstrak yang dapat dijadikan sebagai obat Alzheimer berdasarkan aktivitasnya. Setelah itu dilakukan regresi linier sehingga di dapatkan pada gambar 2 dan 3.



Gambar 3. Grafik regresi linier ekstrak daun kelor

Pada penelitian ini ekstrak yang dipilih untuk pengobatan penyakit Alzheimer adalah ekstrak daun kelor dimana ekstrak yang dipilih mempunyai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  ini masih jauh dari nilai  $IC_{50}$  kontrol positifnya yaitu Eserin. Berdasarkan hasil pengujian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor memiliki daya hambat yang signifikan terhadap penghambatan enzim AChE. Ekstrak daun kelor yang mengandung kuersetin dapat memperbaiki kerusakan memori pada manusia yang diinduksi dengan penghambat kolinergik dimana ekstrak daun kelor menginduksi potensiasi jangka panjang pada hipokampus, memblokir enzim AChE serta memfasilitasi masuknya kalsium ke dalam sel neuron (13).

#### 4. KESIMPULAN

Pada hasil penelitian ini didapatkan bahwa ekstrak daun kelor hasil freeze drying mempunyai aktivitas penghambatan AChE sebesar 819.7517 ppm dengan kontrol positif eserin sebesar  $IC_{50}$  5,010 ppm.

#### 5. DAFTAR PUSTAKA

- (1) Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. 2011. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med*; 3(77): 77.
- (2) Yulanri D. 2018. Uji Aktivitas Anti Alzheimer Secara In Vitro Dengan Penghambatan Enzim Asetilkolinesterase (Ache) Oleh Ekstrak Etanol Kulit Buah Petai (*Parkia speciosa* Hassk.) (skripsi). Palembang: Universitas Sriwijaya. H 8-14.
- (3) Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, AristilJ, Bertoli S. 2015. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of moringa oleifera leaves: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*; 16, 12791-12835
- (4) Sotalangka C, Wattanathorn J, Muchimapura S, Thukham-mee W. 2013. Moringa oleifera mitigates memory impairment and neurodegeneration in animal model of age-related dementia. *Oxid Med Cell Longev*, 695936.
- (5) Roy C. 2014. A nootropic effect of Moringa oleifera on Ach and ChAT activity in colchicine induced experimental rat model of Alzheimer's disease: Possible involvement of antioxidants. *Al Ameen J Med Sci*. 7(2). 125-133.
- (6) Ellman GL, Courtney KD., Andres VJ. & Featherstone RM. 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Pharmacol*, 7: 88 – 95
- (7) Silverman RB. 2002. The Organic Chemistry of Enzyme Catalysed Reaction. Academic Press. 563-84.
- (8) Wetwitayaklung P, Limmatvapirat C, Phaechamud T, & Keokitichai S. 2007. Kinetics of acetylcholinesterase inhibition of (*Quisqualis indica* Linn) flower extract. *Silpakorn University Science and Technology Journal*. 1(2); 20-27.

- (9) Nwidu LL, Elmorsy E, Aprioku JS, Siminialayi I, Carter WG. 2018. In vitro anticholinesterase and antioxidant activity of extracts of *Moringa oleifera* plants from River State, Niger Delta, Nigeria. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Journal*; 5(71); 1-17.
- (10) Razak MY, Salissou MT, Yuman W, Liu R. 2018. *Moringa oleifera* alleviates homocysteine induced alzheimer disease like pathology and cognitive impairments. *Journal of Alzheimer disease*; 63(3): 1-20.
- (11) Gaidhani KA. 2015. Lyophilization / Freeze Drying. *World Journal of Pharmaceutical Research*; 4(8): 516-543.
- (12) Hariyadi P. 2018. Freeze Drying Technology: for better quality & flavor of dried products. 8 th ed. Bandung, Indonesia: Bogor Agricultural University.
- (13) Dina SP, Herowati R, Nurrochmad A. 2019. Uji In Vitro Penghambatan Enzim Asetilkolinesterase dan Identifikasi Fitokimia Fraksi Aktif Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Farmasains*. 6(1). 1-9
- (14) Krisnadi D. 2012. Kelor Super Nutrisi.1st ed. Blora: Pusat Informasi dan Pengembangan Tanaman Kelor Indonesia.
- (15) Chivapat S, Sincharoenpokai P, Saktiyasuthorn N, Shuaprom A, thongsrirak P, Sakpetch A. 2011. Acute and Chronic Toxicity of *Moringa oleifera* Linn Leaves Extracts. *Journal of Thai Veterinary Medicine*; 41(4): 417-424.