

## PENGARUH EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn.) TERHADAP AKTIVITAS INHIBISIENZIM ASETILKOLINESTERASE

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

<sup>1</sup> Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi Universitas Pancasila Jakarta

email : [antoniuspaduaratu@gmail.com](mailto:antoniuspaduaratu@gmail.com)

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

<sup>3</sup> Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong Bogor

<sup>4</sup> BPPT Puspitek Serpong

### Abstract

*Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that is reversible form of dementia. AChE inhibition played a key role not only to enhance cholinergic transmission in the brain but also to reduce the aggregation of A $\beta$  and the formation of neurotoxic fibrils in AD patients. Therefore, inhibition of AChE and BChE has become an outstanding alternative in the treatment of AD. Research on soursop leaf extract aims to determine the activity in the treatment of AD through the activity of AChE inhibition of soursop leaf. AChE inhibitory activity test was carried out based on the method of Ellman et al. (1961). This method is based on the reaction hydrolysis substrate ATCh by AChE that gives the yellow color wavelength of 405 nm. AChE inhibition test results showed that the 96% ethanol extract of the leaves of *Annona muricata* Linn. has the best inhibitory activity with IC<sub>50</sub> of 103.65 mg / L. was quoted extracts ethyl acetate, n-hexane, water direct and indirect water has inhibitory activity of each 339.84 mg / L, 429.36 mg / L, 563.41 mg / L and 598.33 mg / L. Meanwhile, the positive control IC<sub>50</sub> value donepezil HCl with IC<sub>50</sub> 5.29 nM (2.20  $\mu$ g/L).*

**Keywords:** *Acetylcholinesterase, Alzheimer, Annona muricata Linn, Ellman method*

### 1. PENDAHULUAN

Penyakit Alzheimer (*Alzheimer Disease*, AD) adalah penyakit neurodegeneratif yang bersifat reversibel berupa demensia yang mempengaruhi lebih dari 35 juta orang di seluruh dunia dan jumlah ini diyakini mencapai 65.700.000 pada tahun 2030(Singhal et.al. 2012). Penyakit ini mengakibatkan hilangnya progresif memori, kognitif dan kerusakan hampir semua fungsi intelektual (Singhal et.al. 2012, Ferreira et. al. 2006).

Patogenesis AD adalah kompleks dan terdiri faktor genetik dan lingkungan, sehingga penyakit ini dianggap penyakit multifaktorial(Williams et.al. 2011, Dall'Acqua2013).Hipotesis yang berbeda mengenai rute patologis AD telah diusulkan dan dua hipotesis utama terkait dengan kolinergik yaitumiloid- $\beta$  (A $\beta$ ), dan protein *tau*.Untuk alasan tersebut , pengembangan obat AD terhadap terapi molekul melalui kolinesterase {asetilkolinesterase (AChE) dan

(butirilkoliesterase (BuChE)}, amiloidgenik sekretase ( $\beta$  atau  $\gamma$ -sekretase), agregasi A $\beta$ , fosforilasi *tau* dan fibrilasi serta *metal ion redox/reactive oxygen species* (ROS) (Mohamed et.al. 2011).

Penelitian Hodges tahun 2006 menunjukkan bahwa inhibisiinhibisi AChE memegang peran kunci tidak hanya untuk meningkatkan transmisi kolinergik di otak tetapi juga untuk mengurangi agregasi A $\beta$  dan pembentukan fibril neurotoksik pada pasien AD. Oleh karena itu, inhibisi AChE dan BChE telah menjadi alternatif yang luar biasa dalam pengobatan AD (Orhan et. al. 2004).Ada obat antikolinesterase, misalnya, tacrine, donepezil, physostigmine, galantamine dan heptylphysostigmine untuk pengobatan demensia dilaporkan memiliki beberapa efek samping yang berbahaya seperti hepatotoksisitas, durasi pendek, bioavailabilitas rendah, efek samping kolinergik merugikan di saraf tepi dan jendela terapeutik yang sempit (Hung et.al. 2008).

