

## **Ekstrak pegaga: Kandungan triterpenoid, aktiviti antioksidan dan fungsi kognitif**

(*Pegaga* extract: Triterpenoids content, antioxidant activity and cognitive function)

Madzlan Kasran

### **Pengenalan**

Pegaga atau nama saintifiknya *Centella asiatica* merupakan herba yang sangat terkenal bukan sahaja di Malaysia, tetapi juga di seluruh dunia. Ia banyak terdapat di negara-negara seperti Malaysia, Indonesia, India, Sri Lanka, Madagascar dan Afrika Selatan. Di Malaysia, pegaga dimakan segar sebagai ulam selain dijadikan herba ubatan untuk menyembuhkan luka, meningkatkan daya ingatan, mengurangkan keletihan mental, mengurangkan tekanan/keimbangan dan merawat ekzema. Di India, tumbuhan ini digunakan dalam perubatan *ayurveda* sementara di China ia digunakan untuk mengatasi masalah leukorrhoea. Kesedaran tentang potensi pegaga sebagai antioksidan semula jadi daripada sumber tumbuhan telah meningkat sejak beberapa tahun kebelakangan ini terutamanya sebagai antioksidan dalam sistem pertahanan di dalam sel otak. Komponen-komponen aktif di dalam pegaga berupaya meneutralkan radikal bebas seperti oksigen reaktif. Radikal bebas meningkatkan proses penuaan dan merosakkan banyak komponen sel.

Dianggarkan bahawa 20% daripada populasi dunia yang berumur 55 tahun dan ke atas mengalami masalah kesihatan mental. Masalah yang paling biasa adalah keimbangan, kemerosotan daya ingatan yang teruk atau dementia terutamanya disebabkan oleh penyakit Alzheimer dan gangguan pemikiran seperti tekanan perasaan dan kemurungan. Dianggarkan terdapat lima juta golongan geriatrik berumur 65 tahun dan ke atas mengalami masalah penyakit Alzheimer. Di Malaysia, Kajian Morbiditi dan Kesihatan Kebangsaan (NHMS) mendapati masalah kesihatan mental telah meningkat daripada 10.7% pada 1996 kepada 11.2% pada 2006. Semakin umur meningkat risiko penurunan fungsi kognitif semakin bertambah. Masalah kesihatan mental berlaku disebabkan beberapa faktor seperti genetik, ketidakseimbangan bahan kimia di dalam otak psiko-sosial dan tekanan persekitaran.

Kajian klinikal menunjukkan ekstrak pegaga mampu mengurangkan masalah gangguan yang berkaitan dengan perasaan cemas dan mengurangkan gangguan tekanan. Ekstrak pegaga juga menunjukkan kesan antioksidan serta peningkatan daya ingatan. Komposisi kimia pegaga amat penting bagi aplikasi perubatan dan nutrasetikal yang menyumbang kepada sifat bioaktif. Kumpulan triterpenoid merupakan komponen aktif terbesar di dalam pegaga. Komponen kumpulan triterpene ini termasuklah asid asiatik, asid madekasik, asiatikosida,

madekassosida, brahmosida, tankinisida, isotankunisida, centelosida, asid madasiatik, asid sentik dan senelikasida. Walau bagaimanapun, empat komponen utama yang menyumbang kepada sifat bioaktif ialah asid asiatik, asid madekasik, asiatikosida dan madekassosida. Komponen tersebut telah dijadikan sebagai penanda-kimia bagi penilaian kualiti pegaga. Selain kumpulan triterpenoid, terdapat juga kumpulan flavonoid di dalam pegaga seperti kuersetin, kaempferol, catechin, rutin, apigenin dan naringin.

Dalam kajian ini, proses pengekstrakan dilakukan bagi menghasilkan ekstrak pegaga yang kaya dengan komponen aktif triterpenoid. Kajian aktiviti antioksidan dan fungsi kognitif juga dilaksanakan bagi menilai keberkesanan ekstrak pegaga untuk dijadikan sebagai ramuan makanan yang berpotensi untuk diaplikasikan dalam pelbagai produk makanan.

