

**LAPORAN AKHIR TAHUN  
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI  
(PDUPT)**



8

**EKSPLORASI POTENSI HERBA *SOLANUM BETACEUM* SEBAGAI  
TERAPI PADA MODEL HEWAN COBA ALZHEIMER**

PROF. DR. INDRI SAFITRI MUKONO, DR., M.S	(0014065303)
DR. AGUS TURCHAN, DR., SP.BS	(8822800016)
HANIK BADRIYAH, DR., SP.S.	(0024097808)
PROF. DR. SUHARTATI, DR., M.S	(0017014701)
DR. SITI KHAERUNNISA, M.SI	(9907147708)

**DIBIYAI OLEH:**  
**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT**  
**DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN**  
**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**  
**SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN**  
**PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT**  
**NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN AKHIR TAHUN  
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI  
(PDUPT)**

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**



KKA  
KK  
LP 03/19  
Eks

**EKSPLORASI POTENSI HERBA *SOLANUM BETACEUM* SEBAGAI  
TERAPI PADA MODEL HEWAN COBA ALZHEIMER**

PROF. DR. INDRI SAFITRI MUKONO, DR., M.S	(0014065303)
DR. AGUS TURCHAN, DR., SP.BS	(8822800016)
HANIK BADRIYAH, DR., SP.S.	(0024097808)
PROF. DR. SUHARTATI, DR., M.S	(0017014701)
DR. SITI KHAERUNNISA, M.SI	(9907147708)

**DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN  
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

**HALAMAN PENGESAHAN**

Judul : Eksplorasi Potensi Herba Solanum betaceum Sebagai Terapi Pada Model Hewan Coba Alzheimer

**Peneliti/Pelaksana**

Nama Lengkap : Dr INDRI SAFITRI MUKONO,  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
NIDN : 0014065303  
Jabatan Fungsional : Guru Besar  
Program Studi : Ilmu Kedokteran Dasar  
Nomor HP : 08123014624  
Alamat surel (e-mail) : indrisafitri@yahoo.com

**Anggota (1)**

Nama Lengkap : Dr. dr. AGUS TURCHAN S.Ked, Sp.B.S  
NIDN : 8822800016  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**

Nama Lengkap : HANIK BADRIYAH HIDAYATI  
NIDN : 0024097808  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

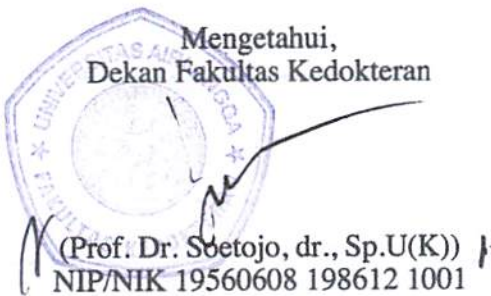
**Anggota (3)**

Nama Lengkap : Dr. dr. SUHARTATI M.S  
NIDN : 9990176128  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Institusi Mitra (jika ada)**

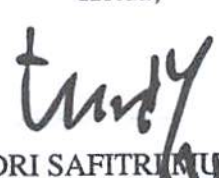
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 125,000,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 400,000,000

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran



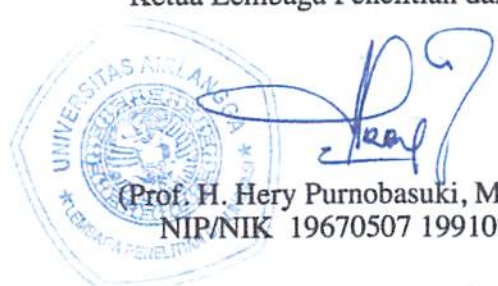
(Prof. Dr. Soetoyo, dr., Sp.U(K))  
NIP/NIK 19560608 198612 1001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018  
Ketua,



(Dr INDRI SAFITRI MUKONO, )  
NIP/NIK 195306141981032001

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi



(Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., PhD)  
NIP/NIK 19670507 199102 1001



## RINGKASAN

Populasi manusia kategori lanjut usia di seluruh dunia kini menghadapi epidemi penyakit Alzheimer (*Alzheimer Disease / AD*), dengan jumlah kasus diperkirakan naik menjadi 106 juta hingga tahun 2050. Menurut perkiraan, pada tahun 2050 akan ada sekitar 3 juta penderita demensia di Indonesia dan 55,6 persen diantaranya disebabkan oleh AD. Perawatan lansia Alzheimer dan demensia lainnya dapat menimbulkan dampak pada keluarga selaku *caregiver* berupa dampak fisik, dampak emosional, dampak sosial dan dampak ekonomi. Cara menghemat yang paling efektif adalah jika permulaan Alzheimer dapat ditanggihkan atau jumlah insidens dikurangi dengan cara-cara pencegahan yang timbul dari penelitian baru. Meskipun saat ini penyakit AD belum dapat disembuhkan, tetapi mungkin saja penanganan yang tepat dapat mengurangi beberapa gejala seperti mengembara (*wandering*) dan inkontinensi.

Terapi pada penderita AD saat ini menggunakan kombinasi memantine (menghambat reseptor NMDA) dan donepezil (menghambat kolinesterase) untuk menghambat progresivitas hilangnya memori dan gangguan fungsi kognitif lainnya, namun terapi menggunakan obat ini menelan biaya yang cukup tinggi.

Penelitian efektifitas tanaman herbal kini menarik perhatian untuk dikaji sebagai upaya preventif maupun terapi berbagai penyakit. *Solanum betaceum* (terong belanda) merupakan salah satu tanaman yang berlimpah di Indonesia namun pemanfaatannya masih sangat kurang. Beberapa studi melaporkan bahwa *Solanum betaceum* memiliki komponen fitokimia yang bersifat antioksidan cukup tinggi yaitu flavonoid golongan antosianin, flavonol, asam fenolat serta karotenoid.

Skrining Fitokimia meliputi identifikasi flavonoid, tannin, saponin, alkaloid, terpenoid, tannin galat dan tannin katekol. Uji kuantitatif dilakukan untuk mengetahui jumlah total flavonoid menggunakan metode spektrofotometri dan total kuersetin menggunakan metode HPLC. Uji kualitatif flavonoid dilanjutkan menggunakan metode TLC densitometry. Hasil analisis skrining flavonoid menggunakan metode KLT pada sampel *Solanum betaceum* ditemukan senyawa rutin pada Rf 0,26 -0,29 dan 0,25-0,28.

**Hasil Tahun 1** yang telah diperoleh adalah analisis skrining fitokimia dalam *Solanum betaceum* menunjukkan terdapatnya flavonoid, tannin, terpenoid, tannin galat, dengan total flavonoid sebesar 0,22% b/b. Hasil uji KLT densitometry menunjukkan ditemukan senyawa Rutin pada Rf 0.26 -0.29 and 0.25-0.28. Uji yang telah dilakukan secara *in Silico* berbasis komputasi menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang terdapat dalam *Solanum betaceum* memiliki potensi yang cukup besar untuk menghambat  $\beta$ -Secretase, asetilkolinesterase dan NMDA, protein penting pada Alzheimer. Hasil uji *in silico* tersebut berbanding lurus dengan hasil uji *in vivo* pada *Rattus norvegicus* model Alzheimer. Pemberian ekstrak etanol *Solanum betaceum* dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB dapat memperbaiki memori secara bermakna *Rattus norvegicus* yang dipapar Aluminium sebagai model Alzheimer. Penelitian ini menggunakan model hewan coba karena tidak memungkinkan dilakukan uji pada manusia. Uji memori menggunakan morris water maze yang diukur melalui *escape latency*. Hasil ADME-toxicity menunjukkan bahwa senyawa potensial dalam *Solanum betaceum* tidak mempengaruhi aktivitas CYP450 sehingga diprediksi aman bagi tubuh.



**Uji lanjutan Tahun 1.** Penelitian ini masih dalam tahap lanjutan dengan mengukur parameter biokimiawi yang terlibat dalam pembentukan memori pada model Alzheimer yaitu NMDA dan BDNF hipokampus. Luaran yang dihasilkan berupa publikasi jurnal Internasional dan pemaparan dalam seminar ilmiah tingkat Internasional.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, pemilik segala yang ada, dan dengan kekuasaan-Nya Dia memberi hikmah kepada siapapun yang dikehendaki. Syukur Alhamdulillah, atas berkah, rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penyusun dapat menyelesaikan Laporan Kemajuan Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi Universitas Airlangga dengan judul **Eksplorasi Potensi Herba *Solanum betaceum* Sebagai Terapi Pada Model Hewan Coba Alzheimer.**

Laporan penelitian ini disusun untuk memenuhi persyaratan kelengkapan evaluasi dari pelaksanaan penelitian program Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi Universitas Airlangga tahun anggaran 2018.

Penelitian ini tidak mungkin terwujud tanpa bantuan dan peran serta dari berbagai pihak, untuk itu perkenankanlah kami menyampaikan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada: DirJen DIKTI, Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Fasich, Apt., Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U(K), Ketua LPPM Universitas Airlangga, Prof. Hery Purnobasuki, M.Si., PhD atas kesempatan yang diberikan kepada kami untuk memperoleh dana penelitian dari program Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi Universitas Airlangga.

Terimakasih kepada: Ketua Departemen Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Sudarno, dr., M.Kes., atas kesempatan, fasilitas yang diberikan kepada kami untuk dapat melaksanakan dan menyelesaikan penelitian ini.

Terimakasih juga kami sampaikan kepada berbagai pihak yang telah banyak membantu dan meluangkan waktu dalam penelitian ini yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu.

Dengan segenap kerendahan hati, penyusun menyadari bahwa dalam penulisan Laporan Kemajuan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Universitas Airlangga ini masih banyak kekurangan, sehingga penyusun mohon maaf sebesar-besarnya atas segala kekurangan. Semoga Allah SWT membalas seluruh kebaikan yang telah diberikan kepada penyusun. Akhir kata, semoga laporan ini memberikan manfaat bagi siapapun yang membacanya.

Surabaya, November 2018

Tim Penyusun

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL .....	
HALAMAN PENGESAHAN .....	i
RINGKASAN .....	ii
PRAKATA .....	iii
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN .....	viii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	5
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	11
BAB 4 METODE PENELITIAN .....	13
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN .....	21
BAB 6 RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA .....	36
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....	38
DAFTAR PUSTAKA .....	39
LAMPIRAN 1. <i>ETHICAL CLEARANCE</i>	
LAMPIRAN 2. DRAFT ARTIKEL ILMIAH 1	
LAMPIRAN 3. DRAFT ARTIKEL ILMIAH 2	





## DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 5.1	Hasil analisis kualitatif skrining fitokimia ekstrak etanol <i>Solanum betaceum</i> dengan berbagai metode	22
Tabel 5.2	Hasil uji kualitatif skrining fitokimia ekstrak etanol <i>Solanum betaceum</i> dengan metode KLT	23
Tabel 5.3	Hasil uji kuantitatif ekstrak etanol <i>Solanum betaceum</i> dengan teknik spektrofotometri dan HPLC	23
Tabel 5.4	Analisis docking molekular senyawa dan metabolit <i>Solanum betaceum</i> dengan Reseptor NMDA dan Asetilkolinesterase	24
Tabel 5.5	Residu asam amino esensial yang berinteraksi antara senyawa dan metabolit <i>Solanum betaceum</i> dengan enzim asetilkolinesterase.	25
Tabel 5.6	Analisis <i>in silico</i> parameter ADME, farmakokinetik, <i>druglikeness</i> dan kimia medis	30
Tabel 5.7	Hasil analisis rerata, median, minimum dan maksimum parameter Memori	32
Tabel 5.8	Hasil uji normalitas (p) <i>Kolmogorv Smirnov test</i>	33
Tabel 5.9	Hasil uji <i>Kruskal Wallis</i> pada variabel Memori	34
Tabel 5.10	Hasil uji <i>Mann Whitney U</i>	34

## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Pembentukan protein amilogenik	6
Gambar 2.2	Terong Belanda	10
Gambar 4.1	Bagan rancangan penelitian <i>randomized posttest control group design</i>	13
Gambar 5.1	Gambar senyawa rutin	22
Gambar 5.2	Histogram analisis docking beberapa senyawa dan metabolit <i>Solanum betaceum</i> dengan Asetilkolinesterase dan reseptor NMDA	25
Gambar 5.3	Analisis interaksi asam amino pada pocket enzim Asetilkolinesterase, struktur docking ligan pada core AchE (kiri), asam amino yang berperan (kanan).	28
Gambar 5.4	Analisis <i>In Silico</i> permeabilitas beberapa senyawa dan metabolit <i>Solanum betaceum</i> pada <i>Blood Brain Barrier</i>	31
Gambar 5.5	Grafik rerata uji memori	33

## **DAFTAR LAMPIRAN**

- Lampiran 1**    *Ethical Clearance*
- Lampiran 2**    **Draft Artikel Ilmiah 1**
- Lampiran 3**    **Draft Artikel Ilmiah 2**

**BAB 1****PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Populasi manusia kategori lanjut usia di seluruh dunia kini menghadapi epidemi penyakit Alzheimer (*Alzheimer Disease / AD*), dengan jumlah kasus diperkirakan naik menjadi 106 juta hingga tahun 2050 (Yegambaram *et al.*, 2015). Penyakit Alzheimer adalah penyebab utama kematian di negara maju dengan risiko 70% disebabkan genetika. Sisanya 30 % dari risiko AD dihipotesiskan oleh faktor lingkungan dan pola gaya hidup manusia. (Yegambaram *et al.*, 2015) Indonesia belum memiliki data-data pasti tentang angka kejadian demensia akibat AD, tetapi mengacu pada angka kejadian di luar negeri. Diperkirakan jumlah usia lanjut di Indonesia berkisar 18,5 juta orang dengan angka insidensi dan prevalensi AD belum diketahui dengan pasti. Jumlah tersebut akan ada yang menderita demensia dan 55,6 persen diantaranya disebabkan oleh AD. Antara tahun 2000 dan 2010, proporsi kematian disebabkan AD meningkat 68%. (Kusumoputro dan Sidiarto, 2004)

Deposisi Amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) pada otak merupakan salah satu implikasi dari patogenesis AD (Klafki *et al.*, 2006). Plak  $\beta$ -amiloid menyebabkan neurodegenerasi melalui pembentukan senile plaque, fosforilasi protein Tau yang menyebabkan pembentukan *Neurofibrillary tangle* (NFT), disfungsi mitokondria, stres oksidatif, transport aksonal, dan kerusakan membran. (Modi *et al.*, 2012) Reseptor NMDA adalah kanal ion yang bergantung pada neurotransmitter glutamate dan voltasi  $Mg^{2+}$  sehingga dapat mengatur lalu lintas pergerakan



kalsium ke dalam sel saraf (dendritik *spine*). Hal ini sangat penting pada proses *learning* dan *memory* pada otak. (Carlson, 2013)

*Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) memiliki efek neurotropik pada sistim saraf pusat (SSP) dan merupakan molekul kunci dalam pemeliharaan plastisitas sinaptik dan penyimpanan memori pada hipokampus. Perubahan level dan ekspresi BDNF ditemukan pada SSP dan serum darah pasien AD yang mengindikasikan bahwa BDNF berperan penting dalam patogenesis AD. (Song *et al.*, 2014)

Tahun 2015, biaya perawatan seseorang yang hidup dengan Alzheimer dan penyakit demensia lainnya diperkirakan menelan US \$226 milyar dan diperkirakan hingga tahun 2050 meningkat menjadi US\$1,1 trilyun (*Alzheimer's Association*, 2015). Tahun 2009 diperkirakan 12.5 miliar jam kerja produktif dihabiskan untuk perawatan individu dengan gangguan kognitif yang setara nilainya dengan US\$144 miliar (Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention U.S., 2011). Perawatan lansia Alzheimer dapat menimbulkan *caregiver burden* meliputi dampak fisik, dampak emosional, dampak sosial dan dampak ekonomi bila tidak dapat ditangani secara efektif. (Mace & Rabins, 2006).