Penelitian terhadap ekstrak tanaman yang selektif inhibisi AChE adalah sangat penting untuk menemukan senyawa baru dan mempunyai potensi yang lebih sebagai inhibisi AChE. Banyak skrining tanaman yang berpotensi kemudian diekstraksi dan diisolasi sehingga diperoleh senyawa murni yang mempunyai aktivitas inhibisi AChE dan atau BuChE. Familia tanaman yang sudah dilakukan pengujian aktivitas inhibisi AChE adalah Amaryllidaceae, Boraginaceae, Chenopodiaceae, Lamiaceae, Liliaceae dan Solanaceae (Houghton et.al. 2004, Rhee et. al.2004, Ahmad et.al. 2003, Ferheen at.al. 2005, Ahmad et.al. 2005, Atta-ur-Rahman et.al.2004, Choudhary et.al.2004).

## 2. KAJIAN LITERATUR DAN PENGEMBANGAN HIPOTESIS

Penelitian terhadap aktivitas inhibisi AChE pada familia Annonacea sudah dilakukan di di Brazil, yaitu dari biji buah sirsak (*Annona muricata* Linn). Proses ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut heksana, etanol dan metanol, kemudian dilakukan pengujian terhadap inhibisi enzim asetilkolinesterase dengan metode Elmann yang dimodifikasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan silika gel. Hasil yang diperoleh dalam ekstrak yang dibandingkan dengan kontrol positif standar. Aktivitas inhibisi asetilkolinesterase pada ekstrak heksana dan etanol biji buah sirsak menunjukkan inhibisi yang kuat (Sampaio et. al. 2008).

Pada penelitian terhadap daun sirsak sudah dilakukan di beberapa negara yang menunjukkan aktivitas sitotoksik, antibakteri dan antioksidan, kanker payudara, antineoplastik, kemoprotektif, antihiperbilirunemia dan hipoglikemia (Owolabi et.,al. 2013, Abubacker et. al. 2012, Rachmani et. al. 2012, George et. al. 2012, Hamizah et.al.2012. Arthur et. al. 2012, Adewole et. al. 2006).

Namun demikian dari banyak penelitian terhadap daun sirsak tersebut diatas, sampai saat ini belum ada yang melakukan penelitian terhadap aktivitas inhibisi AChE. Penelitian terhadap aktivitas inhibisi AChE sampai saat ini baru pada biji buah, belum daun sirsak.

Untuk itu perlu penelitian dari ekstrak daun sirsak bertujuan untuk mengetahui aktivitas dalam pengobatan AD melalui aktivitas inhibisi AChE dari daun sirsak.

## 3. 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; ATCh; AChE; akuabides; plat KLT; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; serum sulfat; donepezil HCl.

