

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF FRAKSI ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn.) SEBAGAI ANTI INFLAMASI PENGHAMBAT ENZIM SIKLOOKSIGENASE-2 (COX-2) SECARA IN VITRO

Erayadi Soekaryo¹⁾, Siswa Setyahadi^{1,2)}, Partomuan Simanjuntak^{1,3)}

¹⁾ Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi Universitas Pancasila Jakarta, 12640

e-mail : erayadisoekaryo@yahoo.com

²⁾ BPPT Puspitek Serpong, Gedung 610/611 LAPTIAB I, PUSPIPTEK, Serpong, 15314

e-mail : siswa59@yahoo.com

³⁾ Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong, Komplek CSC-LIPI, 16911

e-mail : partomsimanjtk@yahoo.com

Abstrak

Berbagai obat golongan anti inflamasi non-steroid (NSAID) telah banyak digunakan secara klinis untuk inflamasi serta rheumatoid arthritis. Namun, obat NSAID tersebut memiliki sejumlah efek samping mulai dari yang ringan sampai serius. Enzim siklooksigenase (COX) adalah enzim utama dalam biosintesis pembentukan mediator nyeri. Daun tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn.) dilaporkan mengandung senyawa asetogenin yang secara empiris selain sebagai anti kanker juga bermanfaat sebagai anti inflamasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa dari fraksi etanol daun sirsak yang berperan sebagai anti inflamasi dalam menghambat aktivitas enzim siklooksigenase-2 (COX-2). Studi aktivitas penghambatan enzim dilakukan secara *in vitro* dengan metode COX2 inhibitor screening assay dan pengukuran aktivitas menggunakan spektrofotometri UV-Vis yang dianalisis oleh *microplate reader*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etanol daun tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn.) dari fraksi etanol Fr.EtOH III.2.1 memiliki aktivitas anti inflamasi dengan nilai IC₅₀ sebesar 20,33 ppm. Identifikasi senyawa dari penelusuran pustaka dengan LC-MS dan FT-IR menunjukkan diduga senyawa Gigantetrocin A merupakan senyawa yang aktif sebagai anti inflamasi dengan rumus molekul C₃₅H₆₄O₇.

Kata kunci: Inflamasi, COX-2, *Annona muricata*, Sirsak, Gigantetrocin A

1. Pendahuluan

Menurut World Health Organization (WHO,2009)[1], kanker adalah istilah umum untuk satu kelompok besar penyakit yang dapat mempengaruhi setiap bagian dari tubuh. Istilah lain yang digunakan adalah tumor ganas dan neoplasma.

Kanker adalah pertumbuhan sel baru secara abnormal yang tumbuh melampaui batas normal, dan kemudian dapat menyerang bagian tubuh lain dan menyebar ke organ lain. Proses tersebut dinamakan metastasis dan proses tersebut merupakan penyebab utama kematian akibat kanker [1,2].

Nyeri adalah perasaan sensoris dan emosional yang tidak nyaman dan berkaitan dengan kerusakan jaringan. Ambang toleransi nyeri berbeda-beda bagi setiap orang. Batas nyeri untuk suhu tubuh adalah konstan, yakni pada suhu 44-45°C. Rasa nyeri hanya merupakan suatu gejala yang berfungsi melindungi tubuh. Nyeri dianggap sebagai isyarat bahaya tentang adanya

gangguan di jaringan seperti peradangan, infeksi jasad renik atau kejang otot. Nyeri yang disebabkan rangsangan mekanis, kimiawi atau fisis (kalor, listrik) dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan. Rangsangan tersebut dapat memicu pelepasan zat tertentu yang disebut mediator nyeri. Mediator nyeri antara lain terdiri dari histamin, serotonin, bradikinin, leukotrien dan prostaglandin. Prostaglandin memiliki struktur yang mirip dengan asam lemak dan terbentuk dari asam arakidonat [3].