Cara menghemat yang paling efektif adalah jika permulaan alzheimer dan demensia lainnya dapat ditanggihkan atau jumlah insidens dikurangi dengan cara-cara pencegahan yang timbul dari penelitian baru. (Poerwadi, 2013).

Terong Belanda (*Solanum betaceum*) yang juga dikenal nama Tamarillo merupakan tumbuhan dari keluarga *Solanaceae*. Mayoritas masyarakat kita tak banyak mengenal Terong Belanda. Beberapa studi melaporkan bahwa Terong

Belanda dapat meningkatkan daya tahan tubuh, mencegah kanker, mencegah sembelit, menangkal radikal bebas, serta baik untuk kecerdasan otak. (Kumalaningsih, 2006). Komponen fitokimia yang telah dilaporkan dalam Terong Belanda adalah flavonoid golongan antosianin, flavonol, asam fenolat serta karotenoid. (Lister *et al.*, 2005 ; Kumalaningsih, 2006; Mertz *et al.*, 2009 ; Espin *et al.*, 2016). Flavonoid dilaporkan dapat meningkatkan memori dan fungsi kognisi melalui dua jalur, yaitu jalur langsung dan tidak langsung. (Suhartati dan Khaerunnisa, 2016)

**Hasil Tahun 1** yang telah diperoleh adalah analisis skrining fitokimia dalam *Solanum betaceum* menunjukkan terdapatnya flavonoid, tannin, terpenoid, tannin galat, dengan total flavonoid sebesar 0,22% b/b. Hasil uji KLT densitometry menunjukkan ditemukan senyawa Rutin pada Rf 0.26 -0.29 and 0.25-0.28. Uji yang telah dilakukan secara *in Silico* berbasis komputasi menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang terdapat dalam *Solanum betaceum* memiliki potensi yang cukup besar untuk menghambat  $\beta$ -Secretase, asetilkolinesterase dan NMDA, protein penting pada Alzheimer. Hasil uji *in silico* tersebut berbanding lurus dengan hasil uji *in vivo* pada *Rattus norvegicus* model Alzheimer. Pemberian ekstrak etanol *Solanum betaceum* dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB dapat memperbaiki memori secara bermakna *Rattus norvegicus* yang dipapar Aluminium sebagai model Alzheimer. Penelitian ini menggunakan model hewan coba karena tidak memungkinkan dilakukan uji pada manusia. Uji memori menggunakan morris water maze yang diukur melalui *escape latency*. Hasil ADME-toxicity menunjukkan bahwa senyawa potensial

dalam *Solanum betaceum* tidak mempengaruhi aktivitas CYP450 sehingga diprediksi aman bagi tubuh.

**Uji lanjutan Tahun 1** akan dilakukan analisis pengaruh *herba Solanum betaceum* terhadap hewan coba yang dipapar Aluminium sebagai model hewa coba AD mengukur parameter biokimiawi yang terlibat dalam pembentukan memori pada model Alzheimer yaitu NMDA dan BDNF hipokampus. Luaran yang dihasilkan berupa publikasi jurnal Internasional dan pemaparan dalam seminar ilmiah tingkat Internasional.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Penyakit Alzheimer

Demensia adalah sindrom melemahkan yang progresif dari disfungsi dalam beberapa domain intelektual termasuk memori, bahasa, kemampuan visuospatial, praxis, gnosia dan fungsi eksekutif (Madeo and Elsayad, 2013). Penyebab pertama penderita demensia adalah penyakit Alzheimer (*Alzheimer Disease / AD*) (50-60%) dan kedua oleh cerebrovaskuler (20%). (Iskandar, 2002).

Penyakit Alzheimer dapat timbul pada semua umur, 96% kasus dijumpai setelah berusia 40 tahun keatas. Diperkirakan jumlah usia lanjut di Indonesia berkisar 18,5 juta orang dengan angka insidensi dan prevalensi AD belum diketahui dengan pasti. Hingga saat ini, terdapat 1 juta penderita demensia di Indonesia. Menurut penelitian, pada tahun 2009 lalu kasus penderita demensia bertambah satu orang setiap 4 detiknya. Menurut perkiraan, pada tahun 2050 akan ada sekitar 3 juta penderita demensia di Indonesia atau 3,5 persen dari total penduduk. Sementara menurut perkiraan, pada tahun 2050 mendatang kasus Demensia di Asia Pasifik akan mencapai 20 juta insiden pertahun. Jumlah tersebut akan ada yang menderita demensia dan 55,6 persen diantaranya disebabkan oleh AD. Antara tahun 2000 dan 2010, proporsi kematian disebabkan AD meningkat 68% (Kusumoputro dan Sidiarto, 2004).

Pada AD ditemukan karakteristik neuropatologikal seperti hilangnya neuronal selektif dan sinap, adanya plak neuritis yang mengandung peptida Amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) dan *neurofibrillary tangles* (NFTs) yang membentuk hiperfosforilasi dari protein tau. (Klafki *et al.*, 2006). Sejumlah patogenesis AD yaitu:

##### 2.1.1 Faktor genetik

Beberapa gen dan mutasi yang didapat tampak memainkan peran terhadap AD (Madeo and Elsayad, 2013). Beberapa peneliti mengungkapkan 50% prevalensi kasus alzheimer ini diturunkan melalui gen autosomal dominant. Individu keturunan garis pertama pada keluarga penderita alzheimer mempunyai resiko menderita demensia 6 kali lebih besar dibandingkan kelompok kontrol

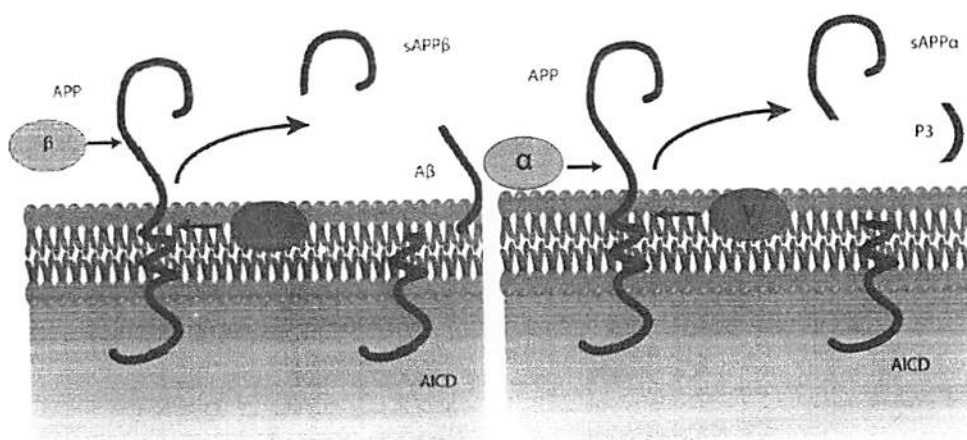


normal pemeriksaan genetika DNA pada penderita alzheimer dengan familial early onset terdapat kelainan lokus pada kromosom 21 di regio *proximal log arm*, sedangkan pada *familial late onset* didapatkan kelainan lokus pada kromosom 19 (Iskandar, 2012). Telah diketahui selama puluhan tahun bahwa variasi alel apolipoprotein E (ApoE) terkait dengan non-familial AD late onset. Alel e4 diduga terlibat dalam peningkatan risiko AD sedangkan alel e2 mengurangi risiko AD (Fonsesca *et al.*, 2011 ; Daborg *et al.*, 2013). AD *early onset familial* dihubungkan dengan 3 gen yang mengalami mutasi yaitu *amyloid precursor protein* (APP), presenilin-1 (PS1) dan presenilin-2 (PS2) (Jayadev *et al.*, 2008 ; Klafki *et al.*, 2006 ; Richardsz *et al.*, 2009).

### 2.1.2 Deposisi $\beta$ -Amiloid

Amyloid merupakan istilah umum untuk fragmen protein yang diproduksi tubuh secara normal. Beberapa aktifitas normal / potensial  $A\beta$  yang telah diketahui yang tidak berhubungan dengan penyakit diantaranya adalah aktivasi enzim-enzim kinase, perlindungan terhadap stress oksidatif, regulasi transport kolesterol, dan aktifitas antimicrobial. Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) adalah rantai peptida dari asam amino 36-43 yang merupakan hasil pemrosesan dari protein precursor amyloid (*Amyloid precursor protein/APP*). Amyloid- $\beta$  dikenal sebagai komponen dari plak amyloid yang berhubungan dengan AD (Butterfield *et al.*, 2013).

Plak beta-amyloid adalah fragment protein yang tidak larut yang merupakan hasil pemotongan yang tidak sempurna dari suatu protein yang disebut amyloid precursor protein (APP) (Butterfield *et al.*, 2013).



Gambar 2.1 Pembentukan protein amilodogenik (kiri) dan non-amilodogenik (kanan) (Butterfield *et al.*, 2013)

*Beta-Amyloid* merupakan produk fisiologi normal dari APP dan merupakan komponen *soluble* dari plasma dan cairan cerebrospinal (Suh *et al.*, 2002). Secara normal, APP dipecah oleh tiga enzim yaitu  $\alpha$ -,  $\beta$ -, dan  $\gamma$ -secretase. Pembentukan Plak Amilodogenik dimulai dari APP dibelah oleh  $\beta$ -secretase diikuti oleh  $\gamma$ -secretase dalam lipid bilayer menghasilkan peptida  $A\beta$ , sAPP $\beta$ , dan domain APP intraselluler (APP intracellular domain / AICD). Proses ini menghasilkan peptida  $A\beta$  yang merupakan komponen utama pembentukan plak amiloid (Butterfield *et al.*, 2013).

Pembentukan Plak Amilodogenik dimulai dari APP dibelah oleh  $\beta$ -secretase diikuti oleh  $\gamma$ -secretase dalam lipid bilayer menghasilkan peptida  $A\beta$ , sAPP $\beta$ , dan domain APP intraselluler (APP intracellular domain / AICD). Proses ini menghasilkan peptida  $A\beta$  yang merupakan komponen utama pembentukan plak amiloid (Butterfield *et al.*, 2013). Mutasi ganda pada APP mengarah pada peningkatan  $A\beta$  akibat pemecahan APP oleh  $\beta$ -secretase yang meningkat. *Beta-Amyloid* peptida merupakan komponen protein utama pada plak neuritik yang merupakan karakteristik dari AD (Klafki *et al.*, 2006).

Neurotoksik yang dihasilkan oleh agregasi  $A\beta$  menghasilkan beberapa mekanisme, seperti adanya akumulasi radikal bebas, disregulasi dari homeostatis kalsium, respon inflamasi, dan adanya aktivasi dari beberapa *signaling pathway* (Suh *et al.*, 2002).

#### b. Disfungsi mitokondria

Disfungsi mitokondria yang berhubungan dengan akumulasi ROS, tampaknya memainkan peran dalam peristiwa awal patologi AD. (Eckert *et al.*, 2011). Mitokondria ditemukan sebagai target amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ), berinteraksi dengan beberapa protein, yang menyebabkan disfungsi mitokondria.  $A\beta$  ditemukan di membran luar mitokondria (OMM) dan inner membran mitokondria (IMM) serta dalam matriks. Interaksi  $A\beta$  dengan OMM mempengaruhi transport *nuclear-encoded mitochondrial protein*, seperti subunit pada kompleks IV transport elektron, dalam organel melalui translocase of the outer membrane (TOM). Selain itu,  $A\beta$  mengganggu aktivitas beberapa enzim, seperti piruvat dehidrogenase (PDH) dan  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenase ( $\alpha$ KGDH), penurunan reduksi NADH, dan enzim kompleks IV transpor elektron, mengurangi sejumlah hidrogen yang

translokasi dari matriks ke ruang antarmembran (*Inner Mitochondrial Membrane / IMS*), sehingga merusak potensial membran mitokondria (*Mitochondrial Membrane Potential/MMP*). (Eckert *et al.*, 2011).