### Alat

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

### Pembuatan Ekstrak

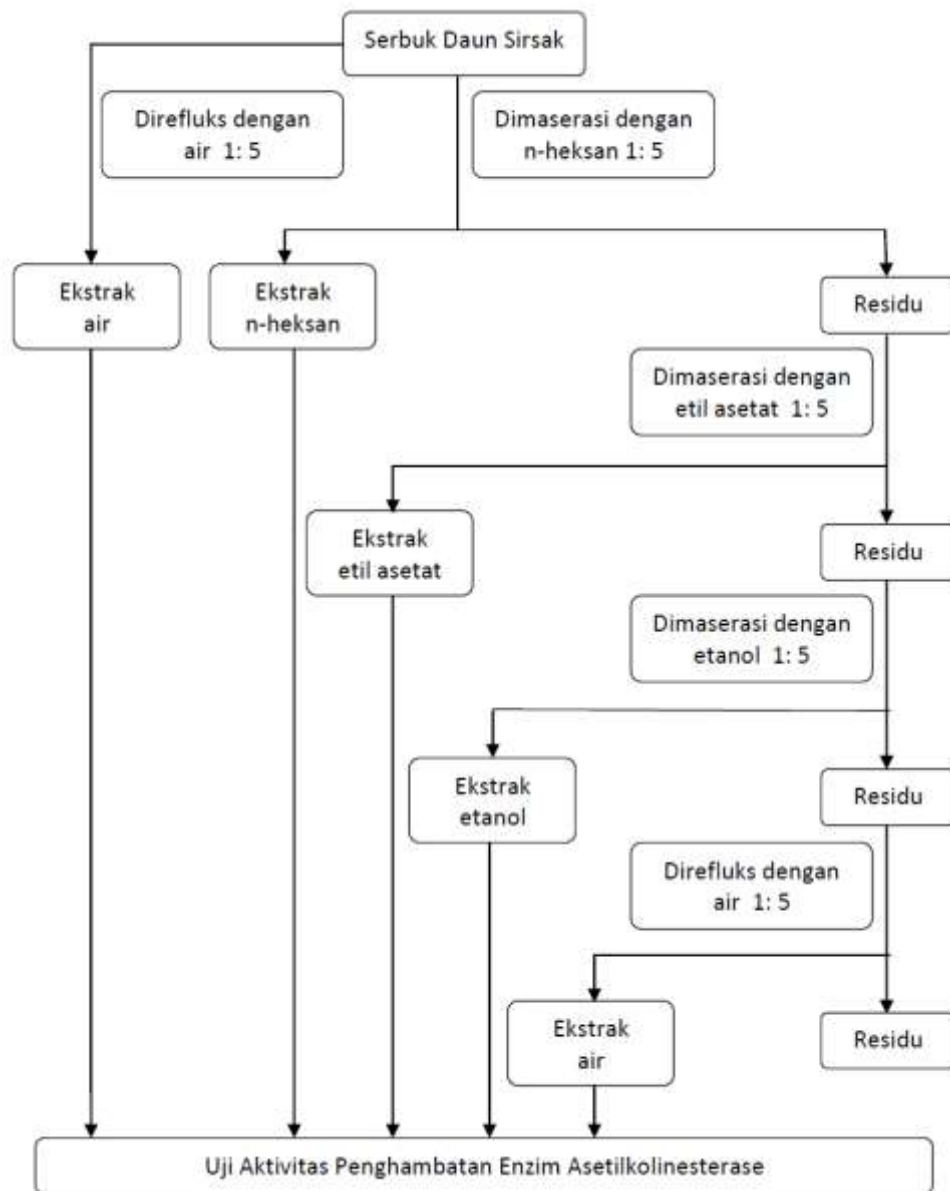
Pada penelitian ini, proses ekstraksi dilakukan dengan cararefluks dan maserasi (gambar 1).Sebanyak 1000 gram serbuk simplisia daun sirsak dimaserasi dengan n-heksan, didiamkan selama 3 hari. Setelah 3 hari ekstrak disaring, filtrat diuapkan, residu dimaserasi dengan etil asetat selama 3 hari. Setelah 3 hari ekstrak disaring, filtrat diuapkan, residu dimaserasi dengan etanol 96% selama 3 hari. Setelah 3 hari disaring, filtrat diuapkan, residu direfluks dengan air. Kemudian disaring, filtrat diuapkan. Pada proses maserasi selama 24-72 jam dengan sesekali diaduk dan setelah itu disaring. Masing-masing filtratnya dipekatkan dengan *rotary evaporator*, kemudian dikeringkan di atas penangas air dan disimpan dalam desikator sebelum digunakan untuk pengujian aktivitas inhibisi AChE.

### Pengujian Aktivitas Inhibisi AchE dengan Metode Ellman (Kovarik et al. 2003, Ellman et.al.1961, Rhee et. al. 2001)

#### a. Larutan stok

- 1) Larutan stok DTNB (5,5'-ditiobis-(asam 2-nitrobenzoat)  
Ditambahkan sebanyak 0,6 mL larutan dapar (Komponen B) kedalam vial DTNB (Komponen A) untuk membuat larutan stok DTNB.

