

## AKTIVITAS FRAKSI ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn.) SEBAGAI PENGHAMBATASETILKOLINESTERASE

Antonius Padua Ratu<sup>1,2)</sup>, Siswa Setyahadi<sup>3)</sup>, Partomuan Simanjuntak<sup>4)</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi Universitas Pancasila Jakarta  
email :antoniuspaduaratu@gmail.com

<sup>2</sup>Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor-16151

<sup>3</sup>Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Laptiab, Kawasan  
Puspitek, Serpong-15314

<sup>4</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong, Bogor-  
16912

### Abstrak

*Alzheimer Disease* (AD) adalah jenis penyakit yang umum dari dimensia yang menggambarkan kondisi ketika sel-sel saraf (neuron) di otak mati dan tidak lagi berfungsi normal. Kematian dan kerusakan neuron menyebabkan perubahan memori, perilaku dan kemampuan berpikir jernih. Penghambatan asetilkolinesterase (AChE) dapat dinaikkan jumlah neurotransmitter dan fungsinya. Ini menjadi dasar bahwa peningkatan ketersediaan asetilkolin (ACh) di reseptor asetilkolin dalam otak, menyebabkan neuron mudah ditranspor sehingga meningkatkan fungsi kognitif. Penelitian aktivitas dari fraksi aktif daun sirsak *in vitro* sebagai penghambat AChE dan kinetika penghambatannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mempunyai aktivitas penghambatan AChE dan kinetikannya dalam pengobatan AD. Pengujian aktivitas penghambatan AChE dilakukan berdasarkan metode Ellman. Metode ini menggunakan prinsip hidrolisis reaksi substrat ATCh oleh AChE dengan DNTB yang memberikan warna kuning dan diukur serapannya pada panjang gelombang  $410 \pm 5$  nm. Hasil pengujian penghambatan AChE menunjukkan bahwa Fr. Etanol dari daun *Annona muricata* Linn. memberikan penghambatan tertinggi dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 69.927 mg/L. Hasil fraksinasi Fr. Etanol.1.2.1 mempunyai nilai penghambatan AChE tertinggi dengan nilai  $IC_{50}$  3.651 mg/L. Sementara itu, positif kontrol donepezil HCl dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 0.016 mg/L. Kinetika Fr. Etanol.1.2.1 terhadap penghambatan AChE adalah kompetitif.

**Kata kunci :** Alzheimer, *Annona muricata* Linn., Asetilkolin, Asetilkolinesterase, Kinetika

### 1. Pendahuluan

*Alzheimer Disease* (AD) adalah jenis penyakit yang umum dari dimensia yang menggambarkan kondisi ketika sel-sel saraf (neuron) di otak mati dan tidak lagi berfungsi normal. Kematian dan kerusakan neuron menyebabkan perubahan memori, perilaku dan kemampuan berpikir jernih. Dalam AD, otak mengalami perubahan yang pada akhirnya mengganggu kemampuan individu untuk menjalankan fungsi tubuh dasar seperti berjalan dan menelan, serta akhirnya berakibat fatal [1].

Pada kondisi AD, hidrolisis neuron kolinergik menyebabkan defisitnya jumlah neurotransmitter, asetilkolin (ACh) [2]. Enzim asetilkolinesterase (AChE) yang menghidrolisis ACh, dihambat maka

neurotransmitter dapat dinaikkan jumlah dan fungsinya [3]. Ini menjadi didasarkan asumsi bahwa peningkatan ketersediaan asetilkolin (ACh) di reseptor asetilkolin dalam otak, menyebabkan neuron mudah ditranspor sehingga meningkatkan fungsi kognitif. Saraf kolinergik, dapat ditemukan dalam sistem saraf baik di pusat (SSP) maupun sistem saraf perifer pada jaringan tubuh yang berbeda [4].

Obat sintetis yang disetujui oleh FDA telah digunakan dalam pengobatan AD seperti *tacrine*, *rivastigmine* dan *donepezil* dengan tingkat keberhasilan sampai batas tertentu dalam memperlambat neurodegeneration pada pasien AD, dengan efek samping yang meliputi gangguan di saluran pencernaan, toksisitas hati terkait,

agresi dan depresi [5]. Semua keterbatasan ini mendesak untuk mencari senyawa baru dari berbagai sumber termasuk produk alami berbasis tanaman, dimana berbagai kandungan kimianya telah dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan kolinesterase (ChE)[6].