Kompleks A $\beta$ -ABAD ditemukan menyebabkan disfungsi seluler oleh beberapa mekanisme potensial, seperti hilangnya aktivitas enzimatik, akumulasi metabolit toksik upstream, kebocoran radikal bebas oksigen mitokondria, hilangnya muatan energi sel dan peningkatan pembukaan MPT. (Albrekkan and Worden, 2013) A $\beta$  terikat juga mengaktifkan Fis1 (*fission protein*) dan mempromosikan peningkatan fragmentasi mitokondria; peningkatan fragmentasi mitokondria ini menyebabkan disfungsi mitokondria yang pada akhirnya merusak neuron. Selanjutnya, A $\beta$  mengikat cyclophilin D (CYPD) meningkatkan translokasi protein ke dalam membran, menyebabkan pembukaan pori transisi permeabilitas mitokondria, yang dibentuk oleh Translocator adenin nukleotida (*Adenin nucleotide translocator / ANT*) dan saluran anion tergantung tegangan (*voltage-dependent anion channel / VDACs*) (Eckert *et al.*, 2011).

Belajar perilaku baru dan memperoleh informasi dari lingkungan melibatkan pola tertentu dari aktivitas saraf yang disebabkan oleh pengalaman yang dipertahankan melalui plastisitas dalam jaringan saraf tertentu. Pertahanan dari informasi yang diperoleh tergantung berapa lama perubahan plastik dipelihara. Hal ini diyakini bahwa bentuk-bentuk pertahanan plastisitas sinaptik, termasuk plastisitas sinaptik struktural antara lain terjadi di spesifik ansambel neuronal, untuk mempertahankan informasi memori jangka panjang. (Amaya, 2007) *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) memiliki efek neurotropik pada sistem saraf pusat (SSP) dan merupakan molekul kunci dalam pemeliharaan plastisitas sinaptik dan penyimpanan memori pada hipokampus. Perubahan level dan ekspresi BDNF ditemukan pada SSP dan serum darah pasien AD yang mengindikasikan bahwa BDNF berperan penting dalam patogenesis AD. (Song *et al.*, 2014)

Aktivitas saraf menyebabkan serangkaian peristiwa molekuler seperti aktivasi neurotransmitter dan sistem kinase, Ca<sup>2+</sup> influks, induksi ekspresi gen, translasi dan regulasi protein, dan banyak lainnya yang penting untuk menetapkan perubahan plastisitas yang mendasari memori jangka panjang. (Amaya, 2007)

Reseptor NMDA adalah kanal ion yang bergantung pada neurotransmitter glutamate dan voltasi  $Mg^{2+}$  sehingga dapat mengatur lalu lintas pergerakan kalsium ke dalam sel saraf (dendritik *spine*). (Carlson, 2013)

## 2.2 Terong Belanda (*Solanum betaceum*)

Terong Belanda *Solanum betaceum* (*syn Cyphomandra betaceae*) merupakan salah satu tanaman perdu famili *Solanaceae*. Terong Belanda dikenal dengan nama *Tamarillo* yang diadopsi dari New Zealand yang dijadikan nama standar yang digunakan dalam standar industri perdagangan.

Manfaat buah Terong Belanda adalah mencegah kerusakan sel-sel dan jaringan tubuh penyebab berbagai penyakit seperti kanker, tumor dan lain-lain, melancarkan penyumbatan pembuluh darah (arteriosklerosis) sehingga dapat mencegah penyakit jantung dan stroke serta dapat menormalkan tekanan darah, menurunkan kadar kolesterol dan mengikat zat racun dalam tubuh, meningkatkan stamina, daya tahan tubuh dan vitalitas, dapat membantu mempercepat proses penyembuhan. (Kumalaningsih, 2006).

Taksonomi Terong Belanda berdasarkan Departemen Kesehatan dan Kesehatan Sosial, 2001 sebagai berikut:

<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae</i>
<i>Subkingdom</i>	: <i>Tracheobionta</i>
<i>Divisi</i>	: <i>Spermatophyta</i>
<i>Subdivisi</i>	: <i>Angiospermae</i>
<i>Klass</i>	: <i>Dicotyledonae</i>
<i>Subklass</i>	: <i>Asteridae</i>
<i>Ordo</i>	: <i>Solanales</i>
<i>Famili</i>	: <i>Solanaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Solanum</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Solanum betaceum Cav.</i>



Gambar 2.2 Terong Belanda (*Solanum betaceum*) ([www.zhiwutong.com](http://www.zhiwutong.com))

### 2.2.1 Kandungan senyawa dalam *Solanum betaceum*

Terong Belanda pada awalnya dikenal dengan nama *Chypomandra betaceae* (Cav.), akan tetapi kemudian direvisi oleh Sendtner menjadi *Solanum betaceum* Cav. yang termasuk dalam family *Solanaceae*. Dalam 100 g Terong Belanda mengandung 83,56 g% air; protein 0,52 g%; kalsium 9,51 g%; lemak 0,81 g%; serat 0,39 g%; abu 1,64 g%; TSS 4,8 g%; pH 6,61, Vit C 33,6 mg, total fenol 190 mg GAE/100g; total flavonoid 81,22 µg/g; antioksidan 208 mgAA eq/100g; beta karoten 1,72 µg/g (Nallakurumban *et al*, 2015)

Komponen fitokimia yang telah dilaporkan dalam Terong belanda adalah senyawa fenolik yang terdiri dari flavonoid golongan antosianin : delphinidin-3-glukosil-rutinosida, delphinidin-3-rutinosida, sianidin-3-rutinosida pelargonidin-3-rutinosida; asam hidroksinamat: asam dicaffeoylquinic, asam caffeoylquinic, caffeoyl glukosa, feruloyl glukosa. Senyawa karotenoid: beta-karoten, beta-kriptoxantin, lutein. (Mertz *et al*, 2009 ; Espin *et al*, 2016)

## BAB 3

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1 Tujuan Penelitian

##### 3.1.1 Tujuan penelitian umum:

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengeksplorasi kandungan senyawa bioaktif dalam *Solanum betaceum* dan simulasi *in silico* terhadap beberapa protein potensial pada *Alzheimer Disease* (AD) serta membuktikan secara eksperimental efek terapi pemberian ekstrak etanol *Solanum betaceum* terhadap perubahan memori yang diukur melalui *escape latency* dan beberapa parameter biokimia diantaranya NMDA dan BDNF sebagai langkah awal terapi penyakit *Alzheimer* yang diujikan pada model hewan coba yang dipapar aluminium.

##### 3.1.2 Tujuan penelitian khusus

###### Tahun 1.

1. Menganalisis kandungan senyawa bioaktif *Solanum betaceum* dan menguji secara *in silico* dengan protein target pada AD.
2. Membuktikan ekstrak etanol *Solanum betaceum* dapat menurunkan *escape latency* model hewan coba AD.
3. Membuktikan ekstrak etanol *Solanum betaceum* dapat menurunkan kadar NMDA hipokampus model hewan coba AD.
4. Membuktikan ekstrak etanol *Solanum betaceum* dapat menurunkan kadar BDNF hipokampus model hewan coba AD.

#### 3.2 Manfaat Penelitian

##### 3.2.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar ilmiah bagi pengembangan dan pemanfaatan Terong Belanda (*Solanum betaceum*) sebagai neuroprotektor terhadap perubahan protein potensial yang terlibat dalam pembentukan memori diantaranya NMDA dan BDNF serta fungsi memori dan kognitif yang dilihat dari kemampuan mencapai target (*escape latency*) sebagai langkah awal terapi penyakit *Alzheimer*



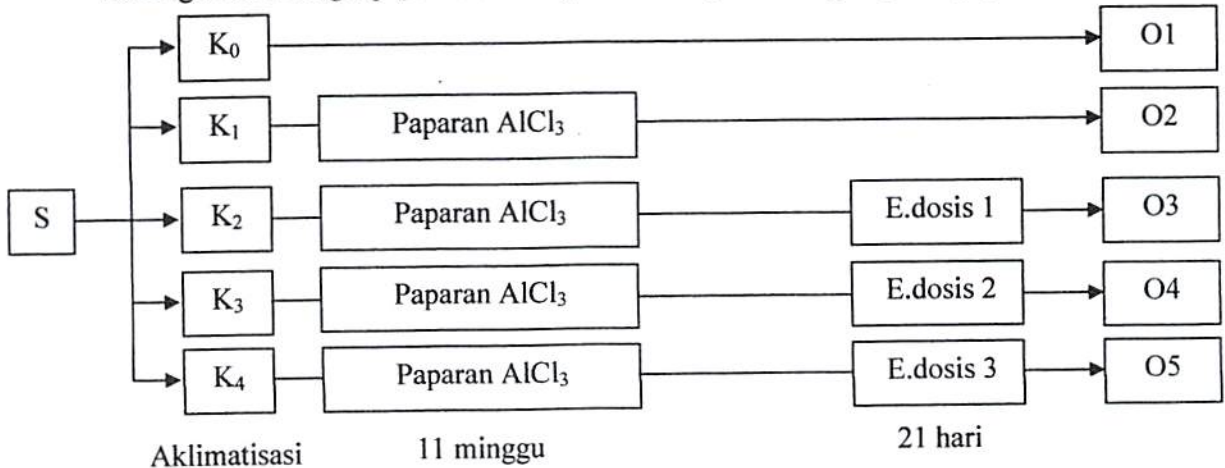
### **3.2.2 Manfaat Praktis**

Hasil penelitian ini merupakan uji preklinis yang perlu dilanjutkan pada tahap uji klinis dengan harapan dapat digunakan masyarakat sebagai sumber acuan dalam mengenal, membudidayakan serta memanfaatkan Terong Belanda (*Solanum betaceum*) sebagai terapi penyakit Alzheimer. Penelitian ini dapat dipertimbangkan menuju obat herbal terstandar untuk penelitian klinis lebih lanjut.

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian dan Besar Sampel

Penelitian ini bersifat experimental laboratories dengan menggunakan rancangan acak lengkap (*Randomized post test only control group design*).



Gambar 4.1 Bagan rancangan penelitian randomized posttest control group design

**Keterangan :** P = Populasi, S = Sampel, R = Randomisasi, O = Observasi

**Perhitungan besar sampel menggunakan rumus federer**

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 \sim \text{Pembulatan keatas 5 ekor}$$

Persen kematian 10% maka jumlah keseluruhan = 30 ekor

### 4.2 Bahan dan Alat Penelitian

#### 4.2.1 Bahan penelitian uji bioaktivitas

Hewan coba adalah tikus jantan putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar berkelamin jantan, berumur 3 bulan dengan berat badan  $\pm 180$  gram, dan dalam kondisi fisik sehat yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Biokimia FK Unair, Diet standar (lampiran 1) dan aqua, serta sekam untuk alas tidur, Ketamin HCl untuk anastesi, Bahan Kimia dan reagen pemeriksaan meliputi  $\text{AlCl}_3$ , Kit NMDA, BDNF,



#### 4.2.2 Alat-alat penelitian

Kandang plastik propilen ukuran 20 cm x 30 cm x 40 cm yang ditutup dengan kawat kasa dengan ukuran 6 mm, Botol minum, Tempat makan dari aluminium, Sekam, Alat suntik (*syringe*) 1 cc yang ujungnya dimodifikasi, Timbangan untuk menimbang berat badan tikus, Alat suntik 5 cc untuk mengambil darah, Microtom, Mikroskop elektron, Spektrofotometer, *morris water maze*.

### 4.3 Persiapan Penelitian

#### 4.3.1 Pembuatan ekstrak etanol Terong Belanda

Daging buah Terong Belanda yang telah diidentifikasi, dikeringkan menggunakan *fresh dryer* dan digiling hingga menjadi serbuk. Serbuk yang diperoleh diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol selama 3 x 24 jam sebanyak tiga kali pada suhu kamar. Kemudian dipisahkan antara filtrat dan residunya. Ekstrak etanol Terong Belanda disaring dan diuapkan dengan *rotavapor* sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak etanol Terong Belanda ditambahkan ke dalam diet perlakuan dalam bentuk suspensi dengan aquades. Pemberian ekstrak tersebut dilakukan dengan cara di sonde. Dosis ekstrak etanol yang digunakan meliputi tiga dosis yang terdiri dari dosis minimum 50 mg/kgBB perhari, dosis optimum 100 mg/kgBB perhari dan dosis maksimum 200 mg/kgBB perhari (Kandimalla *et al.*, 2015).

### 4.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 4.4.1 Aklimatisasi

Aklimatisasi adalah pemeliharaan tikus dengan kondisi yang sama agar dapat beradaptasi. Sebanyak 50 ekor tikus jantan putih diaklimatisasi dilakukan selama 1 minggu dalam kondisi laboratorium. Hewan yang sakit atau mati selama proses aklimatisasi akan dikeluarkan dari penelitian.

#### 4.4.2 Penimbangan berat badan

Penimbangan pertama dilakukan pada pagi hari sebelum diberi perlakuan (hari ke-8 setelah aklimatisasi). Penimbangan berat badan tikus ini dilakukan dengan menggunakan timbangan Torbal (*Torsion Balance*).

#### 4.4.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Sampel di bagi dalam empat kelompok secara acak lengkap (randomized allocation / penempatan subjek sebagai kelompok kontrol/perlakuan)

#### 4.4.4 Membuat model hewan coba Alzheimer

Sebanyak 50 ekor tikus jantan putih dibagi kedalam empat kelompok.  $AlCl_3$  dilarutkan dalam aquades diberikan secara oral (100 mg / kg BB), untuk kelompok model Alzheimer, dan kelompok perlakuan yang diberikan selama 11 minggu. (Douichene *et al*, 2012)

#### 4.4.5 Pelatihan konsolidasi memori

Tikus menerima latihan empat kali dalam sehari selama empat hari berturut-turut untuk mendapatkan konsolidasi memori. Latihan dilakukan pada setelah aklimatisasi dan 4 hari berturut-turut sebelum pemberian paparan  $AlCl_3$  dan pemberian ekstrak *Solanum betaceum* setelah berakhir. Latihan dilakukan dengan menempatkan tikus di dalam *morris water maze* dengan posisi menghadap dinding yang diberikan tanda dengan beberapa simbol untuk menandai lokasi.