- 2) Larutan stok ATCl (asetiltiokolin)  
Ditambahkan sebanyak 0,6 mL akuabides ke vial ATCh (Komponen C).
  - 3) Larutan stok AChE (asetilkolinesterase)  
Ditambahkan sebanyak 100  $\mu$ L akuabides dengan 0,1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) ke vial AChE standar (Komponen D) untuk membuat 50 unit/mL larutan stok AChE.
- b. Pereaksi ATCh  
Disiapkan campuran pereaksi asetilkolin menurut Tabel 1 dan terlindung dari cahaya.
- c. Pengenceran berseri standar AChE (0-1000 mU/ mL)
- 1) Ditambahkan 20  $\mu$ L 50 unit / mL larutan stok AChE (dari langkah a.3)) ke dalam 980  $\mu$ L larutan dapar (Komponen B) sehingga diperoleh 1000 mU / mL larutan standar AChE.
  - 2) Diambil 200  $\mu$ L 1000 mU / mL standar AChE untuk dilakukan pengenceran berseri sehingga diperoleh 250 ; 62,5 ; 15,625; 3,9062; 0,9765 ; 0,2441 dan 0,0610 mU / mL standar AChE.
  - 3) Dimasukkan standar AChE dan sampel uji ke dalam 96 sumur *micro plate* yang jernih.
- d. Pengujian Aktivitas AChE
- 4) Ditambahkan campuran pereaksi ATCh (dari langkah b.1)) ke masing-masing sumur (lihat langkah c.3)) sehingga total volume uji asetilkolinesterase sebanyak 150  $\mu$ L tiap sumur.
  - 5) Diinkubasi selama 10 sampai 30 menit pada suhu kamar, terlindung dari cahaya.
  - 6) Dilakukan pengukuran serapan pada panjang gelombang  $410 \pm 5$  nm.



Gambar 1. Skema Kerja Penelitian

Tabel 1. Campuran pereaksi asetilkolin untuk satu *microplate* dengan 96 sumur

Komponen	Volume
Larutan Dapar (Komponen B)	4,5 ml
Larutan Stok DTNB	250 $\mu$ l
Larutan Stok ATCh	250 $\mu$ l
Total Volume	5 ml

Tabel 2. Campuran dalam satu sumur *microplate*

Komponen	Kontrol	Standar	Volume $\mu$ l		
			Sampel	Blanko Standar	Blanko Sampel
Dapar	50	0	0	50	50
Standar	0	50	0	50	0
Sampel	0	0	50	0	50
AChE	50	50	50	50	50
ATCh	50	50	50	0	0

#### 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen dan kadar air dalam ekstrak yang dihasilkan dapat dilihat pada tabel 3 dan 4.

Pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa kadar air masih memenuhi batas yaitu di bawah 10%.

Tabel 3. Rendemen Ekstrak Daun Sirsak

Sampel	%
Ekstrak air langsung daun sirsak	4,63
Ekstrak n-heksana daun sirsak	2,09
Ekstrak etil asetat daun sirsak	2,62
Ekstrak etanol 96% daun sirsak	2,89
Ekstrak air tidak langsung daun sirsak	0,95

Tabel 4. Kadar Air

Sampel	%			
	1	2	3	Rata-rata
Simplisia Daun Sirsak	6,5	7,0	7,2	6,9

Uji aktivitas inhibisi AChE dilakukan berdasarkan metode Ellman et al. (1961). Metode ini berdasarkan pada reaksi hidrolisis substrat ATCh oleh AChE. Dengan demikian, IC<sub>50</sub> menunjukkan konsentrasi yang dapat menghambat reaksi hidrolisis ATCh menjadi asetat dan tiokolina sebesar 50%. Nilai IC<sub>50</sub> yang semakin kecil menunjukkan aktivitas inhibisi oleh ekstrak yang semakin baik. Hasil uji inhibisi AChE (Tabel 4) menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% dari daun *Annona muricata* Linn. memiliki aktivitas inhibisi terbaik dengan IC<sub>50</sub> sebesar 103,65 mg/L. Ekstrak etil asetat, n-heksana, air langsung dan air tidak langsung memiliki aktivitas inhibisi masing-masing 339,84 mg/L, 429,36 mg/L, 563,41 mg/L dan 598,33 mg/L. Hal ini sejalan penelitian yang dilakukan oleh Sampaio et al tahun 2008 yang menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana dan etanol dari biji