Sampaio et al melakukan penelitian terhadap aktivitas penghambatan AChE dari familia Annonacea, yaitu dari biji buah sirsak (*Annona muricata* Linn). Hasil pengujian penghambatan AChE dengan metode Ellman menunjukkan bahwa ekstrak heksana dan etanol biji sirsak menunjukkan adanya penghambatan AChE [7]. Kandungan senyawa kimia yang sama baik di biji buah maupun di daun sirsak yaitu asetogenin, alkaloid, asetogenin, dan fenol[8].

Berdasarkan data penelitian tersebut maka perlu dilakukan penelitian aktivitas dari fraksi aktif daun sirsak *in vitro* sebagai penghambatan AChE dan kinetika penghambatannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mempunyai aktivitas penghambatan AChE dan kinetikannya dalam pengobatan AD.

**2. Metode Penelitian**

**• Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun sirsak; *n*-heksan; etil asetat; etanol 96% ; akuades; metanol, dikolorometana, kloroform, *well microplate*; DNTB (5,5'-ditiobis-(asam 2-nitrobenzoat); ATCh (asetiltiokolin); AChE; akuabides; plat KLT GF<sub>254</sub>; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; serum sulfat.

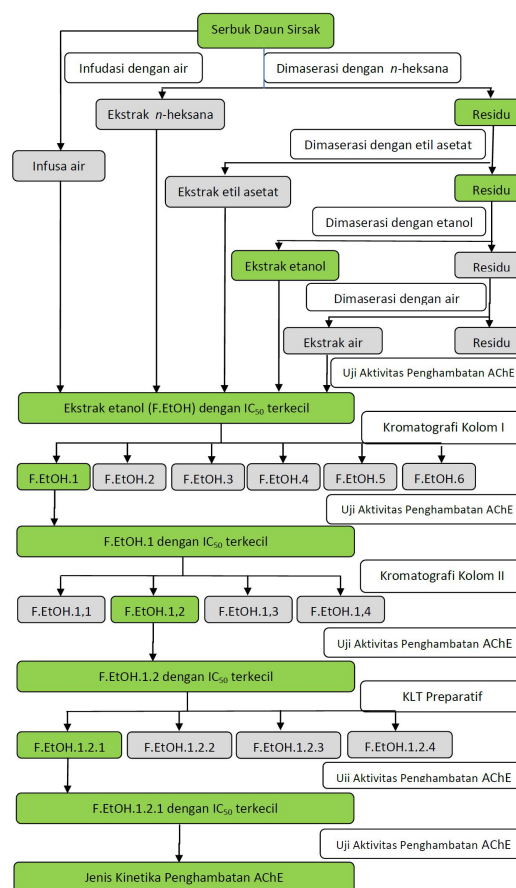
**• Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary evaporator*, sepktofotometer UV-VIS *microplate reader*; peralatan gelas; peralatan *micro pipet*; oven; dan kromatografi kolom

**• Pembuatan Ekstrak**

Pada penelitian ini, proses ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dengan beberapa pelarut dan infudasi dengan air (infusa air). Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi daun sirsak berturut-turut *n*-heksana, etil asetat, etanol 96% dan air. Filtrat yang diperoleh diuapkan dan

dipekatkan untuk dihitung rendemennya. Adapun skema alur penelitian keseluruhan tersaji seperti pada gambar 1 berikut



**Gambar 1.** Skema penelitian

**• Fraksinasi Ekstrak Etanol**

Ekstrak Etanol daun sirsak difraksinasi dengan kromatografi kolom (silika gel, diklorometana dan metanol = 20 : 1 sampai 1 : 1; metanol) diperoleh 6 fraksi (Fr.Etanol.1 - Fr.Etanol.6). Fraksi Fr.Etanol.1 difraksinasi kembali dengan kromatografi kolom (SiO<sub>2</sub>, *n*-heksana dan etil asetat = 10 : 1 sampai 1 : 1) memberikan 4 fraksi (Fr.Etanol.1.1 - Fr.Etanol.1.4). Kemudian Fr.Etanol.1.2 dimurnikan dengan KLT preparatif (*n*-heksana dan etil asetat = 1 : 1). Isolat hasil KLT preparatif dilakukan pengujian kinetika penghambatan AChE

**• Pengujian Aktivitas Penghambatan AChE**

Pengujian aktivitas penghambatan AChE dengan Metode Ellman. Pengujian ekstrak dan fraksi menggunakan substansi

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 410 nm [9].