#### 4.4.6 Uji memori

Uji memori dilakukan pada minggu ke 12, yaitu sehari setelah perlakuan dan pengukuran waktu laten terakhir. Maze diletakkan menghadap dinding dengan menghilangkan beberapa tanda simbol yang digunakan pada pelatihan konsolidasi. Aktivitas tikus dalam uji memori direkam dengan kamera. Frekuensi mencapai target dan waktu menetap di area dihitung berdasarkan rekaman.

#### 4.4.7 Pengambilan sampel hipokampus hewan coba

Pengambilan sampel darah berasal dari jantung tikus dan dilakukan pada hari terakhir minggu terakhir perlakuan.

Tikus dipuasakan sejak malam hari (puasa 8 jam). Selama puasa, minum tetap diberikan *ad libitum*. Pengorbanan tikus dilakukan pada pagi hari, di mana sebelumnya dilakukan anestesi dengan menggunakan ketamin HCl selanjutnya dilakukan dekapitasi (Smith & Mangkowitz 1988). Setelah darah dan otak diambil, tikus di kubur dengan layak.

Dalam penelitian ini, hewan coba harus dikorbankan karena pengambilan sampel darah dalam jumlah besar dalam waktu singkat yaitu 3ml perekor secara intrakardial. Pengambilan sampel darah melalui cara lain seperti dari ekor tidak

mendapatkan volume minimal 3 ml dan organ otak khususnya area hipokampus diawetkan dalam RNA *later solution*.

#### 4.4.8 Molecular Docking

Optimisasi geometri ligand pada *Force Field type MMFF94* menggunakan Avogadro versi 1.2. Optimisasi protein menggunakan *Autodock* versi 4.2 dengan menghilangkan air dan atom lain kemudian menambahkan grup hidrogen. Selanjutnya dilakukan Autogrid dan posisi native ligan pada binding site dengan mengatur koordinat grid (x, y, z). Penambatan ligan pada protein dengan *regulating genetic algorithm parameters* dengan kriteria 50 *runs*. Analisis menggunakan parameter Energi Gibbs ( $\Delta G$ ) and konstanta inhibisi (IC50) yang diklasifikasikan berdasarkan energy terendah dan kluster.

#### 4.4.9 Analisis Interaksi

Kompleks protein docking divisualisasikan menggunakan *Discovery Studio Visualizer* versi 16 (BIOVIA) untuk menjelaskan interaksi ligan dengan asam amino pada *binding site*.

### 4.5 Pemeriksaan Laboratorium

#### 4.5.1 Skrining Senyawa Metabolik Sekunder *Solanum betaceum*

##### a. Skrining metabolik sekunder

##### Skrining Flavonoid

Sebanyak dua (2) ml sampel ekstrak ditambahkan 8 ml aquades yang telah dipanaskan selama  $\pm 10$  menit. Filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCl pekat beberapa tetes dan ditambahkan sedikit

serbuk Mg. Hasil Positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah tua / merah muda.

#### **Skrining Tanin**

Sebanyak dua (2) ml sampel ditambahkan 8 ml aquades yang telah dipanaskan selama  $\pm$  10 menit. Filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 3 tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil Positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna coklat kehitaman, biru kehitaman, hijau kehitaman.

#### **Skrining Saponin**

Sebanyak dua (2) ml sampel ditambahkan 8 ml aquades yang telah dipanaskan selama  $\pm$  10 menit. Filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 ml air panas dan ikocok kuat. Hasil Positif ditunjukkan terbentuk buih permanen selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm, kemudian ditambahkan HCl pekat 1 tetes. Hasil Positif ditunjukkan oleh busa permanen tidak hilang.

#### **Skrining Alkaloid**

Sebanyak dua (2) ml sampel ditambahkan 8 ml aquades yang telah dipanaskan selama  $\pm$  10 menit. Filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi dan ditambahkan 6 tetes pereaksi Meyer pada tabung reaksi pertama, 6 tetes Pereaksi Dragendrof pada tabung reaksi kedua, dan 6 tetes Pereaksi Bouchardat pada tabung reaksi ketiga. Hasil Positif ditunjukkan oleh terdapatnya endapan putih pada Alkaloid dengan Pereaksi Meyer, terdapat endapan jingga pada Alkaloid dengan Pereaksi Dragendrof, dan terdapat endapan cokelat pada Alkaloid dengan Pereaksi Bouchardat.

### **Skrining Terpenoid**

Sebanyak dua (2) gr sampel ekstrak kemudian ditambahkan 20 ml aquades yang telah dipanaskan selama  $\pm$  10 menit. Filtrat disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 tetes bouchardat. Hasil Positif ditunjukkan terbentuknya warna hijau kebiruan mengandung Terpenoid jenis Steroid, warna orange atau jingga kecokelatan mengandung Terpenoid jenis Triterpenoid.

### **Skrining Tanin Galat**

Setengah (0.5) ml sampel ditambahkan sedikit Natrium asetat kemudian ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1%. Warna positif ditunjukkan terbentuknya warna biru tinta atau hitam.

### **Skrining Tanin Katekol**

Setengah (0.5) ml sampel ditambahkan sedikit larutan Formaldehid 3% : HCl pekat (2:1), kemudian dipanaskan pada suhu  $90^\circ$ . Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna endapan merah.

#### **b. Penentuan Total Flavonoid**

Pereaksi yang terdiri dari : Larutan HMT yaitu Larutan heksametilentetramin 0,5%b/v, Larutan HCl yaitu larutan HCl 25%, Larutan asam asetat glasial yaitu Larutan asetat glasial 5% v/v dalam metanol, Larutan  $\text{AlCl}_3$  yaitu Larutan  $\text{AlCl}_3$  2% dalam larutan asam asetat glasial.

Larutan induk yang terdiri dari Ekstrak setara dengan 200 mg simplisia dimasukkan ke dalam labu alas bulat, ditambah dengan 1 ml larutan HMT, 20 ml aseton dan 2 ml larutan HCl, dihidrolisis dengan cara direflux selama 30 menit. Campuran disaring menggunakan kapas, filtrat dimasukkan ke dalam labu terukur 100 ml. Residu direfluks kembali dengan 20 ml aseton sapai 100 ml. Campuran

filtrat dalam labu terukur ditambah dengan aseton hingga 100 ml. Campuran filtrat dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambah 20 ml air dan diekstraksi 3 kali masing-masing dengan 15 ml etil asetat. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan ditambah dengan etil asetat sampai 50 ml dalam labu terukur.

#### Larutan blanko

Diambil 10 ml larutan induk, ditambah dengan asam asetat glasial sampai 25 ml dalam labu terukur.

#### Larutan sampel

Diambil 10 ml larutan induk, ditambah dengan  $\text{AlCl}_3$  dan larutan asam asetat glasial sampai 25 ml dalam labu terukur.

#### Pengukuran

Pengukuran dilakukan 30 menit setelah penambahan  $\text{AlCl}_3$  menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 425 nm dengan pembanding kuersetin.

#### Perhitungan

$$\% = \frac{C_p (A_s - Abs)}{(A_p - Abp)} \times 1,25 \times \frac{100}{\text{Berat sampel}}$$

$C_p$  = Konsentrasi pembanding

$A_s$  = Absorpsi sampel

$Abs$  = Absorpsi blanko sampel

$A_p$  = Absorpsi pembanding

$Abp$  = Absorpsi blanko pembanding

#### 4.5.2 Pemeriksaan NMDA, BDNF Hipokampus

Hipokampus yang difiksasi dari hemisfer kanan dihomogenisasi menggunakan *sonicator* dalam buffer lisis (20mM Tris, 137 mM NaCl, 1% NP-40 detergent, 10 % gliserol, 1mM phenylmethylsulfonylfluoride, (PMSF), 10 $\mu$ g/ml

aprotinin, 110µg/ml leupeptin, 0.5 mM sodium orthovanadate, kemudian di sentrifugasi pada 15000 x g selama 15 menit pada 4°C dan supernatan digunakan untuk analisis. Kadar NMDA, BDNF dianalisis menggunakan Elisa Kit masing-masing.

#### **4.6 Analisis Data**

Data dari seluruh variabel terukur dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan diuji statistik deskriptif, normalitas dan Uji inferensial meliputi *Kruskal wallis* atau *Analysis of variance (Anova)* yang apabila didapatkan perbedaan yang bermakna, dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U* atau *LSD (Least Significant Difference)* dengan tingkat kemaknaan  $p < 0,05$ .

**BAB 5****HASIL DAN PEMBAHASAN****5.1 Hasil Determinasi, Ekstraksi dan Skrining Fitokimia Terong Belanda (*Solanum betaceum*)**

Tanaman *Solanum betaceum* secara morfologis memiliki ciri buah dengan warna merah, berbentuk oval dengan ukuran panjang sekitar 5-6 cm serta lebarnya di atas 5 cm. Daging buah *Solanum betaceum* berwarna kekuningan dan dibungkus oleh selaput tipis. Daging buah ini terdiri atas lapisan luar yang memiliki kandungan air yang tinggi. Biji *Solanum betaceum* berwarna coklat muda hingga kehitaman dengan struktur yang keras dengan bentuk yang agak tumpul, bulat dan kecil namun lebih besar dari biji tomat (Kumalaningsih, 2006).

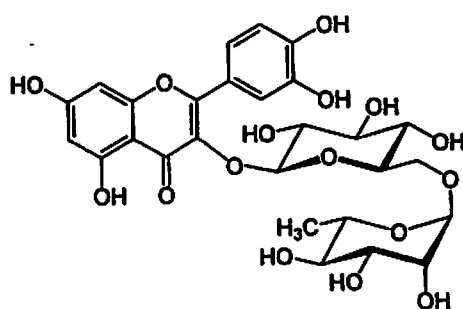
Sampel *Solanum betaceum* diperoleh dari perkebunan di Wonosobo, Jawa Tengah yang selanjutnya dilakukan identifikasi / determinasi tanaman di Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Penelitian Indonesia diperoleh hasil dengan jenis *Solanum betaceum* Cav. Sebanyak 20 kg sampel buah *Solanum betaceum* dikeringkan menggunakan *fresh dryer* dan diperoleh 1,5 kg kering yang selanjutnya diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol selama 3 x 24 jam pada suhu kamar sebanyak tiga kali. Ekstrak etanol *Solanum betaceum* selanjutnya diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 700 gram.

Ekstrak etanol *Solanum betaceum* selanjutnya dilakukan uji kualitatif skrining fitokimia meliputi identifikasi flavonoid dengan hasil positif, tanin dengan hasil positif, saponin dengan hasil negatif, alkaloid dengan hasil negatif, terpenoid dengan hasil positif, tanin galat dengan hasil positif dan tanin katekol





dengan hasil negatif (dapat dilihat pada tabel 5.1). Uji kuantitatif meliputi analisis total flavonoid sebesar 0,22 % b/b dan total kuersetin tidak ditemukan (dapat dilihat pada tabel 5.3). Uji skrining flavonoid menggunakan metode KLT ditemukan senyawa rutin pada Rf 0,26 -0,29 dan 0,25-0,28 (dapat dilihat pada tabel 5.2).

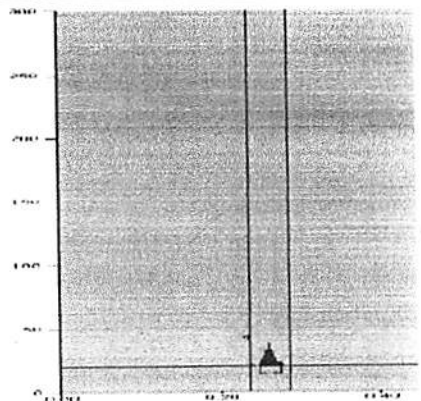


Gambar 5.1 Gambar senyawa rutin

Tabel 5.1 Hasil analisis kualitatif skrining fitokimia ekstrak etanol *Solanum betaceum* dengan berbagai metode.

Senyawa	Pereaksi	Perubahan warna	Hasil
Flavonid	HCl pekat dan Mg	Kemerahan	Positif
Alkaloid	Pereaksi Meyer	-	Negatif
Alkaloid	Pereaksi Dragendrof	-	Negatif
Alkaloid	Bouchardat	-	Negatif
Tanin	FeCl <sub>3</sub>	Biru kehitaman	Positif
Tanin galat	Natrium asetat dan FeCl <sub>3</sub>	Biru kehitaman	Positif
Tanin katekol	Formaldehid dan HCl pekat	-	Negatif
Terpenoid	Bouchardat	Kecoklatan	Positif
Saponin	Air panas dan HCl pekat	-	Negatif

Tabel 5.2 Hasil uji kualitatif skrining fitokimia ekstrak etanol *Solanum betaceum* dengan metode KLT

Eluen	Flavonoif		Hasil	Peak Display
	Rf	Jenis		
Etil asetat :	0,26-0,29	Rutin	Positif	
Asam Format : Aquades (85:10:15)	0,25-0,28	Rutin	Positif	

Tabel 5.3 Hasil uji kuantitatif ekstrak etanol *Solanum betaceum* dengan teknik spektrofotometri dan HPLC

Identitas dan keadaan sampel	Parameter	Hasil	Satuan	Teknik analisis
Ekstrak padatan	Total flavonoid	0,22	%b/b	Spektrofotometri
	Kuersetin	ttd	mg/g	HPLC

Keterangan : ttd (tidak terdeteksi)

## 5.2 Analisis *In Silico*

### 5.2.1 Uji *In silico* Beberapa Senyawa dan Metabolit *Solanum betaceum* dengan Enzim Asetilkolinesterase dan Reseptor NMDA.

*In silico* merupakan pendekatan relatif baru dalam penelitian menggunakan simulasi komputer untuk memprediksi bagaimana obat berinteraksi dalam tubuh dan patogen yang mulai digunakan secara luas dalam beberapa studi dan penelitian. Uji *In Silico* dilakukan untuk memprediksi interaksi antara ligan dan protein target.