### Penghasilan ekstrak pegaga

#### *Proses penyediaan serbuk pegaga*

Serbuk pegaga dihasilkan daripada pegaga segar yang telah dikeringkan. Proses penghasilan serbuk pegaga ditunjukkan seperti dalam *Carta alir 1*. Pegaga Nyonya segar diperoleh daripada pembekal sayuran di Pasar Borong Selangor. Daun pegaga dipotong kecil dengan anggaran saiz 2 cm dan dicuci dengan menggunakan mesin pencuci selama 10 minit. Daun pegaga kemudiannya dikeringkan di dalam pengering kabinet pada suhu 65 °C selama tujuh jam dan dikisar halus menjadi serbuk pegaga.



*Carta alir 1. Penyediaan serbuk pegaga*

### **Penyediaan ekstrak pegaga**

Ekstrak pegaga dihasilkan daripada serbuk pegaga seperti dalam *Carta alir 2*. Serbuk pegaga diekstrak menggunakan pelarut etanol dan air pada nisbah tertentu. Larutan kemudiannya dituras menggunakan alat penuras dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sebelum dikeringkan dengan alat pengering *freeze drier* untuk menjadi serbuk ekstrak pegaga.



*Carta alir 2. Penghasilan serbuk ekstrak pegaga*

### **Analisis komponen triterpenoid di dalam ekstrak pegaga**

Analisis komponen triterpenoid dijalankan menggunakan kaedah kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC). Peralatan HPLC yang digunakan ialah Waters Model 2695. Pengesan yang digunakan ialah spektrometer *photo diode array* (PDA) dengan jarak gelombang 200 – 400 nm. Komponen triterpenoid dianalisis pada jarak gelombang 200.5 nm. Pemisahan komponen triterpenoid adalah dengan menggunakan kolum *Symmetry® C18-5 µm*, dengan panjang 150 mm dan diameter 3.9 mm.

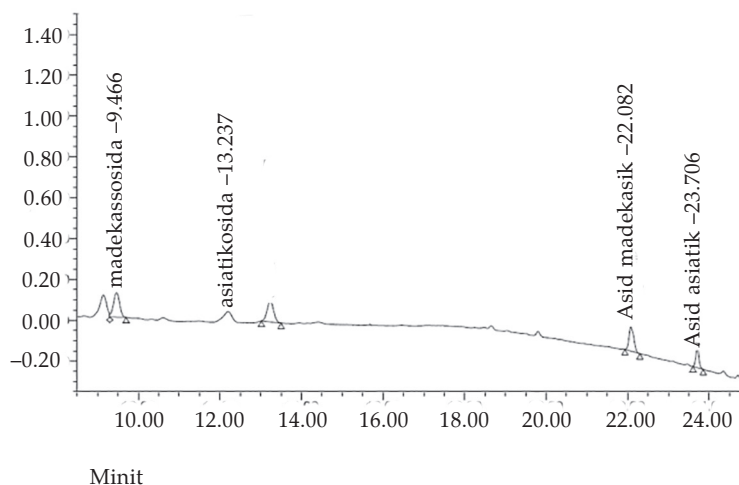
Campuran larutan piawai madekassosida, asiatikosida, asid madekassik dan asid asiatik pada kepekatan 250 mg/L disediakan sebagai larutan stok dalam pelarut metanol. Larutan stok dicairkan kepada kepekatan 25, 50, 75 dan 100 mg/L dan disuntik ke dalam kolum HPLC untuk menghasilkan lengkung piawai bagi pengiraan kandungan triterpenoid di dalam sampel. Komponen triterpenoid dipisahkan secara gradien di mana dua jenis fasa bergerak digunakan iaitu 100% asetonitril dan 0.1% asid trifluoroasetik (TFA) selama 35 minit pada aliran 1 mL/minit dan suhu kolum ditetapkan pada 25 °C. Ringkasan komposisi fasa gerak ditunjukkan seperti dalam *Jadual 1*. Penggunaan teknik gradien linear digunakan kerana terdapat dua kumpulan

Jadual 1. Komposisi fasa bergerak bagi analisis kandungan triterpenoid

Masa (minut)	Aliran (mL/minut)	Pelarut A [Asetonitril (%)]	Pelarut B [0.1% TFA (%)]
0	1.00	80	20
15	1.00	72	28
20	1.00	55	45
24	1.00	35	65
24.5	1.00	5	95
26.5	1.00	5	95
27	1.00	80	20
35	1.00	80	20

utama komponen aktif pegaga yang berbeza dari segi kepolaran. Bagi pemisahan asid triterpene (asid madekassik dan asid asiatik) kepolaran larutan fasa bergerak perlu ditingkatkan. Bagi pemisahan kumpulan glikosida (madekassosida dan asiatikosida) kepolaran larutan fasa bergerak perlu dikurangkan.