**• Pengujian Kinetika Penghambatan AChE**

Fraksi F.EtOH.1.2.1 dibuat tiga konsentrasi berbeda dan tiga konsentrasi substrat yang beda. Sampel pengujian 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<sub>m</sub>. Titik potong persamaan dengan sumbu y adalah 1/V<sub>maks</sub> [10,11,12].

**3. Hasil dan Pembahasan**

**• Rendemen Ekstrak**

Hasil maserasi simplisia daun *Annona muricata* Linn dengan pelarut n-heksana, etil asetat, etanol 96% dan air diperoleh rendemen sebesar 2.87%, 3.40%, 3.59%, 1.07%. Infusa air diperoleh rendemen sebesar 3.15%. Pemilihan pelarut tersebut bertujuan untuk memperoleh senyawa non polar, semipolar dan polar. Pemilihan infudasi bertujuan untuk memperoleh senyawa yang polar yang larut dalam suhu infudasi.

**• Skrining Fitokimia**

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol, air dan infudasi memiliki kandungan komponen senyawa flavonoid, tanin dan saponin. Hal ini terjadi karena pelarut etanol dan air bersifat polar yang dapat menarik komponen senyawa polar seperti flavonoid, tanin dan saponin serta dapat menarik senyawa steroid yang kurang polar. Berdasarkan penelitian lain diketahui bahwa ekstrak etanol daun sirsak mengandung tanin, flavonoid, saponin, triterpenoid dan alkaloid [13]. Penelitian lain juga diketahui bahwa ekstrak etanol

daun sirsak menunjukkan adanya flavonoid, steroid dan triterpenoid [14]. Hasil uji penapisan fitokimia ditampilkan pada Tabel 1 berikut:

**Tabel 1.** Hasil skrining fitokimia

Kandungan senyawa	Ekstrak				Infusa air
	n-heksana	etil asetat	etanol 96%	air	
Alkaloida	-	+	+	-	-
Flavonoid	-	+	+	+	+
Terpenoid	-	-	+	-	-
Tanin	-	-	+	+	+
Saponin	-	-	+	+	+
Steroid	+	+	+	-	-

**• Pengujian Aktivitas Penghambatan AChE**

Pengujian aktivitas penghambatan AChE dilakukan dengan menggunakan microplate. Hasil pengujian aktivitas penghambatan AChE oleh ekstrak ditunjukkan pada Tabel 2 berikut:

**Tabel 2.** Hasil uji aktivitas penghambatan AChE oleh ekstrak

Sampel uji	Nilai IC <sub>50</sub> (mg/L)
Donepezil HCl	0.014
Ekstrak n-heksana	319.655
Ekstrak etil asetat	237.549
Ekstrak etanol	69.927
Ekstrak air	419.783
Infusa air	472.736

Pada tabel 2, Satuan standar yang digunakan adalah IC<sub>50</sub> untuk menentukan aktivitas penghambatan ekstrak, fraksi maupun senyawa dapat dijadikan sebagai obat Alzheimer. Pada penelitian ini ekstrak yang dipilih untuk dimurnikan adalah ekstrak etanol 96% (Fr.Etanol) dipilih karena mempunyai nilai IC<sub>50</sub> terkecil yaitu sebesar 69.927 mg/L.

**• Pengujian Aktivitas Penghambatan AChE oleh Hasil Fraksinasi Kromatografi Kolom**

Hasil pengujian penghambatan AChE oleh fraksi hasil kromatografi kolom I (Fr.Etanol.1-Fr.Etanol.6) ditunjukkan pada Tabel 3 berikut:

**Tabel 3.** Hasil pengujian aktivitas penghambatan AChE oleh fraksi hasil kromatografi kolom I terhadap

Sampel uji	Nilai IC <sub>50</sub> (mg/L)
Donepezil HCl	0.013
Fr. Etanol.1	13.650
Fr. Etanol.2	167.575
Fr. Etanol.3	172.488
Fr. Etanol.4	177.186
Fr. Etanol.5	90.907
Fr. Etanol.6	179.647

Pada tabel 3 bahwa Fr.Etanol.1 adalah fraksi yang paling aktif karena mempunyai nilai IC<sub>50</sub> terkecil yaitu sebesar 13.650 mg/L.