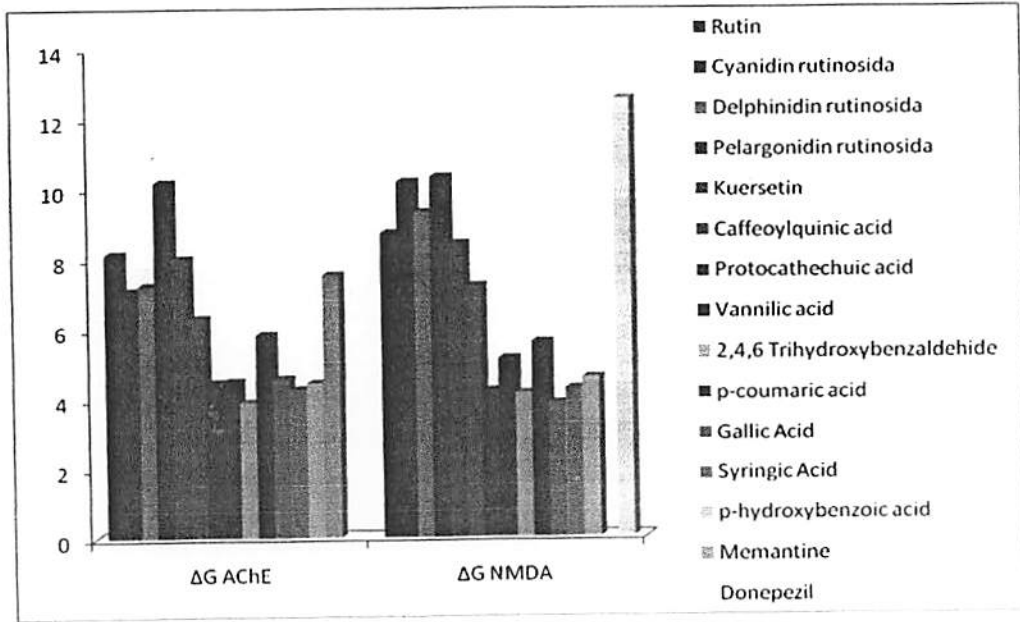
Uji *in silico* pada penelitian ini menggunakan beberapa senyawa dan metabolit *Solanum betaceum* diantaranya rutin (Khaerunnisa, 2018), Cyanidin-3-rutinoside (Cyn-3-rut), delphinidin-3-rutinoside (Dpn-3-rut), dan pelargonidin-3-rutinoside (Pgn-3-rut), senyawa metabolitnya yaitu kuersetin, Protocatechuic acid, Vanilic acid, 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde, p-coumaric acid, Gallic acid, Syringic acid, p-hydroxybenzoic acid (Chen *et al.*, 2017).

Metode analisis yang digunakan adalah docking molekular. Analisis docking molekular senyawa *Solanum betaceum* berdasarkan dua kriteria yaitu algorithm (pose optimal) dan scoring function yang dinilai dari perubahan energi bebas (tabel 5.4).

Tabel 5.4 Analisis docking molekular senyawa dan metabolit *Solanum betaceum* dengan Reseptor NMDA dan Asetilkolinesterase.

Ligan	Reseptor NMDA		Asetilkolinesterase	
	$\Delta G$ (kcal/mol)	IC <sub>50</sub> ( $\mu M$ )	$\Delta G$ (kcal/mol)	IC <sub>50</sub> ( $\mu M$ )
Rutin	-8,13	1,10 $\mu M$	-8,70	417,01nM
Cyanidin rutinosida	-7.07	6.60	-10.16	1.01
Delphinidin rutinosida	-7.22	5.10	-9.30	153 x10 <sup>-3</sup>
Pelargonidin rutinosida	-10.15	36.5 x10 <sup>-3</sup>	-10.30	28.3 x10 <sup>-3</sup>
Kuersetin	-8,00	1,37	-8,41	0,681 $\mu M$
Caffeoylquinic Acid	-6.29	24.53	-7.20	5.24
Protocatechuic acid	-4.46**	542.02 $\mu M$	-4.21*	819.55 $\mu M$
Vanilic acid	-4.49*	515.73 $\mu M$	-5.12**	176.84 $\mu M$
2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde	-3.90*	1.37 mM	-4.13*	946.33 $\mu M$
p-coumaric acid	-5.82**	54.79 $\mu M$	-5.59**	80.09 $\mu M$
Gallic acid	-4.58**	442.47 $\mu M$	-3.85*	1.50 mM
Syringic acid	-4.27*	737.69 $\mu M$	-4.27**	735.94 $\mu M$
p-hydroxybenzoic acid	-4.45*	545.11 $\mu M$	-4.59**	433.75 $\mu M$
Memantine	-7.52	3.06	-	-
Donepezil	-	-	-12.52	663 x10 <sup>-6</sup>

\*Based on cluster; \*\*Based on lowest energy



\*nilai ΔG dalam minus

Gambar 5.2 Histogram analisis docking beberapa senyawa dan metabolit *Solanum betaceum* dengan Asetilkolinesterase dan reseptor NMDA

Interaksi yang terjadi pada senyawa dari *Solanum betaceum* dengan enzim asetilkolinesterase dapat diketahui pada tabel 5.4.

Table 5.5. Residu asam amino esensial yang berinteraksi antara senyawa dan metabolit *Solanum betaceum* dengan enzim asetilkolinesterase.

Ligand	Jenis	Amino Acid
Merge (reference, donepezil, and native ligand)	CAS: Esteratic Site	Ser200, His440, Glu327
	CAS: Acyl Pocket	Phe288, Phe290
	CAS: Oxyanion Hole	Gly118, Gly119 dan Ala201
	CAS: Anion Site	Phe330, Trp84
	PAS	Trp279, Tyr334, Tyr70, Asp72, Tyr121
	Merge	Leu282, Arg289, Phe331
Cyanidin-3-Rutinoside (Cyn-3-rut)	CAS: Esteratic Site	Ser200, His440
	CAS: Acyl Pocket	Phe290, Phe288
	CAS: Oxyanion Hole	Gly118
	CAS: Anion Site	Phe330, Trp84
	PAS	Trp 279, Tyr 334, Tyr70, Asp72, Tyr121

	<b>Merge</b>	Phe331, Arg289
	<b>Other</b>	Ile444, Gly123, Gln69, Pro86, Val71, Asn85, Gly335, Tyr130, Glu199, Ile287
Delphinidin-3-rutinose (Dpn-3-rut)	<b>CAS: Esteratic Site</b>	Ser200, His440,
	<b>CAS: Acyl Pocket</b>	Phe290, Phe288,
	<b>CAS: Oxyanion Hole</b>	Gly119, Ala201
	<b>CAS: Anion Site</b>	Phe330, Trp84
	<b>PAS</b>	Asp72, Trp279, Tyr121, Tyr334
	<b>Merge</b>	Arg289, Phe331, Leu282
	<b>Other</b>	Asn85, Ser122, Gly117, Tyr130, Gly441, Ser81, Glu199
Pelargonidin-3-rutinose (Pgn-3-rut)	<b>CAS: Esteratic Site</b>	Ser200, His440
	<b>CAS: Acyl Pocket</b>	Phe288Phe290
	<b>CAS: Oxyanion Hole</b>	Gly118
	<b>CAS: Anion Site</b>	Phe330
	<b>PAS</b>	Tyr334, Tyr121, Tyr70, Asp72, Trp279
	<b>Merge</b>	Phe331, Leu282, Arg289
	<b>Other</b>	Ile287, Ser286, Glu199, Gly117, Leu127, Ser124, Gly123, Asn85, Val71, Ser122
Caffeoylquinic Acid (CQA)	<b>CAS: Esteratic Site</b>	Ser200, His440
	<b>CAS: Acyl Pocket</b>	Phe290, Phe288
	<b>CAS: Oxyanion Hole</b>	Gly118, Ala201
	<b>CAS: Anion Site</b>	Phe330, Trp84
	<b>PAS</b>	Trp279, Tyr334, Tyr121
	<b>Merge</b>	Arg289, Phe331
	<b>Other</b>	Ile287, Gly117, Ile 444, Tyr130, Glu199, Gly441
Kuesetin	<b>CAS: Esteratic Site</b>	Ser200, His440
	<b>CAS: Acyl Pocket</b>	
	<b>CAS: Oxyanion Hole</b>	Gly118
	<b>CAS: Anion Site</b>	Trp84
	<b>PAS</b>	Asp72, Tyr121, Tyr70

	<b>Merge</b>	Arg289, Phe331
	<b>Other</b>	Ser122, Asn85, Gln69, Pro86, Gly123, Leu127, Ser124, Gly117, Tyr130, Glu199, Ile444, Gly441
Rutin	<b>CAS: Esteratic Site</b>	Ser200, His440
	<b>CAS: Acyl Pocket</b>	Phe288, Phe290
	<b>CAS: Oxyanion Hole</b>	Gly118, Gly119, Ala201
	<b>CAS: Anion Site</b>	Phe330, Trp84
	<b>PAS</b>	Trp279, Tyr70, Asp72, Tyr121, Tyr334
	<b>Merge</b>	Phe331
	<b>Other</b>	Gly117, Asn85, Val71, Ser122, Phe335, Phe331, Ile444, Gly441, Gly199

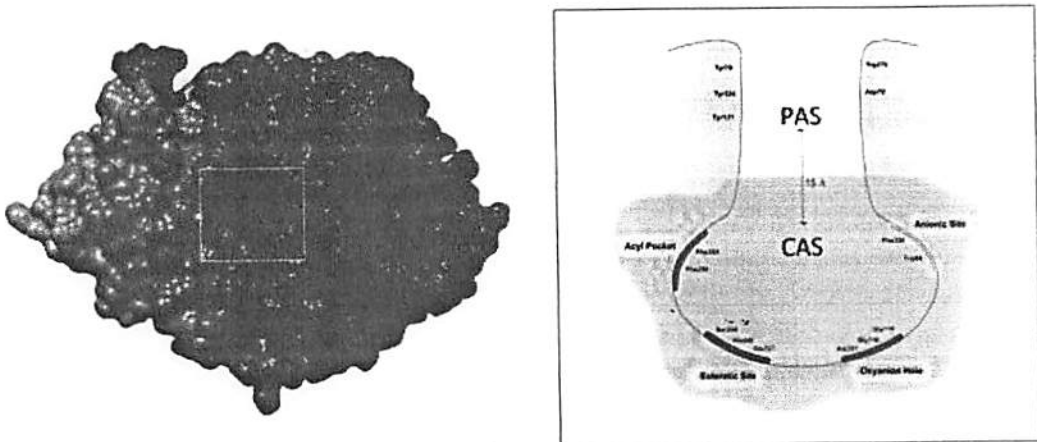
Secara umum keempat senyawa dari tanaman *Solanum betaceum* menunjukkan aktivitas yang potensial pada kedua protein, walaupun berdasarkan energi ikatannya protein *Acetylcholinesterase* (AChE) menunjukkan energi terendah terhadap ligandnya, sehingga terdapat kecenderungan untuk berikatan dengan protein tersebut.

#### 5.2.1.1 Interaksi Penghambatan Asetilkkolenesterasi (AChE)

Inhibitor AChE merupakan salah satu kelas utama obat-obatan yang bekerja membantu mengurangi gejala dan meningkatkan fungsi kognitif pada penyakit Alzheimer (Somani *et al.*, 2017). Inhibitor AchE bekerja dengan cara meningkatkan jumlah asetilkolin pada otak (Cambridgeshire and Peterborough, 2011). Asetilkolin berfungsi dalam mentransmisikan sinyal atau ransangan yang diterima untuk diteruskan di antara sel-sel saraf berdekatan atau pada sambungan neuromuscular. Aktivitas dari neurotransmitter ini dapat dihambat oleh enzim kolinesterase.

Analisis terhadap parameter AchE tidak dilakukan secara *invivo* dan *invitro* pada penelitian ini namun dilakukan menggunakan pendekatan *in silico*.

Teknik analisa yang digunakan yaitu membandingkan interaksi asam amino pada ligand terhadap data asam amino yang berinteraksi pada penelitian sebelumnya, *native ligand*, dan donepezil sebagai inhibitor AchE. Berdasarkan table 5.3. Didapatkan bahwa semua ligand dari *Solanum betaceum* memiliki tempat ikatan yang secara mayoritas bersesuaian terhadap titik interaksi yang penting di AChE, terutama titik pada CAS dan PAS.



Gambar 5.3 Analisis interaksi asam amino pada pocket enzim Asetilkolinesterase, struktur docking ligan pada core AchE (kiri), asam amino yang berperan (kanan).

Secara umum, semua senyawa dari tanaman *Solanum betaceum* menunjukkan aktivitas yang potensial terhadap *Acetylcholinesterase* (AChE) yang menunjukkan energi terendah terhadap ligandnya, sehingga terdapat kecenderungan untuk berikatan dengan protein tersebut.

Interaksi yang terjadi pada senyawa dan metabolit dari *Solanum betaceum* dapat diketahui pada Table 5.5 dengan teknik analisa yang digunakan yakni membandingkan interaksi asam amino pada ligand terhadap data asam amino yang berinteraksi pada penelitian sebelumnya, *native ligand*, dan donepezil sebagai inhibitor AchE. Berdasarkan Table 5.5 Didapatkan bahwa keempat ligand

dari *Solanum betaceum* memiliki tempat ikatan yang secara mayoritas bersesuaian terhadap titik interaksi yang penting di AChE, terutama titik pada CAS dan PAS.

### 5.2.1.2 Interaksi Penghambatan Reseptor NMDA

Struktur protein NMDA ialah suatu protein heterotetramer yang mengandung dua subunit *glycin or D-serine binding* GluN1 dan dua subunit L-glutamate binding GluN2, yang keduanya diaktivasi oleh ikatan dengan glisin dan glutamat pada subunit GluN1 dan GluN2 (Kumar & Patnaik 2016).