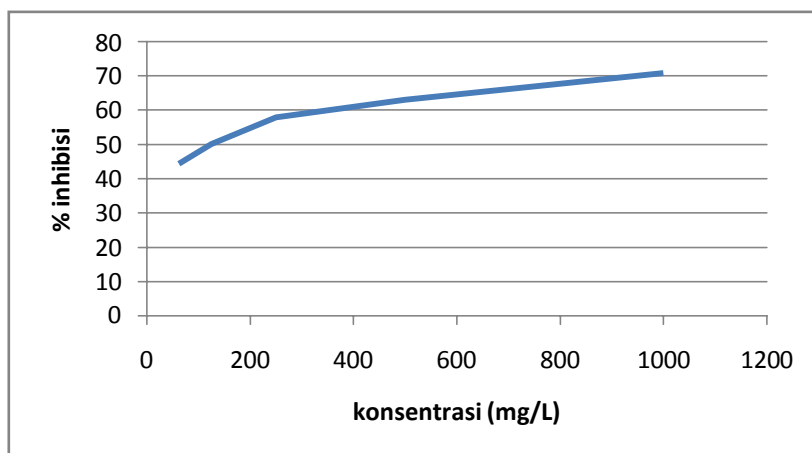
buah sirsak menunjukkan aktivitas inhibisi AChE yang kuat.

Sementara itu, nilai IC<sub>50</sub> kontrol positif donepezil HCl dengan IC<sub>50</sub> sebesar 5,29 nM (2,20  $\mu$ g/L). Pemilihan donepezil HCl sebagai kontrol positif karena donepezil HCl merupakan salah satu obat yang mempunyai aktivitas inhibisi AChE. Donepezil Sangat selektif sebagai inhibisi AChE dan direkomendasikan untuk AD ringan, sedang, dan berat (Metha 2012).

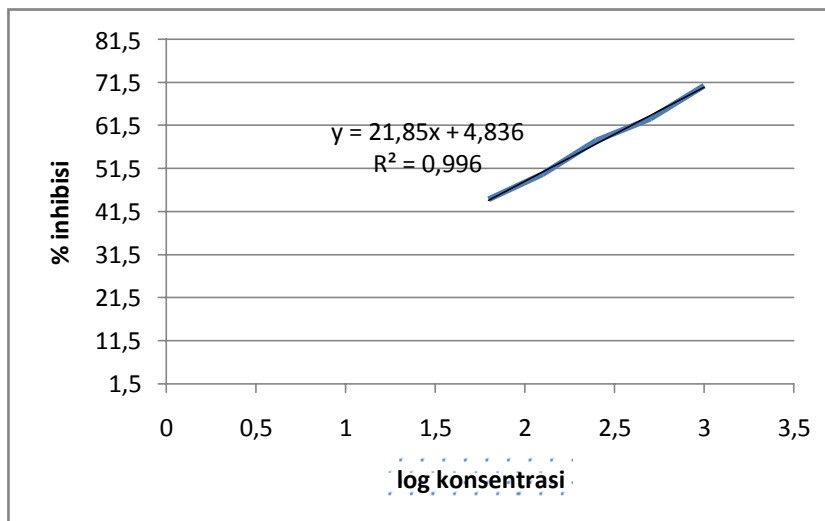
Studi terbaru terikat penyakit Alzheimer untuk proses inflamasi yang disebabkan oleh zat oksigen reaktif. Stres oksidatif mempunyai peranan terhadap fisiopatologi degenerasi neuronal. AChE enzim dianggap terkait dengan mekanisme disfungsi memori Penyakit Alzheimer (AD) (Cole et al., 2005).