Demam pada umumnya adalah suatu gejala dan bukan merupakan penyakit tersendiri. Demam merupakan suatu reaksi tangkis yang berguna dari tubuh terhadap infeksi. Dalam menanggulangi gejala rasa nyeri, peradangan dan kekakuan banyak digunakan obat analgetika anti radang atau *Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAID) selain dari kortikosteroid yang lebih banyak efek sampingnya. Mekanisme kerja obat golongan NSAID sebagian besar berdasarkan hambatan sintesa prostaglandin

dimana obat tersebut menghambat kerja enzim siklooksigenase (COX) yang bertanggung jawab atas terbentuknya mediator nyeri seperti prostaglandin.

Terdapat dua isoenzim COX dalam tubuh yaitu COX-1 dan COX-2. Enzim COX-1 secara konstitutif terbentuk dalam berbagai jaringan dan banyak terdapat pada mukosa lambung dan ginjal. Enzim COX-2 tidak terbentuk dalam kondisi normal didalam sel, namun kadarnya dapat meningkat seiring dengan terjadinya inflamasi. Berkaitan dengan itu namun bukan berarti obat golongan NSAID tidak ada efek sampingnya, sejumlah efek samping terjadi saat penggunaan obat golongan NSAID yang berkaitan dengan penghambatan sintesa prostaglandin dan terutama terjadi pada lambung, usus, ginjal dan fungsi trombosit. Frekuensinya berbeda-beda untuk berbagai obat dan pada umumnya efek tersebut meningkat dengan besarnya dosis dan lama penggunaannya [3].

Setiap obat baru yang dihasilkan harus memiliki aksi selektif untuk mengurangi efek samping yang tidak diinginkan yang menimbulkan komplikasi dalam tubuh pasien. Kemampuan selektifitas dapat terjadi melalui modifikasi struktur obat, target sasaran dan stereoselektif. Pada penanganan beberapa penyakit seperti pencegahan pembentukan trombus intravaskular oleh platelet pada penyakit kardiovaskular, selektivitas penghambatan terhadap enzim siklooksigenase (COX-1) yang akan mencegah pembentukan tromboxan A₂ (TXA₂) menjadi penting [2,3].

Selektivitas penghambatan terhadap enzim COX-2 akan mencegah pembentukan prostaglandin (PGE₂) yang merupakan mediator penting pada proses timbulnya rasa nyeri dengan tingkat keamanan yang lebih baik pada gastrointestinal [4].

Berkaitan dengan hal tersebut maka perlu suatu upaya dalam pengembangan obat baru yang diperoleh dari alam atau secara empiris telah digunakan untuk suatu penyakit dengan harapan diperoleh suatu obat dengan resiko efek samping yang lebih

kecil. Dalam dekade terakhir, telah terjadi kenaikan yang signifikan dalam penggunaan obat tradisional sebagai pengobatan alternatif di seluruh negara berkembang. Saat ini obat tradisional, produk komplementer dan pengobatan alternatif memainkan peran yang semakin penting dalam sektor pelayanan kesehatan. Berdasarkan hal tersebut maka keamanan, kemanfaatan dan mutu dari obat tradisional menjadi fokus utama bagi otoritas kesehatan khususnya dan masyarakat pada umumnya [5].

Tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn.) memiliki sejarah panjang dalam pengobatan secara tradisional di benua Amerika. Di Andes Peru, sediaan teh daun sirsak digunakan untuk radang selaput lendir hidung (radang mukosa membran) dan bijinya yang telah di serbuk digunakan untuk membunuh parasit. Bagian kulit kayu, akar, dan daun digunakan untuk diabetes, obat penenang dan antispasmodik. Suku asli di Guyana menggunakan sediaan teh dari daun dan kulit kayu sebagai obat penenang dan tonik jantung sedangkan di Brazil daerah Amazon sediaan teh daun sirsak digunakan untuk gangguan masalah hati, minyak dari daun dan buah mentahnya dicampur dengan minyak zaitun untuk digunakan dalam pengobatan secara eksternal untuk neuralgia, rematik, dan nyeri artritis. Saat ini di Amerika Serikat dan Eropa, tumbuhan sirsak mulai digunakan sebagai ajuvan alami yang populer untuk terapi kanker [6].

Tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn.) adalah tumbuhan tropis dari keluarga Annonaceae. Daun tumbuhan sirsak dilaporkan mengandung minyak esensial dan secara empiris bermanfaat untuk demam, nyeri, pernapasan, penyakit kulit, parasit internal dan eksternal, infeksi bakteri, hipertensi, peradangan, diabetes dan kanker. Saat ini lebih dari 200 senyawa astogenin telah diidentifikasi dan diisolasi dari tumbuhan sirsak [7].

Beberapa review dan penelitian secara in vivo telah dilakukan terhadap aktivitas tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn.)

sebagai anti inflamasi, namun sampai saat ini belum dilakukan penelitian yang membuktikan mekanisme kerja aktivitas anti inflamasi tumbuhan sirsak melalui penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase-2 (COX-2).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh A.H. Roslida *et al.*(2012) [8] nilai ED₅₀ untuk efek anti inflamasi adalah 16.6 mg/kg dan untuk anti nosiseptif adalah 112.20mg/kg, sedangkan menurut Orlando Vieira de Sousa *et al.*(2010)[9] dosis untuk memberikan efek anti inflamasi adalah 200 mg dan 400 mg/kgbb.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa dari fraksi etanol daun sirsak yang berperan sebagai anti inflamasi dalam menghambat aktivitas enzim siklooksigenase-2 (COX-2).

2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi eksperimental dengan pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Data yang didapat berasal dari daya hambat enzim siklooksigenase-2 (COX-2). Daun sirsak diambil perkebunan di Kecamatan Dlingo Kabupaten Bantul, Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta dan dideterminasi oleh Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Indonesia.

Bahan-bahan yang digunakan adalah 1 kg simplisia folium *Annona muricata* Linn., metanol, *n*-heksan, etil asetat, etanol, celecoxib, plat KLT, silika gel GF, penampak bercak, serbuk KBr, COX-2 inhibitor screening KIT (*ovine*), COX Assay Buffer, COX Probe (*in DMSO*), COX Cofactor (*in DMSO*), asam arakidonat, NaOH, COX-2, Celecoxib, DMSO aqua tridestillata, diklorometan.

Tahapan penelitian meliputi beberapa tahap kegiatan, yaitu preparasi serbuk kering daun sirsak, ekstraksi daun sirsak secara bertingkat dimulai secara berturut-turut dari pelarut *n*-heksan; etil asetat; etanol; air serta ekstraksi maserasi dengan air (*infusa*), uji fitokimia, uji aktivitas ekstrak

etanol daun sirsak terhadap siklooksigenase-2 (COX-2) serta analisis data senyawa kimia aktif.

a. Penyiapan Serbuk Daun Sirsak Kering dan Penetapan Kadar Air

Daun sirsak yang digunakan adalah daun tua (bukan daun kuning) yang merupakan daun kelima dari pucuk daun dan dipetik satu persatu secara manual. Sampel daun tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn.) dibersihkan lalu dikeringkan pada suhu kamar selama beberapa hari dan diolah dengan diayak sampai menjadi serbuk dengan derajat kehalusan 4/18 sesuai dengan persyaratan Farmakope Herbal Indonesia.

b. Penyiapan Sampel Ekstrak

Penyiapan sampel ekstrak daun sirsak dilakukan dengan metode maserasi bertingkat mulai dari *n*-heksan; etil asetat; etanol; air dan infusa dengan air dengan perbandingan 1:10. Hasil dari maserasi dan dekok disaring dan filtratnya dikumpulkan. Filtrat kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C sampai diperoleh ekstrak daun sirsak.

c. Uji Aktivitas Enzim Siklooksigenase-2 (COX2) secara *In Vitro*

Pengujian aktivitas penghambatan siklooksigenase dilakukan secara *in vitro* dengan metode penghambatan aktivitas enzim COX-2 terhadap pembentukan prostaglandin dengan menggunakan COX-2 inhibitor screening assay. Analisis data menggunakan spektrofotometri UV-vis dengan *microplate reader*.

Preparasi enzim terdiri atas larutan COX Assay Buffer, COX Probe (*in DMSO*), substrat asam arakidonat, COX Cofactor (*in DMSO*), NaOH, dan COX-2 Human Recombinant. Kemampuan penghambatan COX-2 diperlihatkan oleh lebih rendahnya nilai absorbansi larutan sampel dibandingkan larutan blanko pada pengukuran dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang

535 nm. Pengujian aktivitas ekstrak dilakukan pada konsentrasi 50,40,30 dan 20 ppm.