Secara umum, *GluN2B-selective antagonist are negative allosteric modulators* (antagonis non-kompetitif) seperti *phenylethanolamines* (ifenprodil) yang mengikat pada area *interface* antara GluN1 dan GluN2B pada amino terminal domains (ADT) (Hedegaard *et al.* 2012).

Struktur protein dimer amino terminal domain GluN1/GluN2B menunjukkan tempat ikatan untuk ifenprodil sebagai selektif antagonis GluN2B. Antagonis selektif GluN2B menunjukkan penghambatan yang kuat dibandingkan antagonis selektif subunit non-kompetitif lainnya (Ogden & Traynelis 2011).

Gugus amine pada Arg115 di GluN1b membentuk ikatan hydrogen dengan ifenprodil. Dari GluN2B gugus atom oksigen karbonil Glu236 dan Glu110 membentuk ikatan hydrogen dengan ifenprodil. Interaksi lemah ditemukan pada residu Arg115, Leu135, Tyr109, Phe113 dan Thr110 dari GluN1b dan residu Thr233, Iso111, Pro78, Glu110, Ala107, dan Phe176 dari GluN2B (Mazumder & Borah 2014)

Docking senyawa dan metabolit *Solanum betaceum* dengan reseptor NMDA diperoleh hasil gugus amine pada Arg115 di GluN1b membentuk ikatan hydrogen dengan ifenprodil. Dari GluN2B gugus atom oksigen karbonil Glu236



dan Glu110 membentuk ikatan hidrogen dengan ifenprodil. Interaksi lemah ditemukan pada residu Arg115, Leu135, Tyr109, Phe113 dan Thr110 dari GluN1b dan residu Thr233, Iso111, Pro78, Glu110, Ala107, dan Phe176 dari GluN2B (Mazumder & Borah 2014)

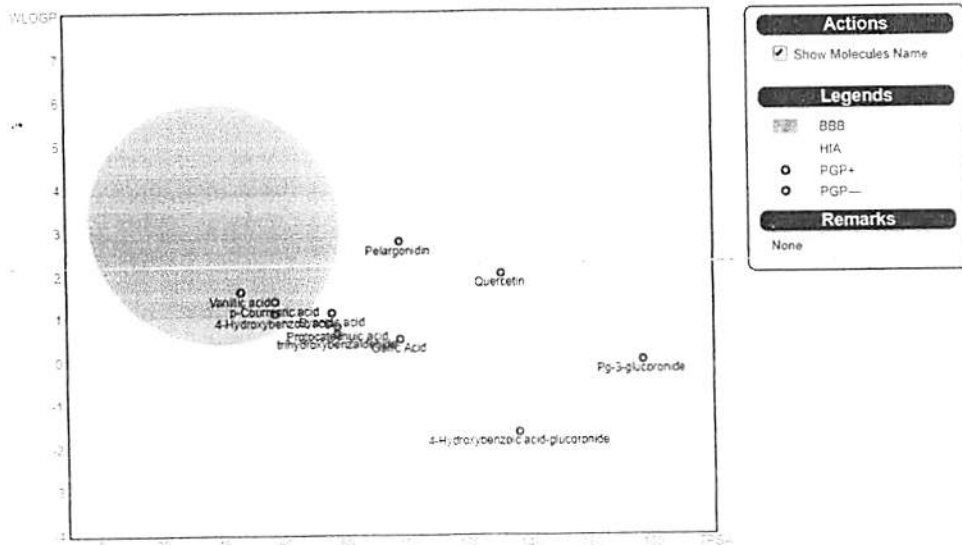
### 5.2.2 Analisis *In silico* ADME

Parameter evaluasi *In Silico* suatu senyawa dihitung menggunakan *web-based application*, untuk memprediksi sifat fisikokimia, kemiripan obat (*drug-likeness*), beberapa parameter profil farmakokinetik pada absorbtion, distribution, metabolism, and excretion (ADME).

Tabel 5.6. Analisis *in silico* parameter ADME, farmakokinetik, *druglikeness* dan kimia medis

Parameter	Rutin	Kueseti n	Cyn-3- rut	Dpn-3- rut	Pgn-3- rut	Mema ntine	Denepez il
<b>Physicochemical Properties</b>							
Formula	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N	C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> N O <sub>3</sub>
Molecular weight (g/mol)	610,52	302,24	595.53	611.53	579.53	179.30	379.49
<b>Lipophilicity</b>							
Log P <sub>o/w</sub> (iLOGP)	2,43	1,63	-4.22	-2.33	-3.90	2.51	3.92
Log P <sub>o/w</sub> (XLOGP3)	-0,33	1,54	-1.51	-1.87	-2.32	3.28	4.28
Log P <sub>o/w</sub> (WLOGP)	-1,69	1,99	-0.77	-1.06	-0.47	2.69	3.83
Log P <sub>o/w</sub> (MLOGP)	-3,89	-0,56	-3.08	-3.55	-2.61	3.02	3.06
Log P <sub>o/w</sub> (SILICOS-IT)	-2,11	1,54	-3.43	-3.90	-2.96	2.76	4.91
Consensus Log P <sub>o/w</sub>	-1,12	1,23	-2.60	-2.54	-2.45	2.85	4.00
<b>Water Solubility</b>							
Log S (ESOL)	-3,30 (Solubl e)	-3,16 (Solubl e)	-2.47 (Solubl e)	-2.33 (Solubl e)	-1.86 (Very Soluble )	-3.02 (Solubl e)	-4.81 (Moderat e)
Log S (Ali)	-4,87 (Solubl e)	-3,91 (Solubl e)	-3.28 (Solubl e)	-3.34 (Solubl e)	-2.02 (Solubl e)	-3.05 (Solubl e)	-4.81 (Moderat e)
Log S (SILICOS-IT)	-0,29 (Solubl e)	-3,24 (Solubl e)	0.28 (Solubl e)	0.88 (Solubl e)	-0.31 (Solubl e)	-2.80 (Solubl e)	-6.90 (Poorly)
<b>Pharmacokinetics</b>							

GI Absorption	Low	High	Low	Low	Low	High	High
BBB permeant	No	No	No	No	No	Yes	Yes
P-gp Substrate	Yes	No	No	No	No	No	Yes
CYP1A2 inhibitor	No	Yes	No	No	No	No	No
CYP2C19 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No
CYP2C9 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No
CYP2D6 inhibitor	No	Yes	No	No	No	No	Yes
CYP3A4 inhibitor	No	Yes	No	No	No	No	Yes
Log $K_p$ (skin permeation)	-10,26 cm/s	-7,05 cm/s	-11.00 cm/s	-11.36 cm/s	-11.48 cm/s	-5.06 cm/s	-5.58 cm/s
<b>Druglikeness</b>							
Lipinski Rule	No; 1 <i>violatio</i> <i>n</i>	Yes; 0 <i>violatio</i> <i>n</i>	No; 3 <i>violatio</i> <i>n</i>	No; 3 <i>violatio</i> <i>n</i>	No; 3 <i>violatio</i> <i>n</i>	Yes; 0 <i>violatio</i> <i>n</i>	Yes; 0 <i>violatio</i> <i>n</i>
Bioavailabiity Score	0,17	0,55	0.17	0.17	0.17	0.55	0.55



Gambar 5.4. Analisis *In Silico* permeabilitas beberapa senyawa dan metabolit *Solanum betaceum* pada *Blood Brain Barrier*

Selain aktivitas penghambatan senyawa pada AChE yang kuat, parameter mendasar dalam inhibitor AChE ialah kemampuan senyawa menembus atau berpenetrasi di BBB sehingga perlu mempertimbangkan sifat fisikokimia senyawa, sedangkan permeabilitas BBB suatu senyawa dipegaruhi oleh lipofilisitas, *hydrogen-bond desolvation potential*, ukuran molekul, dan muatan pKa (Wei *et al.*, 2016; Dhanalakshmi & Manavalan 2015).

Kelayakan senyawa dijadikan kandidat obat perlu memiliki karakteristik berdasarkan *Lipinski's rule of five* ( $\text{mol\_MW} < 500$ ,  $\text{QPlogPo/w} < 5$ ,  $\text{donorHB} \leq 5$ ,  $\text{accptHB} \leq 10$ ) untuk memprediksi senyawa kandidat dapat berpenetrasi kedalam CNS (Meena *et al.* 2015). Berdasarkan aturan keempat ligand, senyawa Cyn-3-rut, Pgn-3-rut, dan Dpn-3-rut memiliki gugus *glycosyl* berupa rutinose, yang membuat ukuran senyawa lebih besar.

### 5.3 Hasil Uji In Vivo pada model hewan coba Alzheimer

#### Hasil Analisis Deskriptif

Hasil analisis rerata dan simpang baku uji memori pada kelompok K<sub>0</sub>, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub> dan K<sub>4</sub> dapat dilihat pada tabel 4.1 berikut.

Tabel 5.7 Hasil analisis rerata, median, minimum dan maksimum parameter Memori

Variabel	Kategori	Kelompok				
		K0	K1	K2	K3	K4
Memori	Rerata	10,71	35,71	15,85	15,57	16,71
	minimum	3	20	4	3	3
	maksimum	21	83	50	33	51
	Median	11	27	13	8	16

Keterangan :

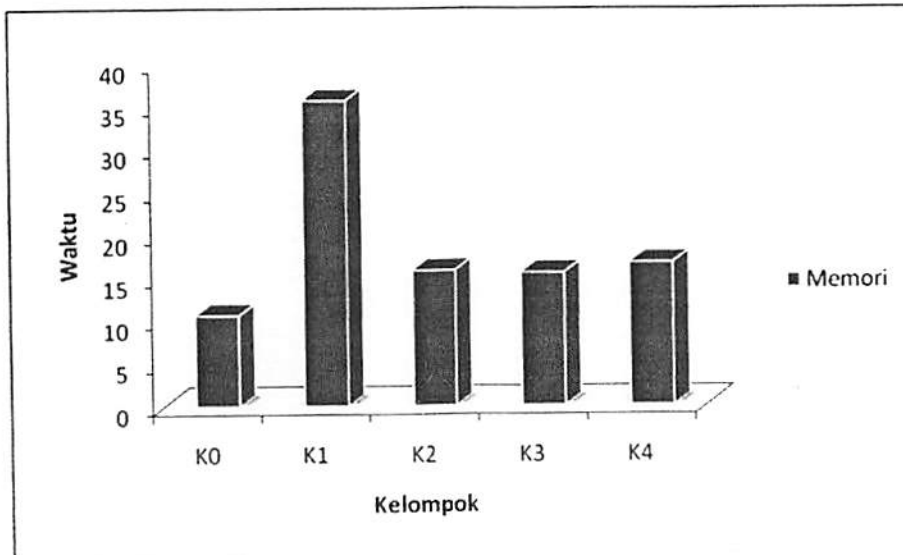
K<sub>0</sub> : Kelompok standar (kontrol negatif)

K<sub>1</sub> : Kelompok kontrol positif

K<sub>2</sub> : Kelompok perlakuan 1

K<sub>3</sub> : Kelompok perlakuan 2

K<sub>4</sub> : Kelompok perlakuan 3



Gambar 5.5 Grafik rerata memori (*escape latency*)

### Hasil Uji Normalitas

Data diuji dengan uji normalitas *Kolmogorv Smirnov test*. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa variabel memori berdistribusi tidak normal yaitu terdapat dua kelompok dengan nilai  $p < 0,05$ . Hasil uji normalitas dapat dilihat pada tabel 5.8.

Tabel 5.8 Hasil uji normalitas ( $p$ ) *Kolmogorv Smirnov test*

Kelompok Memori	$p$
K0	0,200*
K1	0,156*
K2	0,104*
K3	0,047
K4	0,010

\*Signifikan

### Uji Inferensial

#### Hasil Analisis Inferensial

Perbedaan seluruh anggota kelompok pada variabel memori memiliki data berdistribusi tidak normal sehingga dilakukan uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan

*Mann Whitney U* apabila terdapat perbedaan bermakna untuk keseluruhan kelompok. Hasil untuk uji *Kruskal Wallis* seluruh kelompok terhadap variabel dependent dapat dilihat pada tabel 5.9.

Tabel 5.9 Hasil uji *Kruskal Wallis* pada variabel Memori

<i>Dependent Variabel</i>	df	Sig <sup>a</sup>
Memori	7	0,038*

Data tabel 5.9 menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) pada uji memori sehingga untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dilanjutkan menggunakan uji *Mann Whitney U* yang dapat dilihat pada tabel 5.10.

Tabel 5.10 Hasil uji *Mann Whitney U*

Dependent variabel	Kelompok (I)	Kelompok (J)	Sig.
Memori	K0	K1	0,002*
		K2	0,607
		K3	0,564
		K4	0,653
	K1	K2	0,018*
		K3	0,047*
		K4	0,018*
	K2	K3	0,149
		K4	0,748
	K3	K4	0,898

\* = signifikan

Hasil uji *Mann Whitney U* menunjukkan bahwa pada kelompok K<sub>0</sub> dan K<sub>1</sub>, kelompok K<sub>1</sub> dan K<sub>2</sub>, kelompok K<sub>1</sub> dan K<sub>3</sub>, kelompok K<sub>1</sub> dan K<sub>4</sub> terdapat perbedaan bermakna uji memori dengan nilai  $p < 0,05$ , sedangkan kelompok lainnya tidak terdapat perbedaan bermakna dengan nilai  $p > 0,05$ .

Perlakuan paparan Aluminium sebagai perlakuan model Alzheimer pada hewan coba diberikan kepada kelompok K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub> dan K<sub>4</sub> dengan dosis 3% selama 8 minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan Aluminium dapat

menurunkan secara bermakna memori hewan coba yang ditunjukkan oleh peningkatan waktu mencapai target pada Morris Water Maze antara kelompok kontrol negatif (K0) dan kelompok kontrol positif (K1). Pemberian ekstrak etanol *Solanum betaceum* sebagai efek terapi dapat memperbaiki memori hewan coba Alzheimer secara signifikan.