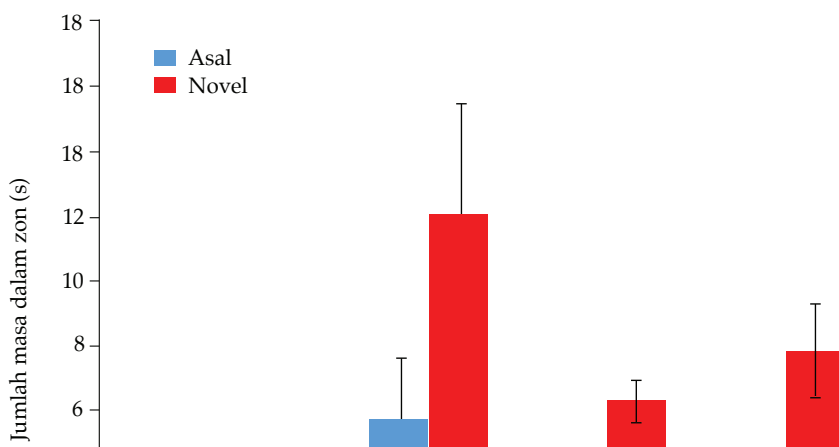
*Rajah 1* menunjukkan kromatogram bagi analisis komponen madekassosida, asiatikosida, asid madekasik dan asid asiatik dalam ekstrak pegaga. Masa analisis keseluruhan adalah selama 35 minut. Masa penahanan bagi komponen triterpenoid adalah kurang daripada 25 minut. Kandungan empat komponen triterpenoid masing-masing ialah madekassosida ( $1206.1 \pm 15.23$  mg/100 g), asiatikosida ( $1160.8 \pm 9.65$  mg/100 g), asid madekasik ( $1168.2 \pm 20.53$  mg/100 g) dan asid asiatik ( $991.6 \pm 15.3$  mg/100 g) daripada berat kering ekstrak pegaga.



*Rajah 1.* Kromatogram bagi analisis komponen madekassosida, asiatikosida, asid madekasik dan asid asiatik dalam ekstrak pegaga

### Aktiviti antioksidan serbuk ekstrak pegaga

Analisis antioksidan iaitu 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dan 'Ferric Reducing Antioxidant Power Assay' (FRAP Assay) dijalankan ke atas ekstrak pegaga yang terhasil. *Rajah 2* menunjukkan keupayaan serbuk ekstrak pegaga dalam memerangkap dan merencat aktiviti radikal bebas DPPH pada kepekatan yang berbeza. Keupayaan ekstrak pegaga merencat radikal bebas meningkat dengan meningkatnya kepekatan ekstrak pegaga dan mencapai tahap yang optimum pada kepekatan 0.6 mg/mL. Penambahan kepekatan ekstrak pegaga selepas itu tidak menunjukkan perubahan yang signifikan terhadap perencatan radikal bebas. Secara *in vitro*, ekstrak pegaga menunjukkan aktiviti antioksidan yang tinggi (perencatan radikal bebas DPPH sebanyak 90% dengan nilai  $IC_{50} = 371.7 \mu\text{g/mL}$ ).