Obat yang digunakan sebagai standar adalah celecoxib yang merupakan obat golongan NSAID yang selektif terhadap COX-2.

3. Hasil Dan Pembahasan

Hasil rendemen ekstrak kering dapat dilihat pada Tabel 1 berikut:

Tabel 1. Hasil Rendemen Ekstrak Daun Sirsak.

No	Sampel	Bobot (g)	Rendemen (%)*
1.	Heksana	36.00 ± 5.21	3.60
2.	Etil Asetat	44.05 ± 4.63	4.40
3.	Etanol 96%	48.98 ± 4.84	4.90
4.	Air	13.75 ± 4.47	1.38
5.	Air Langsung (infusa)	41.00 ± 1.21	4.10

* dihitung terhadap 1 kg simplisia kering

Pada Tabel 1. menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki rendemen yang paling besar, diikuti ekstrak etil asetat dan *n*-heksana. Perbedaan ketiga ekstrak tidak terlalu besar karena ekstraksi dilakukan secara bertingkat.

A. Uji Aktivitas Penghambatan COX-2

Hasil pengamatan aktivitas penghambatan COX-2 dari ekstrak daun sirsak dapat dilihat pada Tabel 2 berikut:

Tabel 2. Nilai IC₅₀ Ekstrak Daun Sirsak.

No	Sampel	Nilai IC ₅₀ (ppm)
1	Ekstrak etanol 96%	115.93
2	Ekstrak <i>n</i> -heksan	510.44
3	Ekstrak etil asetat	192.41
4	Ekstrak air	312.82
5	Ekstrak air infusa	217.96
6	Celecoxibe (Kontrol Positif)	0.00047

Berdasarkan data yang diperoleh, terlihat bahwa ekstrak daun sirsak memiliki aktivitas terhadap enzim COX-2. Ekstrak yang memiliki aktivitas inhibisi tinggi

terhadap COX-2 adalah ekstrak etanol dengan IC₅₀ 115.93 ppm.

B. Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan pada ekstrak daun sirsak. Hasil uji fitokimia ditunjukkan pada Tabel 3 berikut:

Tabel 3. Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sirsak

No	Kandungan Senyawa	Ekstrak <i>n</i> -heksana	Ekstrak Etil Asetat	Ekstrak Etanol 96%	Ekstrak Air	Ekstrak Air (Infusa)
1	Alkaloida	-	+	+	-	-
2	Flavonoida	-	+	+	+	+
3	Terpenoid	-	-	+	+	+
4	Tanin	-	+	+	+	+
5	Saponin	-	+	+	+	+

Keterangan : - : tidak terdeteksi
+ : terdeteksi

Pada uji alkaloid setelah ditetaskan dengan pereaksi Dragendorf, terbentuk endapan berwarna jingga coklat hal tersebut menandakan bahwa adanya kandungan alkaloid. Hasil positif adanya alkaloid terlihat pada ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol. Pada uji flavonoid, terbentuk merah ungu yang menandakan adanya flavonoida. Hasil uji steroid dan terpenoid dari ekstrak etanol menunjukkan adanya warna jingga atau ungu yang menandakan adanya terpenoid dan warna biru untuk steroid. Hasil tersebut ada pada semua ekstrak kecuali ekstrak *n*-heksan. Hasil positif terhadap uji terpenoid membuktikan adanya senyawa asetogenin yang terdapat dalam daun sirsak merupakan golongan senyawa poliketida. Senyawa poliketida merupakan prekursor dalam pembentukan kompleks senyawa kimia golongan flavonoid dan kompleks isoprenoid. Mekanisme tersebut merupakan bagian dari proses metabolisme primer dan sekunder yang terdapat dalam seluruh tumbuhan [10,11].

Hasil pengamatan aktivitas penghambatan COX-2 dari Isolat subfraksi Fr.EtOH.III.2.1 daun sirsak dapat dilihat pada Tabel 4 berikut:

Tabel 4. Nilai IC₅₀ Isolat daun sirsak.