Berdasarkan hasil analisis dan studi literatur menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Solanum betaceum* mengandung berbagai macam senyawa polifenol diantaranya yang paling banyak ditemukan adalah golongan flavonoid yang dilaporkan memiliki efek yang baik bagi kesehatan otak antara lain meningkatkan *learning* dan memori (Spencer, 2009; Spencer, 2014; Vaozhour, 2013; Rendeiro, Rhodes & Spencer, 2015; Johnston, 2015; Moosavi *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016).

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya bahwa ekstrak etanol *Solanum betaceum* dapat mencegah penurunan memori pada *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok. Mekanisme kerja preventif ekstrak etanol *Solanum betaceum* terhadap penurunan memori akibat paparan asap rokok melalui jalur dengan mengaktifkan CREB, merupakan faktor transkripsi yang selanjutnya menstimulasi terbentuknya BDNF dan akan meningkatkan jumlah sel mikroglia dan oligodendrosit serta astrosit sehingga dapat meningkatkan memori otak (Khaerunnisa *et al*, 2018).

**BAB 6****RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA****6.1 Rencana Tahapan Berikutnya**

Hasil penelitian analisis *in silico* telah menunjukkan hasil yang diharapkan namun pada penelitian ini tetap diperlukan penambahan waktu perlakuan terhadap hewan coba untuk menguji hasil tersebut secara eksperimental dan dapat terlihat seperti harapan.

**Hasil Tahun 1** yang telah diperoleh adalah analisis skrining fitokimia dalam *Solanum betaceum* menunjukkan terdapatnya flavonoid, tannin, terpenoid, tannin galat, dengan total flavonoid sebesar 0,22% b/b. Hasil uji KLT densitometry menunjukkan ditemukan senyawa Rutin pada Rf 0.26 -0.29 and 0.25-0.28. Uji yang telah dilakukan secara *in Silico* berbasis komputasi menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang terdapat dalam *Solanum betaceum* memiliki potensi yang cukup besar untuk menghambat  $\beta$ -Secretase, asetilkolinesterase dan NMDA, protein penting pada Alzheimer. Hasil uji *in silico* tersebut berbanding lurus dengan hasil uji *in vivo* pada *Rattus norvegicus* model Alzheimer. Pemberian ekstrak etanol *Solanum betaceum* dosis 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB dapat memperbaiki memori secara bermakna *Rattus norvegicus* yang dipapar Aluminium sebagai model Alzheimer. Penelitian ini menggunakan model hewan coba karena tidak memungkinkan dilakukan uji pada manusia. Uji memori menggunakan morris water maze yang diukur melalui *escape latency*. Hasil ADME-toxicity menunjukkan bahwa senyawa potensial dalam *Solanum betaceum* tidak mempengaruhi aktivitas CYP450 sehingga diprediksi aman bagi tubuh.



**Uji lanjutan Tahun 1 akan dilakukan analisis pengaruh *herba Solanum betaceum* terhadap hewan coba yang dipapar Aluminium sebagai model hewan coba AD mengukur parameter biokimiawi yang terlibat dalam pembentukan memori pada model Alzheimer yaitu NMDA dan BDNF hipokampus.**



## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Simpulan

1. Hasil analisis skrining flavonoid menggunakan metode KLT pada sampel *Solanum betaceum* ditemukan senyawa rutin pada Rf 0,26 -0,29 dan 0,25-0,28.
2. Hasil uji *in silico molecular docking* memprediksikan bahwa senyawa rutin dan beberapa metabolit lainnya efektif sebagai inhibitor terhadap enzim Asetilkolinesterase dan tidak efektif pada mekanisme kerja penghambatan reseptor NMDA.
3. Pemberian ekstrak etanol *Solanum betaceum* dapat memperbaiki kemampuan learning dan memori pada model hewan coba Alzheimer.
4. Penentuan NMDA dan BDNF masih dalam proses pemeriksaan lanjutan yang diperkirakan akan selesai pada awal Desember 2018.

#### 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penambahan waktu untuk menyelesaikan perlakuan terhadap hewan coba agar diperoleh hasil yang diharapkan.





**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 259/EC/KEPK/FKUA/2018

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA. TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN. MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

**EKSPLORASI POTENSI HERBA *SOLANUM BETACEUM* SEBAGAI TERAPI PADA  
MODEL HEWAN COBA ALZHEIMER**

PENELITI UTAMA :

**Prof. Dr. Indri Safitri Mukono, dr.,M.S.  
Dr. Agus Turchan, dr.,SpBS  
Hanik Badriyah, dr.,SpS.**

**Prof. Dr. Suhartati, dr.,M.S.  
Siti Khaerunnisa, M.Si**

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN

**Lab. Hewan Uji Biokimia Dep. Biokimia Kedokteran FK Unair, Lab. Fitokimia dan Farmakognosi FF Unair, Pusat Penelitian Biologi Bidang Botani Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Bogor, Lembaga Penyakit Tropik Unair, Lab. Patologi Anatomi Gedung Diagnostik Terpadu RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan Lab. Histologi Dept. Anatomi dan Histologi FK Unair**

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**

Surabaya, 1 Oktober 2018

KETUA

Prof. Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr. MS. Sp MK (K)

## DAFTAR PUSTAKA

- Albrekkan FM, Worden MK, 2013, 'Mitochondrial dysfunction and alzheimer's disease', *Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*, 3; 14-19.
- Ballinger, SW, Patterson, C, Yan, CN, Doan, R & Burow, DL, Young, CG, Yakes, FM, Van Houten, B, Ballinger, CA, Freeman, BA, Runge, MS 2000, 'Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells', *Circulation Research*, 86(9):960-966.
- Barrick and Clark, 2011, *The nervous system, in Sherwood, L, Human Physiology; From cell to system, ninth edition*, USA: Chengage learning, pp 157-163.
- Butterfield DA, Swomley AM, and Sultana R, 2013, 'Amyloid b-Peptide (1-42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression', *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(8): 823-835.
- Eckert A, Schmitt K and Gotz J, 2011, 'Mitochondrial dysfunction - the beginning of the end in Alzheimer's disease? Separate and synergistic modes of tau and amyloid- $\beta$  toxicity', *BioMed Central*, 3(15) ; 1-11.
- Espin, S, Manzano, SG, Taco, V, Poveda, C, Durán, BA, Paramas, AMG, Buelga, CS, 2016, 'Phenolic composition and antioxidant capacity of yellow and purple-red Ecuadorian cultivars of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.)', *Food Chemistry*, 194: 1073-1080.
- Gayton and Hall, 2011, *Textbook of medical physiology, twelfth edition*, Philadelphia: Saunders, pp.704-718.
- Iskandar Japardi, 2002, Penyakit Alzheimer, Usu Digital Library, Page 1-11.
- Janicka M, Wasik AK, Kot J, and Namieśnik J, 2010, 'Isoprostanes-Biomarkers of Lipid Peroxidation: Their Utility in Evaluating Oxidative Stress and Analysis', *Int. J. Mol. Sci*, 11: 4631-4659
- Jayadev S, Steinbart EJ, Chi YY, Kukull WA, Schellenberg GD, Bird TD, 2008, 'Conjugal alzheimer disease: risk in children when both parents have alzheimer disease'. *Arch Neurol*, 65(3): 373-378.
- Kandel, ER, Schwartz, JH, Jessl, TM, Siegelbaum, SA, Husdspath, AJ, 2013, *Principle of neural science, fifth edition*, USA: McGraw-Hill, pp.1447-1483.
- Klafki HW, Staufenbiel M, Kornhuber J, Wiltfang J, 2006, 'Therapeutic approaches to alzheimer's disease', *Brain*, 129: 2840-2855.
- Kusumoputro S, Sidiarto LD, 2004, *Mengenal awal pikun Alzheimer*, Jakarta : UI-Press, 1-15



- Madeo J and Elsayad C, 2013, 'The role of oxidative stress in alzheimer 's disease', *J Alzheimers Dis Parkinson*, 3(2) ;1-5
- Mertz, C, Gancel, AL, Gunata, Z, Alter, P, Mayer, CD, Vaillant , F, Perez, AM, Ruales, J, Brat, P, 2009, 'Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits', *Journal of Food Composition and Analysis*, 22 : 381–387.
- Modi H, Patel V, Patel K, Shrimanker M and Bhadani S, 2012, 'A review on PPAR $\gamma$ - a novel therapeutic target for alzheimer's disease', *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(3): 1397-1405.
- Nallakurumban, P, Suja. N, Vijayakumar, A, Geetha, Karpagapandi, L, 2015, 'Estimation of Phytochemicals and Antioxidant Property of Tamarillo (*Solanum betaceum*) and A Value Added Product Tamarillo Sauce', *IJSPR*, 9(2): 61-65.
- Richardsz SS, Sweet RA. Dementia. In: Sadock BJ, Sadock VA, Ruiz P. Comprehensive text book of psychiatry volume 1. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2009; 1176-1185.
- Sharma, VK, 2009, 'Morris water maze: a versatile cognitive tool', *J Biosci Tech*, vol. 1, pp. 15-19.
- Song JH, Yu, JT, Tan L, 2014, ' Brain-derived neurotrophic factor in alzheimer's disease: risk, mechanism and therapy', *Mol Neurobiol*.
- Suh YH, Checler F, 2002, 'Amyloid precursor protein, presenilins, and  $\alpha$ -synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological application in alzheimer disease', *Pharmacol Rev*. 54: 469-525.
- Suhartati dan Khaerunnisa S, 2013, *Metabolisme Karbohidrat dan Siklus Asam Sitrat*, Surabaya : AUP
- Yegambaram M, Manivannan, B, Beach, TG, Halden, RU, 2015, 'Role of environmental contaminant in the etiology of alzheimer's disease: a review', *Current Alzheimer's Research*, 12, 116-146.

**Lampiran 1. Ethical clearance**

**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 259/EC/KEPK/FKUA/2018

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN. MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL:

**EKSPLORASI POTENSI HERBA *SOLANUM BETACEUM* SEBAGAI TERAPI PADA  
MODEL HEWAN COBA ALZHEIMER**

**PENELITI UTAMA**

**Prof. Dr. Indri Safitri Mukono, dr.,M.S.  
Dr. Agus Turchan, dr.,SpBS  
Hanik Badriyah, dr.,SpS.**

**Prof. Dr. Suhartati, dr.,M.S.  
Siti Khaerunnisa, M.Si**

**UNIT - LEMBAGA TEMPAT PENELITIAN**

**Lab. Hewan Uji Biokimia Dep. Biokimia Kedokteran FK Unair, Lab. Fitokimia dan Farmakognosi FF Unair, Pusat Penelitian Biologi Bidang Botani Lembaga Ilmu Pengetahuan Inonesia Bogor, Lembaga Penyakit Tropik Unair, Lab. Patologi Anatomi Gedung Diagnostik Terpadu RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan Lab. Histologi Dept. Anatomi dan Histologi FK Unair**

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**

Surabaya, 1 Oktober 2018

**KETUA**

Prof. Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr. MS., Sp MK (K)

Patient-Centered Laboratory Medicine

# LMCE 2018 & KSLM 59<sup>th</sup> Annual Meeting

NOVEMBER 1-3, 2018

Grand Walkerhill Seoul, Korea

www.lmce-kslm.org

2018-08-31

Name: Siti Khaerunnisa  
Affiliation: Airlangga University  
Country: Indonesia

Dear Siti Khaerunnisa

It is my great pleasure to announce that LMCE 2018 (Laboratory Medicine Congress & Exhibition) & KSLM 59<sup>th</sup> Annual Meeting (for short "LMCE 2018") will be held from November 1 to 3, 2018 in Seoul, Korea.

Since our first congress in 2016, LMCE has seen remarkable growth. Last year's congress resulted in a marvelous success with over 1,200 attendees from 30 countries and established LMCE as one of the best opportunities to learn and share about Laboratory Medicine. For the upcoming LMCE 2018, we are preparing for a highly dynamic and stimulating array of scientific programs under the theme 'Patient-Centered Laboratory Medicine

I hope you will join us at the LMCE 2018 and have a meaningful time with global scholars in a beautiful city of Seoul.

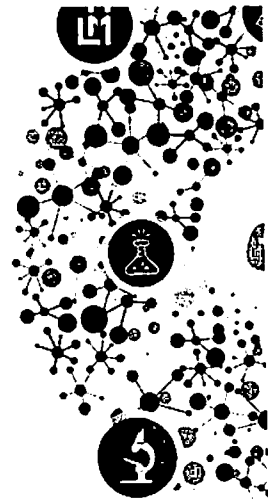
This invitation letter is to be used as an official document for securing travel permission from your institution or Korean Embassy. Be advised, this invitation does not represent an agreement to cover any travel expenses such as airfare, ground transportation, hotel, meals or travel insurance.

We look forward to welcoming you to the LMCE 2018 in Seoul.

Yours Sincerely,



Junghan Song, MD, PhD  
Chairman, Organizing Committee of LMCE 2018  
CEO, Korean Society for Laboratory Medicine

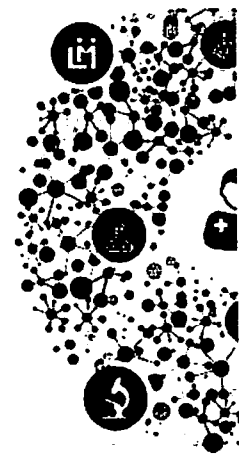


**LMCE 2018 & KSLM 59<sup>th</sup> Annual Meeting**

NOVEMBER 1-3, 2018

Grand Walkerhill Hotel, Seoul, Korea

www.lmce-kslm.org



Dear Dr. Siti Khaerunnisa,

We greatly appreciate your abstract submission to the LMCE 2018 (Laboratory Medicine Congress & Exhibition) & KSLM 59<sup>th</sup> Annual Meeting.

We are pleased to announce that your abstract has been accepted for **Poster Presentation**.