Sedangkan Subfraksi yang dipilih berdasarkan hasil uji aktivitas 4 subfraksi terhadap penghambatan AChE. Hasil pengujian penghambatan AChE oleh sub fraksi hasil kromatografi kolom II (4 subfraksi) ditunjukkan pada Tabel 4 berikut:

**Tabel 4.** Hasil uji aktivitas penghambatan AChE oleh subfraksi hasil kromatografi kolom II

Sampel uji	Nilai IC <sub>50</sub> (mg/L)
Donepezil HCl	0.019
Fr. Etanol.1.1	119.741
Fr. Etanol.1.2	2.427
Fr. Etanol.1.3	7.235
Fr. Etanol.1.4	50.834

Data pada tabel 4 menunjukkan bahwa Fr.Etanol.1.2 dari hasil fraksinasi kromatografi kolom II yang mempunyai aktivitas penghambatan AChE terbesar dengan nilai IC<sub>50</sub> terkecil yaitu sebesar 2.427 mg/L dan dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan KLT preparatif untuk mendapatkan senyawa yang lebih murni.

Pemurnian Fr.Etanol.1.2 dengan kromatografi lapis tipis preparatif. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 1 : 1. Hasil KLT preparatif diperoleh 4 *spot*, berdasarkan visual UV 254 nm pada KLT. Empat *spot* yang diperoleh

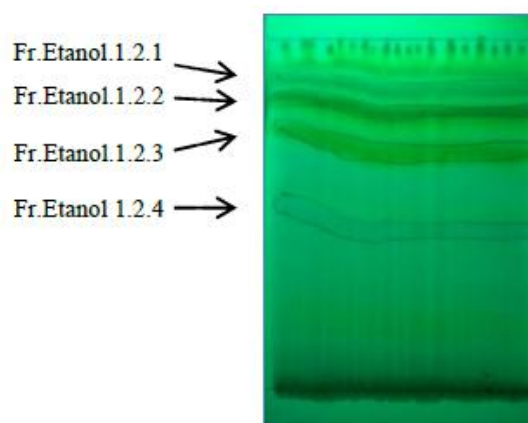
kemudian dilakukan pengujian aktivitas penghambatan AChE.

Sub subfraksi yang dipilih berdasarkan hasil uji aktivitas penghambatan AChE oleh 4 sub subfraksi. Hasil pengujian aktivitas penghambatan AChE oleh sub subfraksi hasil KLT preparatif ditunjukkan pada tabel 5 berikut:

**Tabel 5.** Hasil pengujian aktivitas penghambatan AChE oleh hasil KLT preparatif Fr.Etanol.1.2

Sampel uji	Nilai IC <sub>50</sub> (mg/L)
Donepezil HCl	0.018
Fr.Etanol.1.2.1	3.651
Fr.Etanol.1.2.2	4.292
Fr.Etanol.1.2.3	7.685
Fr.Etanol.1.2.4	6.353

Hasil pengujian aktivitas penghambatan AChE oleh Fr.Etanol.1.2.1 dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 3.651 mg/L dan IC<sub>50</sub> donepezil HCl sebesar 0.018 mg/L. sedangkan hasil kromatogramnya seperti pada gambar 2 berikut:

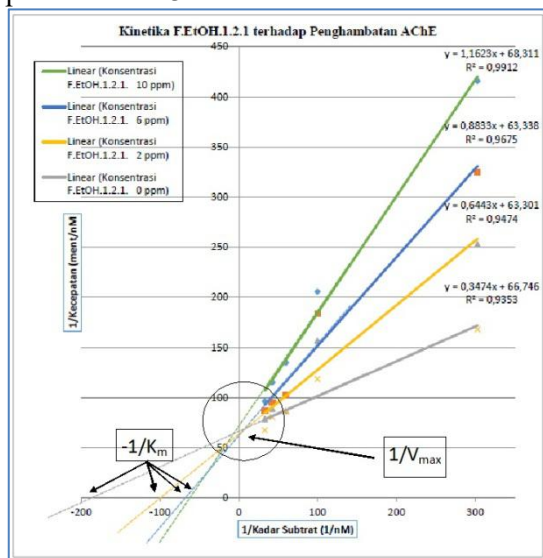


**Gambar 2.** Kromatogram lapis tipis preparatif subfraksi 2 (Fr.Etanol.1.2) pada UV 254 nm.

Berdasarkan hasil kromatogram Gambar 2 menunjukkan *spot* yang terdapat pada setiap sub subfraksi jumlahnya semakin sedikit dibandingkan kromatogram sub fraksi hasil kromatografi kolom sebelumnya, hal ini menunjukkan sub subfraksi yang diperoleh semakin murni.