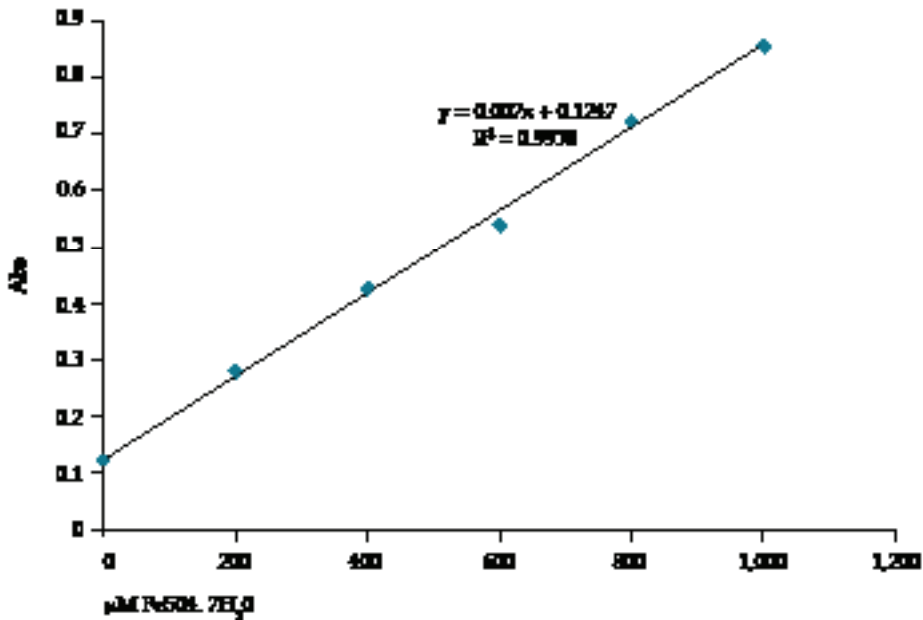


*Rajah 2. Peratus keupayaan serbuk ekstrak pegaga bagi merencat aktiviti radikal bebas DPPH*

*Rajah 3* menunjukkan lengkung piawai bagi menentukan nilai FRAP. Semakin tinggi nilai FRAP menunjukkan keberkesanan dan keupayaan ekstrak pegaga untuk bertindak sebagai agen penurunan yang menurunkan  $\text{Fe}^{3+}$  kepada  $\text{Fe}^{2+}$ . Nilai FRAP ialah 126 mmol  $\text{Fe(II)}/\text{g}$  berat kering sampel.

### Penilaian ekstrak pegaga terhadap fungsi kognitif pada model tikus

Keupayaan kognitif tikus muda dan tua yang diberikan ekstrak pegaga dinilai melalui ujian *Novel Object Recognition* (NOR). Keupayaan kognitif ini dibandingkan dengan tikus muda dan tua yang dijadikan kawalan (tikus yang tidak diberikan ekstrak pegaga). Tikus diberikan minuman dan makanan secara *ad libitum* (pemberian makanan dan minuman yang tidak dihadkan). Semua tikus diletakkan di dalam sangkar dan dikedalkan di makmal kawalan. Dalam eksperimen ini, tikus tua berusia 10 bulan dan tikus muda (berumur lapan minggu) digunakan. Ekstrak pegaga



Rajah 3. Lengkuk piawai bagi penentuan nilai FRAP

dilartukan dengan air suling pada kepekatan 2.5 mg/mL untuk diberikan kepada setiap tikus. Kesemua sampel diberikan kepada tikus secara suapan paksa.

Ujian *novel object recognition* (NOR) adalah ujian tingkah laku berdasarkan kecenderungan spontan haiwan untuk menghabiskan lebih banyak masa menjelajahi objek novel. Masa yang dihabiskan untuk meneroka setiap objek direkodkan. Pilihan untuk meneroka objek merupakan proses pembelajaran baru dan pengecaman melalui daya ingatan. Aktiviti tersebut direkodkan dengan menggunakan *Microsoft DV Camera* dan *VCR*. Semua data dianalisis dengan menggunakan Perisian *AnyMaze*. Dalam eksperimen ini, tikus telah melalui proses NOR selama lima minit setiap sesi dalam kotak 40 cm<sup>2</sup> selepas diberikan ekstrak pegaga selama dua bulan. Untuk eksperimen NOR, tikus diletakkan di dalam kotak terbuka kosong selama lima minit untuk proses habitasi pada hari pertama. Pada hari kedua, tikus diperkenalkan kepada dua objek yang sama (objek biasa) selama lima minit. Pada hari ketiga, salah satu objek digantikan dengan objek baru. Jarak perjalanan, kelajuan dan masa oleh tikus pada zon objek novel dan biasa telah direkodkan.