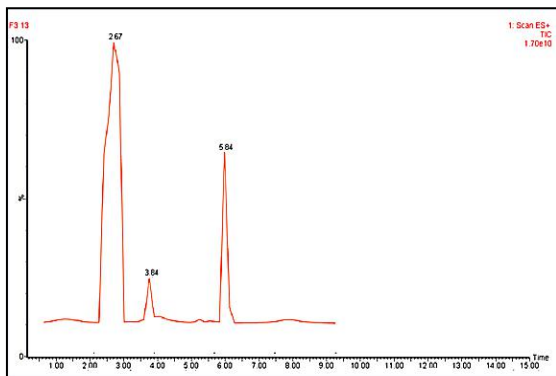
No	Sub subfraksi	Nilai IC ₅₀ (ppm)
1	Fr.EtOH.III.2.1	20.33
2	Fr.EtOH.III.2.2	21.51
3	Fr.EtOH.III.2.3	31.27
4	Fr.EtOH.III.2.4	61.88
5	Fr.EtOH.III.2.5	55.434
6	Celecoxibe (Kontrol Positif)	0.15

Hasil uji aktivitas penghambatan enzim siklooksigenase-2 (COX-2) terhadap isolat senyawa menunjukkan bahwa senyawa yang paling aktif dalam menghambat enzim siklooksigenase-2 (COX-2) adalah sub subfraksi Fr.EtOH.III.2.1 dengan nilai IC₅₀ sebesar 20.3328 ppm.

C. Identifikasi Senyawa Kimia

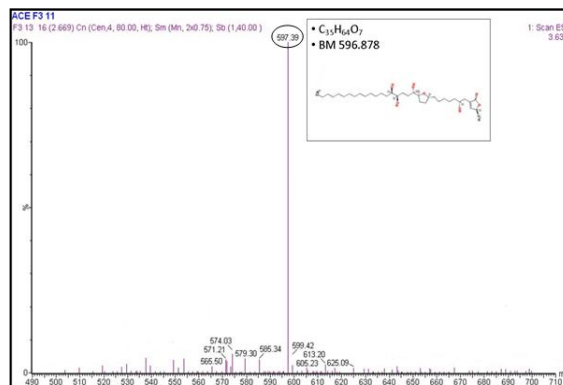
• Data LC-MS

Kromatogram LC menunjukkan hubungan waktu retensi (Rt) dengan % kelimpahan. Setiap puncak yang muncul pada Rt tertentu diduga merupakan 1 senyawa. Kromatogram LC sub subfraksi Fr.EtOH.III.2.1, seperti yang terlihat pada Gambar 1, masih menunjukkan campuran senyawa, terlihat dari munculnya 3 puncak. Senyawa dengan persen (%) kelimpahan yang cukup tinggi muncul pada Rt 2,67 menit, puncak tersebut kemudian diamati pola pemisahan spektrum MS-nya. Gambar Spektrum LC-MS sub subfraksi Fr.EtOH.III.2.1 dapat dilihat pada Gambar 1 dibawah ini:



Gambar 1. Spektrum LC-MS sub subfraksi Fr.EtOH.III.2.1

Sedangkan fragmentasi MS sub subfraksi Fr.EtOH.III.2.1 dapat dilihat pada Gambar 2 berikut:

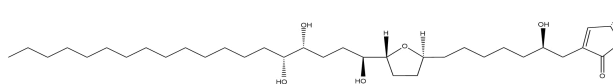


Gambar 2. Fragmentasi MS sub subfraksi Fr.EtOH.III.2.1

Pada Rt 2.67 menit dari sampel sub subfraksi Fr.EtOH.III.2.1 menunjukkan berat molekul (BM) 596.878 g/mol dengan kelimpahan ion molekuler pada m/z 597.39 (M+H). Berdasarkan penelusuran pustaka menurut Zafra *et al.*(1998) [12] senyawa dengan berat molekul (BM) 596.878 g/mol diduga senyawa Gigantetrocin A dengan rumus molekul C₃₅H₆₄O₇. Senyawa Gigantetrocin A merupakan senyawa asetogenin golongan mono-THF- α -monohidroksilat yang terdapat dalam daun sirsak.