Tabel 5. Hasil IC50 Pengujian Inhibisi Asetilkolinesterase

Uji	IC 50
Infusa Daun Sirsak	563,41 mg/L
Ekstrak n-heksana daun sirsak	429,36 mg/L
Ekstrak etil asetat daun sirsak	339,84mg/L
Ekstrak etanol 96% daun sirsak	103,65 mg/L
Ekstrak air	598,33mg/L
Donepezil HCl	0,002 mg/L



Gambar 2. Grafik Konsentrasi dan % Inhibisi Ekstrak Etanol



Gambar 3. Grafik Log Konsentrasi dan % Inhibisi Ekstrak Etanol

Hasil KLT dengan beberapa eluen menunjukkan adanya beberapa noda baik secara pengamatan langsung maupun dengan penampak noda serum sulfat. Hasil ini selain

menunjukkan adanya senyawa organik, juga digunakan untuk menentukan eluen pada pemisahan dengan kromatografi kolom.



Gambar 4. Hasil KLT Ekstrak Etanol

1. Eluen Diklorometana : Metanol = 20 : 1, A : Penyemprot Serium Sulfat, B : Cahaya Tampak
2. Eluen Diklorometana : Metanol = 10 : 1, A : Penyemprot Serium Sulfat, B : Cahaya Tampak
3. Eluen Diklorometana : Metanol = 5 : 1, A : Penyemprot Serium Sulfat, B : Cahaya Tampak
4. Eluen Diklorometana : Metanol = 2 : 1, A : Penyemprot Serium Sulfat, B : Cahaya Tampak
5. Eluen Metanol, A : Penyemprot Serium Sulfat, B : Cahaya Tampak

## 5. SIMPULAN

Hasil penelitian terhadap beberapa pelarut dari ekstrak daun sirsak menunjukkan bahwa ekstrak etanol menunjukkan aktivitas tertinggi terhadap inhibisi asetilkolinesterase dengan IC<sub>50</sub> sebesar 103,63 mg/L. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan kromatografi kolom sampai dengan elusidasi struktur untuk mendapatkan senyawa yang lebih murni.

## 6. REFERENSI

- Singhal, AK., Naithani, V., Bangar, OP. 2012. Medicinal plants with a potential to treat Alzheimer and associated symptoms. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*. 2(2):84-91.
- Ferreira, A, Proença, C, Serralheiro, MLM, Araújo, MEM. 2006. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*. 108(1):31-37.
- Williams, P., Sorribas, A., Howes, MJ. 2011. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Nat Prod Rep*. 28(1):48-77.
- Dall'Acqua, S. 2013. Plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids for the treatment of Alzheimer's disease. *Botanics: Targets and Therapy*. 3 :19-28
- Mohamed, T., Rao, PPN. 2011. Alzheimer's disease: Emerging trends in small molecule therapies. *Curr Med Chem*. 18(28):4299-4320.
- Hodges, JR. 2006. Alzheimer's centennial legacy: origins, landmarks and the current status of knowledge concerning cognitive aspects. *Brain*. 129: 2811-2822.
- Orhan, I., Sene,r B., Choudhary, MI., Khalid, A. 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*. 91: 57-60.
- Hung, TM., Ngoc, TM., Youn, UJ., Min ,BS., Na, M., Thuong, PT., Bae, K. 2008. Anti-amnestic activity of pseudocoptisine from *Corydalis tuber*. *Biol. Pharm. Bull*. 31: 159-162,
- Houghton, PJ., Agbedahunsi, JM., Adegbulugbe, A. 2004. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochemistry*. 65: 2893-2896.
- Rhee,IK., Appels, N., Hofte, B., Karabatak, B., Erkelens, C., Stark, LM., Flippin, LA., Verpoorte, R. 2004. Isolation of the acetylcholinesterase inhibitor ungeremine from *Nerine bowdenii* by preparative HPLC coupled on-line to a flow assay system. *Biol Pharm Bull*. 27: 1804-1809.
- Ahmad, I., Anis, I., Malik, A., Nawas, AS., Choudhary, MI. 2003. Cholinesterase inhibitory constituents from *Onosma hispida*. *Chem Pharm Bull*. 51: 412-414.
- Ferheen, S., Ahmed, E., Afza, N., Malik, A., Shan, MR., Nawas, SA., Choudhary, MI. 2005. Haloxylines A and B, antifungal and cholinesterase inhibiting piperidine