#### **Keputusan kajian fungsi kognitif**

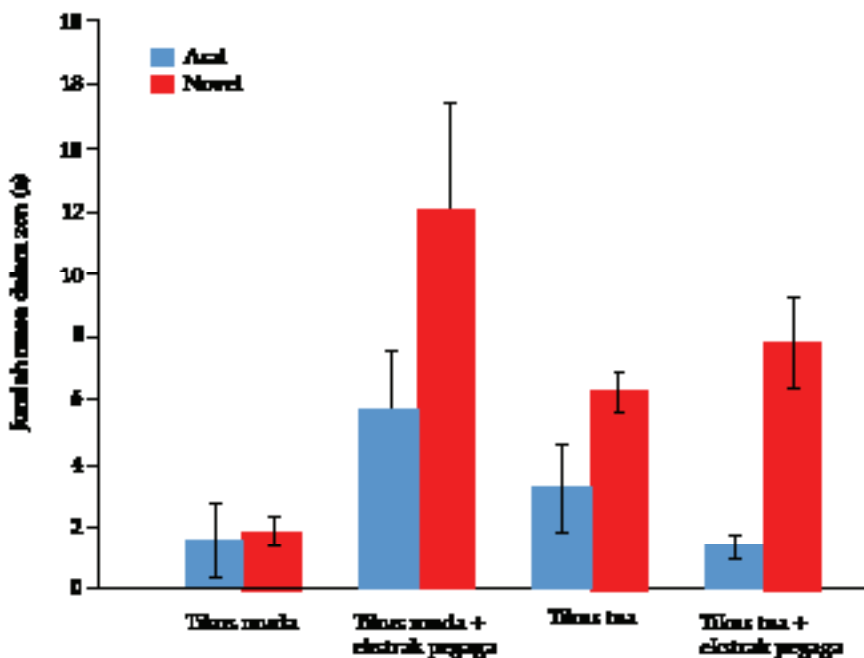
##### ***Penilaian ekstrak pegaga terhadap tahap ingatan dalam ujian 'novel object recognition'***

Ujian *novel object recognition* (NOR) dijalankan untuk menentukan kesan daya ingatan selepas tikus diberikan ekstrak pegaga. Semasa familiariasi, haiwan meneroka dua objek yang sama. Dalam fasa

ujian, satu objek ditukar kepada satu objek novel dan tikus diuji untuk keupayaan mereka untuk mendiskriminasi antara objek dikenali dan objek novel. Kajian menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan bagi masa yang diambil oleh tikus muda yang tidak diberikan ekstrak pegaga untuk berada dalam objek dikenali dan objek novel. Akan tetapi bagi tikus muda yang diberikan ekstrak pegaga, secara signifikannya lebih lama masa diambil oleh tikus muda untuk berada dalam objek novel. Bagi tikus tua, untuk kedua-dua kumpulan sama ada yang tidak diberi ekstrak pegaga atau kumpulan yang diberikan ekstrak pegaga, tempoh masa untuk tikus dalam objek novel lebih lama berbanding dengan objek dikenali. Akan tetapi jika dibandingkan masa yang diambil oleh tikus tua untuk berada dalam objek novel, tikus yang diberikan ekstrak pegaga memperuntukkan masa yang lebih lama untuk berada dalam objek novel berbanding objek dikenali sementara masa yang diambil untuk berada dalam objek dikenali sedikit berkurangan (*Rajah 4*). Ini menunjukkan fungsi kognitif tikus yang diberikan ekstrak pegaga dapat ditingkatkan.

### Kesimpulan

Ekstrak pegaga dihasilkan daripada serbuk pegaga dan kandungan bahan aktif triterpenoid di dalam ekstrak pegaga telah ditentukan. Kandungan empat komponen triterpenoid masing-masing ialah madekassosida ( $1206.1 \pm 15.23$  mg/100 g), asiatikosida ( $1160.8 \pm 9.65$  mg/100 g), asid madekasik ( $1168.2 \pm 20.53$  mg/100 g) dan asid asiatik ( $991.6 \pm 15.3$  mg/100 g) daripada



*Rajah 4. Kesan ekstrak pegaga terhadap tahap ingatan dalam ujian 'novel object recognition'*



berat kering ekstrak pegaga. Secara *in vitro*, ekstrak pegaga menunjukkan aktiviti antioksidan yang tinggi (perencatan radikal bebas DPPH sebanyak 90% dengan nilai  $IC_{50} = 371.7 \mu\text{g/mL}$  sementara nilai FRAP ialah 126 mmol Fe(II)/g dry wt sampel). Ujian kognitif menunjukkan ekstrak pegaga berpotensi untuk meningkatkan fungsi kognitif.