- **Pengujian Kinetika Penghambatan AChE oleh Fr.Etanol.1.2.1**

Pengujian kinetika penghambatan AChE oleh Fr.Etanol.1.2.1 menunjukkan aktivitas penghambatan adalah kompetitif. Aktivitas penghambatan ini tersaji seperti pada Gambar 3 berikut:



Gambar 3. Kinetika penghambatan AChE oleh Fr.Etanol.1.2.1

Sedangkan hasil Pengujian kinetika penghambatan AChE oleh Fr.Etanol.1.2.1 untuk harga  $K_m$  dan  $V_{maks}$  Kinetika penghambatan AChE oleh Fr.Etanol.1.2. tersaji seperti pada tabel 6 berikut:

Tabel 6. Harga  $K_m$  dan  $V_{maks}$  Kinetika penghambatan AChE oleh Fr.Etanol.1.2.

Konsentrasi Fr.Etanol.1.2.1 (mg/L)	$K_m$ (nM)	$V_{maks}$ (nM/menit)
0	0.0052	0.0150
2	0.0102	0.0158
6	0.0139	0.0158
10	0.0170	0.0146

Pada gambar 3 menunjukkan titik potong keempat kinetika enzim berada di sumbu y sehingga nilai  $V_{maks}$  sama dan  $K_m$  berbeda-beda seperti pada Tabel 6. Kompetitif berarti senyawa-senyawa yang terdapat dalam Fr.Etanol.1.2.1 mengikat enzim secara kompetitif bersaing dengan substrat. Ketika konsentrasi senyawa berkurang maka ikatan dengan enzim berkurang. Penghambatan enzim juga

berkurang maka enzim akan mudah mengubah substrat [10,11,12].

#### 4. Kesimpulan

Fr.Etanol.2.1 mempunyai aktivitas penghambatan AChE sebesar  $IC_{50}$  3.651 mg/L dengan kontrol positif donepezil HCl sebesar  $IC_{50}$  0.016 mg/L. Kinetika penghambatan AChE oleh Fr.Etanol.1.2.1 terhadap adalah kompetitif.

#### 5. Daftar Pustaka

- [1]. Alzheimer's Association. 2013. Alzheimer's Association Report 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 9: 208-45.
- [2]. Wenk, GL. 2006. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *J Clin Psychiatry*. 67 (3) : 3-7.[5]. Nordberg, A., dan Svensson, A.L. 1998 Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimers disease (A comparison of tolerability and pharmacology). *Drug safety*. 19(6): 465-80.
- [3]. Wu, C.K., Thal, L., Pizzo, D., Hansen, L., Masliah, E., dan Geula, C. 2005. Apoptotic signals within the basal forebrain cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*.195 : 484 - 96[4]. Silman, I., dan Sussman, J.L. 2005. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*. 5:293-302.
- [6]. Mukherjee, P.K., Kumarb, V., Malb, M., dan Houghtona, P.J. 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 14 : 289-300.
- [7]. Sampaio, C.G., Trevisan, M.T.S., Brito, E.S., Santiago, G.M.P., Feitosa, C.M., Carvalho, J.I.X., et.al. 2008. Screening for acetylcholinesterase inhibitor from seeds to treat Alzheimer's. *Proceeding 4<sup>th</sup> Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry Disease, Division of Medicinal*

- Chemistry, Brazilian Chemical Society (SBQ). BrazMedChem.*
- [8]. Moghadamtousi, S.Z. , Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H.M., Kadir, H.A. 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*.16:15625-58.
- [9]. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., dan Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase inhibitor activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95.
- [10]. Rhee, I.K., van de Meent, M., Ingkaninan, K., dan Verpoorte, R. 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*.915 : 217-23.
- [11]. Silverman, R.B. 2002. *The Organic Chemistry of Enzyme Catalysed Reaction*. Academic Press. h 563-84.
- [12]. Wetwitayaklung, P., Limmatvapirat, C., Phaechamud, T., dan Keokitichai, S. 2007. Kinetics of acetylcholinesterase inhibition of *Quisqualis indica* Linn. flower extract. *Silpakorn University Science and Technology Journal*.1(2): 20-7.
- [13]. Usunobun, U., Okolie, N.P., Anyanwu, O.G., dan Adegbeji, A.J. 2014. Phytochemical screening and proximate composition of *Annona muricata* leaves. *European Journal of Botany Plant Science and Pathology*. 2(8): 18-28.
- [14]. Torres, R.C., Manalo, C.O., Walde, R.Z.M.L., dan Garbo AG. 2015. Characterization of the Leaf Extract of *Annona muricata* and Larvicidal Activity against *Aedes aegypti*. *Time Journals of Biological Sciences and Technology* . 2(3):33-40.