- alkaloids from Haloxylon salicornicum. *Chem Pharm Bull.* 53: 570-572.
- Ahmad, VU., Khan, A., Farooq, U., Kousar, F., Khan, SS., Nawaz, SA., Abbasi, MA., Choudhary, MI. 2005. Three new cholinesterase-inhibiting cis-clerodane diterpenoids from *Otostegia limbata*. *Chem Pharm Bull.* 53: 378-381.
- Atta-ur-Rahman, Wahab, AT., Nawas, SA., Choudhary, MI. 2004. New cholinesterase inhibiting bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cocculus pendulus*. *Chem Pharm Bull.* 52: 802-806.
- Choudhary, MI., Yousuf, S., Nawas, SA., Ahmed, S., Atta-ur-Rahman. 2004. Cholinesterase inhibiting withanolides from *Withania somnifera*. *Chem Pharm Bull.* 52: 1358-1361.
- 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 :4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry Disease, Division of Medicinal Chemistry, Brazilian Chemical Society (SBQ). *BrazMedChem.*
- Owolabi, Moses S., Ogundajo, Akintayo Lanre., Dosoky, Noura S., Setzer William N. 2013. The cytotoxic activity of *Annona muricata* leaf oil from Badagary, Nigeria. *American Journal of Essential Oils and Natural Products.* 1 (1): 1-3.
- Abubacker, M.N., Deepalakshmi, T., 2012. Antioxidant and antibacterial activity of (*Annona muricata* L.) leaf aqueous extract. *International Journal of Plant Science.* Vol. 7 ; 301-306.
- Rachmani, Eka Prasasti Nur., Suhesti, Tuti Sri., Widiastuti, Retno., Adityono. 2012. The Breast of Anticancer from Leaf Extract of *Annona Muricata* Against Cell Line T47D. *International Journal of Applied Science and Technology.* Vol. 2 No. 1; 157.
- George, V Cijo., Kumar, DR Naveen., Rajkumar, V., Suresh, PK., Kumar, R Ashok. 2012. Quantitative Assessment of the Relative Antineoplastic Potential of the n-butanolic Leaf Extract of *Annona Muricata* Linn. in Normal and Immortalized Human Cell Lines, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* Vol 13. 699 -704
- Hamizah, S., Roslida, AH., Fezah, O., Tan, KL., Tor, YS., Tan, CI. 2012. Chemopreventive Potential of *Annona Muricata* L Leaves on Chemically-Induced Skin Papillomagenesis in Mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* Vol 13; 2533-2539.
- Arthur, FKN., Woode, Eric., Terlabi, EO., Larbie, C. 2012. Bilirubin Lowering Potential of *Annona muricata* (Linn.) in Temporary Jaundiced Rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology.* 7 (2): 33-40.
- Adewole, Stephen O., Martin, Ezekiel A. Caxton. 2006. Morphological Changes and Hypoglycemic Effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Leaf Aqueous Extract on Pancreatic B-Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *African Journal of Biomedical Research.* Vol. 9; 173 – 187.
- Kovarik, Z et al. 2013. Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochem. J.* 373, 33–40.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase inhibitor activity. *Biochem Pharmacol.* 7: 88-95.
- Rhee, In Kyung., van de Meent, Michiel., Ingkaninan, Kornkanok., Verpoorte, Robert. 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining *Journal of Chromatography A*, 915 :. 217–223
- Mehta, M., Adem, A., Sabbagh, Marwan. 2012. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. Hindawi Publishing Corporation.



*International Journal of Alzheimer's Disease*. Volume 2012.  
Cole GM, Lim GP, Yang F, Teter B, BegumA, Ma Q, Harris-White, ME., Frautschy, SA. 2005. Prevention of Alzheimer's

disease:Omega-3 fatty acid and phenolicanti-oxidant interventions.  
*Neurobiol Aging*. 05 Dec;26 Suppl 1:133-6.