### Penghargaan

Setinggi-tinggi penghargaan diucapkan kepada Mohd. Fakhri Hashim, Rahimah Mohd Zaki dan Mohd Azmi Zainun daripada Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan, Asnawi Shahar dari Pusat Penyelidikan Kejuruteraan, Ibu Pejabat MARDI, Serdang dan Dr. Zolkapli Eshak daripada UiTM, Puncak Alam atas sumbangan dalam membantu menjayakan projek ini. Projek ini dibiayai oleh Projek Pembangunan Rancangan Malaysia Ke-11, MARDI dengan tajuk projek: Peningkatan produk ditambah nilai daripada sumber pertanian, rumpai laut dan akuakultur dengan kod projek 21003004170001.

### Bibliografi

- Abdul Hamid, A., Md. Shah, Z., Muse, R. dan Mohamed, S. (2002). Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. *Food Chemistry* 77: 465 – 49
- Antunes, M. dan Biala G (2012). The Novel Object Recognition Memory: Neurobiology, Test Procedure, and Its Modification. *Cogn Process* 13(2): 93 – 110
- American Association of Geriatric Psychiatry (2008). Geriatrics and mental health—the facts. Diperoleh pada 23 Jun 2008 dari [http://www.aagponline.org/prof/facts\\_mh.asp](http://www.aagponline.org/prof/facts_mh.asp)
- Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D. dan Hahn, E.G. (2000). Review article: Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine* 7(5): 427 – 448
- Goh, S.H., Chuah, Mok, J.S.L. dan Soepadmo, E. (1995). *Malaysian medicinal plants for the treatment of cardiovascular diseases*. Kuala Lumpur: Academe Art and Printing Services Sdn. Bhd.
- Gulcin, I., Oktay, M., Kirecci, E. dan Kufrevioglu, O.I. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry* 83: 371 – 382
- Inamdar, P.K., Teola, R.D., Ghogare, A.B. dan de Souza, N.J. (1996). Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. *Journal of Chromatography A*. 742: 127 – 130
- Jana, U., Sur, T.K., Maity, L.N., Debnath, P.K. dan Bhattacharyya, D. (2010). A clinical study on the management of generalized anxiety disorder with *Centella asiatica*. *Nepal Medical College Journal* 12: 8 – 11
- Kan, W.S. (1986). *Pharmaceutical botany*. Taiwan: National Research Institute of Chinese Medicine. m.s. 416 – 417
- Kartnig (1998). Clinical application of *Centella asiatica* L. Urb. *Herbs, Spices and Medicinal Plants* 3: 145 – 173
- Krishnaswarny, S. (1995). Screening for Dementia Among Elderly Malays in Urban Settlements in Kuala Lumpur. *Malaysia Psyc.* 3: 58 – 654



- Krishnaswamy, S. (1997). Psychiatric Problems Among the Elderly in Malaysia. *Med J Malaysia* 52(3): 222 – 225
- Liyana-Pathirana, C. dan Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93(1): 47 – 56
- Loiseau, A. dan Mercier, M. (2000). *Centella asiatica* and skin care. *Cosmetic and Toiletries Magazine* 115: 63 – 67
- Nobre, C.P., Raffin, F.N. dan Moura, T.F. (2005). Standardization of extracts from *Momordica charantia* L. (*Cucurbitaceae*) by total bioflavonoids content determination. *Acta Farm. Bonaerense* 24(4): 526 – 566
- Rao, S.B., Chetana, M. dan Uma Devi, P. (2005). *Centella asiatica* treatment during postnatal period enhances learning and memory in mice. *Physiology and Behavior* 86: 449 – 457
- Sahu, N.P., Roy, S.K. dan Mahato, S.B. (1989). Spectroscopic determination of structures of triterpenoid trisaccharides from *Centella asiatica*. *Phytochemistry* 28: 2852 – 2854
- Sharizan, A., Ariff Zaidi, J., Jeeven, K., Mohd Nazrul, H.D., Hasnisa, H. dan Nor Fadhilah, S. (2016). Analisis kandungan bioaktif di dalam pegaga. *Buletin Teknologi MARDI Bil.* 9: 89 – 95
- Sunthornsuk, L. dan Anurukvorakun, O. (2005). Precision improvement for the analysis of flavonoids in selected Thai plants by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 26: 648 – 660
- Veerendra Kumar, M.H. dan Gupta, Y.K. (2003). Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intra cerebroventricular streptozotocin in model of Alzheimer's disease in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 30: 336 – 342
- Zainol, M.K.M. (2004). Determination of flavonoids in *Centella asiatica* (L.) Urban and their utilization in herbal noodles. Serdang, Malaysia: Universiti Putra Malaysia, MSc. Thesis
- Zheng, C.J. dan Qin, L. P. (2007). Chemical components of *Centella asiatica* and their bioactives. *Journal of Chinese Interactive Medicine* 5: 348 – 351