Elisya *et al* (2014)[13] telah mengidentifikasi senyawa Gigantetrocin A dari ekstrak daun sirsak menggunakan LC-MS dengan nilai kelimpahan ion molekuler pada m/z 597.1375 (M+H).

Struktur kimia dari senyawa Gigantetrocin A dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur kimia dari senyawa Gigantetrocin A, Zafra *et al.*(1998)[12]

• Data FT-IR

Data yang diperoleh dari FT-IR menunjukkan serapan pada 3430.55 cm⁻¹ yang cukup lebar dan menunjukkan adanya gugus O-H alkohol. Menurut McLaughlin *et al.* (2008)[14] O-H alkohol memiliki ciri khas berupa bentuk serapan yang melebar pada 3600-3300 cm⁻¹. Selain itu adanya gugus ikatan karbonil C=O (lakton) ditunjukkan pada daerah serapan 1624 cm⁻¹.

4. KESIMPULAN

Hasil isolasi dan identifikasi senyawa kimia yang aktif sebagai anti inflamasi dari fraksi etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) diduga adalah senyawa Gigantetrocin A dengan IC₅₀ 20.33 ppm.

5. Daftar Pustaka

- [1]. World Health Organization. World Cancer Report. Geneva.WHO Press 2009.
- [2]. Catherine D, Jacques Ferlay, Silvy F, Jrome V,Freddie B, David F, Martyn P.. Global Burden of Cancers Attributable to Infections in 2008: a Review and Synthetic Analysis. The Lancet Oncology 2012;13: 607-615.
- [3]. Tan Hoa Tjay, Kirana Rahardja.Dinamika Obat. Edisi V. Jakarta: Gramedia, 2002, h 295-311.
- [4]. Maria P, Giulia R, Maria S, Giovanna S, Maria D, Maria T, Stefania Tacconelli, Francesca S, Carlo P, Paola P. Dose Dependent Inhibition of Platelet COX-1 and Monocyte COX-2 by Meloxicam in Healthy Subject, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1999; 290 (3) No.1: 276-280.
- [5]. World Health Organization. Library Cataloguing-in-Publication Data. National policy on Traditional Medicine and Regulation of Herbal Medicines: Report of a WHO global survey.Geneva,May 2005,h 5-6.
- [6]. Leslie T. Technical Data Report for GRAVIOLA (*Annona muricata*), Sage Press, Inc., Austin, 2005,h 3-54.
- [7]. Ana V, Efigenia M, Elhadi M, Eva N, *Annona muricata*: A Comprehensive Review on Its Traditional Medicinal Uses, Phytochemicals, Pharmacological Activities, Mechanisms of Action and Toxicity. Arabian Journal of Chemistry. King Saudi University,2016,h 1-30.
- [8]. Roslida A. H, Chan P. F. Evaluation of Anti-Inflammatory Activities of Ethanolic Extract of *Annona muricata* leaves. Brazilian Journal of Pharmacognosy, Nov./Dec. 2012, 22(6): 1301-1307.
- [9]. Orlando V. S, Glauciemar D. V, José R. G. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models, Int. J. Mol. Sci. 2010, 11, 2067-2078.
- [10].Dewick P.Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach, 3rd Edition, Wiley and Sons, Ltd., Publication,2009.h. 90-93.
- [11].Sarabjot K, Poonam M, Study of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Activity and Antimicrobial Properties of Medicinal Plants. J Microbiol Exp 2014, 1(1): 00005.
- [12].Zafra M, Bruno F, Tera G, Jose R, Diego C. Natural Acetogenins from Annonaceae, Synthesis and Mechanisms of Action. J .Phytochemistry.Vol. 48, No. 7,1087 1117. 1998.
- [13].Elisya Y, Kardono L, Simanjuntak P. Asian Journal of Applied Sciences (ISSN:23210893) Vol.2,Issue3,June 2014.
- [14].McLaughlin J, Paw Paw and Cancer: Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products, J. Nat. Prod. 2008, 71, 1311–1321.