### Ringkasan

Ekstrak pegaga telah dihasilkan daripada serbuk daun pegaga. Serbuk daun pegaga dihasilkan daripada proses pengeringan dan pengisaran daun pegaga segar. Komponen triterpenoid telah dianalisis daripada ekstrak pegaga yang dihasilkan. Analisis komponen triterpenoid dijalankan menggunakan kaedah kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC). Kandungan empat komponen utama triterpenoid masing-masing ialah madekassosida ( $1206.1 \pm 15.23$  mg/100 g), asiaticosida ( $1160.8 \pm 9.65$  mg/100 g), asid madekasik ( $1168.2 \pm 20.53$  mg/100 g) dan asid asiatik ( $991.6 \pm 15.3$  mg/100 g) daripada berat kering ekstrak pegaga. Analisis antioksidan iaitu DPPH dan FRAP terhadap serbuk ekstrak pegaga menunjukkan peratus perencatan radikal bebas (DPPH) melebihi 90% dengan nilai  $IC_{50} = 371.7$   $\mu$ g/mL sementara nilai FRAP ialah 126 mmol Fe(II)/g berat kering sampel. Ujian 'novel object recognition' (NOR) digunakan untuk menentukan kesan daya ingatan selepas tikus diberikan ekstrak pegaga. Ujian NOR adalah ujian tingkah laku berdasarkan kecenderungan spontan haiwan untuk menghabiskan lebih banyak masa menjelajahi objek novel. Kajian menunjukkan, bagi tikus

muda yang diberikan ekstrak pegaga, secara signifikannya lebih lama masa diambil untuk menjelajahi objek novel berbanding dengan objek dikenali. Bagi tikus tua yang diberikan ekstrak pegaga pula kecenderungan untuk berada dalam objek novel juga lebih lama berbanding dengan objek dikenali manakala masa yang diambil untuk berada dalam objek dikenali sedikit berkurangan. Ujian kognitif menunjukkan ekstrak pegaga berpotensi untuk meningkatkan fungsi kognitif.

### **Summary**

*Pegaga* extract has been produced from *pegaga* leaf powder. *Pegaga* leaf powder was produced by drying and grinding of fresh *pegaga* leaves. The components of triterpenoid were analyzed from the *pegaga* extract produced. The analysis of triterpenoid component was performed using high performance liquid chromatography (HPLC). The four main components of the triterpenoid are madecassosides ( $1206.1 \pm 15.23$  mg/100 g), asiaticoside ( $1160.8 \pm 9.65$  mg/100 g), madecassic acid ( $1168.2 \pm 20.53$  mg/100 g) and asiatic acid ( $991.6 \pm 15.3$  mg/100 g) of dry weight *pegaga* extract. The antioxidant analysis (DPPH and FRAP) of the *pegaga* extract powder showed that the inhibition of free radical (DPPH) was greater than 90% with an IC<sub>50</sub> value of 371.7  $\mu$ g/mL while the FRAP value was 126 mmol Fe (II) / g dry sample weight. The novel object recognition (NOR) was used to determine the effect of memory after mice were given *pegaga* extract. The NOR test is a behavioral test based on the spontaneous tendency of animals to spend more time exploring novel objects. Studies show that, for young mice given the *pegaga* extract, it takes significantly longer time to explore novel objects than known ones. For older mice given the *pegaga* extract, the time spent in novel objects was much longer while the time spent in known objects was slightly reduced. Cognitive tests showed that *pegaga* extract has the potential to improve cognitive function.

### **Pengarang**

Madzlan Kasran (Dr.)

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

E-mel: madzlan@mardi.gov.my