The following are the details of your presentation and registration.

**1. Abstract Acceptance Information**

<b>Abstract No.</b>	<b>A-000186</b>
<b>Abstract Title</b>	<b>Screening and In Silico analysis of bioactive compound from Solanum betaceum as Alzheimer drug therapy</b>
<b>Accepted for</b>	<b>Poster Presentation</b>
<b>Presenter</b>	<b>Siti Khaerunnisa</b>

For more inquiries, please feel free to contact us at any time.

Yours sincerely,

Junghan Song, M.D., Ph.D.  
Chairman, Organizing Committee of LMCE 2018  
CEO, Korean Society for Laboratory Medicine

## RESEARCH

# Screening and *In Silico* analysis of bioactive compound from *Solanum betaceum* as Alzheimer drug therapy

Siti Khaerunnisa<sup>1</sup>, Hanik Badriyah Hidayati<sup>2</sup>, Agus Turchan<sup>3</sup>, Suhartati<sup>1</sup>, Yuani Setiawati<sup>4</sup>, Rizki Awaluddin<sup>5</sup>, Rizky Rahmatyah<sup>6</sup>, **Indri Safitri<sup>1\*</sup>**

1. Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya 60132;
  2. Departement of Neurology, Dr.Soetomo Hospital- Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, 60132;
  3. Departement of Neurosurgeon, Dr.Soetomo Hospital- Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, 60132;
  4. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya 60132;
  5. Department of Pharmacy, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta 55584;
  6. Medical Coassistant, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, 60132;
- \*Corresponding author : [indrisafitri@gmail.com](mailto:indrisafitri@gmail.com)

## Abstract

**Background:** Elderly human populations around the world are now facing an Alzheimer's Disease (AD) epidemic, with the number of cases estimated to increase to 106 million by 2050. Therapy in AD patients currently uses a combination of drugs that cost quite high. Research on the effectiveness of herbal plants is now attracting attention to be studied as a preventive and therapeutic effort for various diseases.

**Objective:** The aims of this study was to screen bioactive compound belong to *Solanum betaceum* which analyse with potential protein involve in AD e.g. AChE and NMDA to find a potential synergistic interaction to inhibit memory loss.

**Methods:** Phytochemical screening includes identification of flavonoids, tannins, saponins, alkaloids, terpenoids, tannins and catechol tannins. Quantitative tests were carried out to determine the total number of flavonoids using spectrophotometric methods and total quercetin using the HPLC method. The qualitative flavonoid test was continued using the TLC densitometry method. Insilico docking studies were carried out using Autodock 4,2 and ADME toxicity (ADMET) using SwissADME powered by ChemAxon.

**Results:** The results showed that positive test of phytochemical screening includes flavonoids, tannins, terpenoids, gallic tannin with total flavonoids were 0.22% w/w. Flavonoid screening test using TLC-Densitometry method found routine compounds. Both of native and their metabolite compounds from *Solanum betaceum* has low binding energy ( $\Delta G$ ) on three protein of AD. ADMET analysis don't show effect on derivative of CYP450 inhibitor, it indicates the low level of toxicity.

**Conclusion:** *Solanum betaceum* contains various kinds of bioactive compounds which have a positive effect on health. The molecular docking and ADMET analysis of *Solanum betaceum*'s bioactive compounds could lead to the further development of potent AChE and NMDA inhibitors for the treatment of Alzheimer disease.

**Keywords:** *Solanum betaceum*; *Acetylcholinesterase*; *NMDA*; *Alzheimer*.

## Background

Elderly human populations around the world are now facing an Alzheimer's Disease (AD) epidemic, with the number of cases estimated to increase to 106 million by 2050. According to estimates, by 2050 there will be around 3 million people with

dementia in Indonesia and 55, 6 percent of them were caused by AD. The treatment of Alzheimer's and other dementia can have an impact on the family as a caregiver in the form of physical impact, emotional impact, social impact and economic impact. The most effective way to save is if the onset of Alzheimer's can be suspended or the number



of incidents is reduced by preventive methods arising from new research. Although AD is not curable at this time, it is possible that the right treatment can reduce some symptoms such as wandering and incontinence.

Therapy in people with AD currently uses a combination of memantine (NMDA receptor blocking) and donepezil (inhibits cholinesterase) to inhibit the progression of memory loss and other cognitive function disorders, but therapy using this drug costs quite high.

Research on the effectiveness of herbal plants is now attracting attention to be studied as a preventive and therapeutic effort for various diseases. *Solanum betaceum* (Dutch eggplant) is one of the plants that is abundant in Indonesia but its utilization is still very lacking. Several studies report that *Solanum betaceum* has a high enough antioxidant phytochemical component, namely anthocyanin, flavonol, phenolic acid and carotenoids.

Preliminary tests conducted in In Silico showed that the compounds found in *Solanum betaceum* on the activity of cholinesterase and  $\beta$ -Secretase enzymes and NMDA receptors, had a low danG and Ki that showed predictive abilities that were almost comparable to memantine and donepezile. The results of ADME-toxicity indicate that the potential compounds in *Solanum betaceum* do not affect CYP450 activity and have a high solubility that is predicted to be safe.

## Methods

### Phytochemical Screening

#### Identification of Flavonoids

Two (2) ml extract samples were added in 8 ml of distilled water which had been heated for  $\pm 10$  minutes  $\rightarrow$  Filtrates were filtered and put into a test tube  $\rightarrow$  Added concentrated HCl a few drops  $\rightarrow$  Added a little Mg powder  $\rightarrow$  Positive Results: red color old / pink

#### Identification of Tannins

Two (2) ml samples were added in 8 ml of distilled water which had been heated for  $\pm$

10 minutes  $\rightarrow$  Filtrate filtered and put into a test tube  $\rightarrow$  Added 3 drops of FeCl<sub>3</sub> 1%  $\rightarrow$  Positive results: blackish brown, blackish blue, green black.

#### Identification of Saponin

Two (2) ml of the sample was added in 8 ml of distilled water which had been heated for  $\pm 10$  minutes  $\rightarrow$  Filtrate filtered and put into a test tube  $\rightarrow$  Added 2ml of hot water  $\rightarrow$  Strongly shaken  $\rightarrow$  Positive Result: formed permanent foam for no less from 10 minutes as high as 1-10 cm  $\rightarrow$  Added concentrated HCl 1 drop  $\rightarrow$  Positive Result: permanent foam is not lost.

#### Identification of Alkaloids

Two (2) ml samples were added in 8 ml of distilled water for  $\pm 10$  minutes  $\rightarrow$  Filtrates were filtered and put into three test tubes  $\rightarrow$  Added 6 drops of Meyer Reagent to the first test tube, 6 drops of Dragendrof Reagent on the second test tube and 6 drops of Bouchardat Reagent on the third test tube  $\rightarrow$  Positive Results: there is a white precipitate in the Alkaloids with Meyer Reagent, there are orange deposits on the Alkaloids with Dragendrof Reagents, and there are brown deposits on the Alkaloids with the Bouchardat Reagent.

#### Identification of Terpenoid

Two (2) grams of extract sample were added in 20 ml of distilled water which had been heated for  $\pm 10$  minutes  $\rightarrow$  Filtrat filtered and put into a test tube  $\rightarrow$  Added 3 drops of bouchardat  $\rightarrow$  Positive Results: bluish green color containing Steroid Terpenoid, color orange or brown orange containing Triterpenoid Terpenoid.

#### Identification of Tanin Galat

A half (0.5) ml sample was added with a little sodium acetate  $\rightarrow$  Added FeCl<sub>3</sub> 1%  $\rightarrow$  Positive color in blue ink / black.

#### Identification of Katekol Tanin

A half (0.5) ml sample was added with a small amount of 3% Formaldehyde solution: concentrated HCL (2: 1)  $\rightarrow$  Heated to 90°  $\rightarrow$  Positive color of red sediment.

**Determination of Total Flavonoids****Reactor**

HMT solution : 0.5% w/v  
 hexamethylentetramine solution  
 HCl solution : 25% HCl solution  
 Glacial acetic acid solution: 5% v / v glacial  
 acetate solution in methanol  
 AlCl<sub>3</sub> Solution : 2% AlCl<sub>3</sub> solution in  
 glacial acetic acid solution

**Main solution**

The extract equivalent to 200 mg of simplicia was put into a round bottom flask, plus 1 ml of HMT solution, 20 ml of acetone and 2 ml of HCl solution, hydrolyzed by reflux for 30 minutes. The mixture is filtered using cotton, the filtrate is put into a 100 ml measuring flask. The residue was refluxed again with 20 ml of acetone reaching 100 ml. The filtrate mixture in the flask was measured plus acetone up to 100 ml. The filtrate mixture was put into a separating funnel, added 20 ml of water and extracted 3 times each with 15 ml of ethyl acetate. The ethyl acetate fraction was collected and added with ethyl acetate to 50 ml in a measured flask.

**Blank solution**

Taken 10 ml of the main liquor, added with glacial acetic acid to 25 ml in a measured flask.

**Sample solution**

Taken 10 ml of the mother liquor, plus AlCl<sub>3</sub> and glacial acetic acid solution to 25 ml in a measured flask.

**Measurement**

Measurements were made 30 minutes after the addition of AlCl<sub>3</sub> using a spectrophotometer at a wavelength of 425 nm with a quercetin comparison.

**Calculation**

$$\% = \frac{C_p (A_s - A_{bs})}{(A_p - A_{bp})} \times 1,25 \times \frac{100}{\text{Berat sampel}}$$

C<sub>p</sub> = Comparison concentration  
 A<sub>s</sub> = sample absorption  
 A<sub>bs</sub> = Absorption of sample blanks

A<sub>p</sub> = comparison absorbance  
 A<sub>bp</sub> = Absorption comparison form

**Total Quercetin**

Total quercetin was determined using HPLC based procedure (Hertog, Hollman and Venema, 1992; Tszynska, 2013). Two mobile phases are used. The first mobile phase consisted of 25% acetonitrile in 0.025 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.4) with a flow rate of 0.9 ml / minute (eluent 1). The second eluent consisted of 45% methanol in 0.025 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with a flow rate of 0.9 ml / minute (eluent 2). The sample output detector uses Nelson (Nelson, Cuertino, CA) 900 interface series and Nelson intergator software. Quantification based on the peak area generated by Nelson. Eluent 1 is used for quantification of compounds, eluent 2 is used to identify additional peaks. If there are both quercetin and luteolin, eluent 2 is used to quantify the flavonoids. Hewlett-Packard model 1040 A phototid array UV-Vis detector is used to record the UV flavonoid spectrum in the sample. The peak is considered pure when there is a definite peak (the peak match of the pure compound > 990). Similarly, peak features were confirmed by superimpose spectra of each standard spectrum peak and compared with retention time (0.5% time window) in both eluents. The peak is only quantified if the peak is in accordance with the criteria mentioned above. The comparison used was quercetin dissolved in methanol so that the concentration of 500 µg / ml and stored in 4°C.

**TLC-Densitometry****Sample preparation**

A total of 0.5 grams of sample were added as much as 10 ml of distilled water for ± 10 minutes. Furthermore, the filtrate is filtered and put into a test tube and then treated with 60F254 silica gel

**Eluent preparation**

Eluent used by ethyl acetate: formic acid: distilled water with a ratio of 85: 10:15

**Identification**

Identification of flavonoid compounds using

TLC densitometry method which showed that there were routine compounds indicated by Rf 0.26-0.29 and 0.25-0.28.

### In Silico Analysis

#### Data Set

A number of data from 6 compounds with 3D structure as multi target inhibitor, that are: Rutin (CID\_5280805), Quercetin (CID\_5280343), Cyanidin-3-O-rutinoside (CID\_441674), Delphinidin-3-O-rutinoside (CID\_44256887), Pelargonidin-3-O-rutinoside (CID\_443917), and Caffeoylquinic Acid (CID\_12310830). Memantine (CID\_4054) dan Donepezil (CID\_3152), Gallic Acid (CID\_370), 2,4,6-trihydroxy benzaldehyde (CID\_68099), p-Coumaric Acid (CID\_637542), p-Hydroxybenzoic Acid (CID\_135), Protocatechuic Acid (CID\_72), Syringic Acid (CID\_10742), Vanilic Acid (CID\_8468) which is downloaded from the PubChem page (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). Protein as an action target, that is  $\beta$ -Secretase (PDB ID:2PQ8), N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptor (PDB ID: 3QEL), Achethyl Cholinesterase (PDB ID: 1EVE). The protein database is selected and downloaded on the UniProt page (<http://www.uniprot.org>) and RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>).

#### Molecular Docking

Ligand undergo geometry optimization with Force Field type MMFF94 using Avogadro version 1.2. Autodock version 4.2 used for protein optimization by removing water and other atoms then adding a polar hydrogen group. Autogrid then carried out in the native ligand position on the binding site by arranging the grid coordinates (x, y, z). Ligand tethering of the protein is done by regulating genetic algorithm parameters with 50 runs of GA criteria. The analysis is done by studying Gibbs Energy ( $\Delta G$ ) and Inhibition Constant (IC50) parameters which are classified based on the lowest energy or cluster.

### Interaction Analysis

The docked protein complexes are visualized using the Discovery Studio Visualizer version 16 (BIOVIA) to determine the interaction of ligands with amino acids on the binding site.

#### ADME Analysis

Each ligand was analyzed using SwissADME server (<http://www.swissadme.ch>) from Swiss Institute of Bioinformatics supported by ChemAxon) by analyzing physicochemical, lipophilicity, solubility, pharmacokinetic, and drug likeness parameters. The ADMET assessment was conducted to predict pharmacokinetics and drug candidate toxicity to avoid the risk of undesirable drug reactions in therapy.

### Results and Discussion

#### Bioactive compounds belong to *Solanum betaceum*

*Solanum betaceum* plants are morphologically characterized by fruit in red, oval in shape with a length of about 5-6 cm long and larger than 5 cm. *Solanum betaceum* fruit is yellowish and wrapped in a thin membrane. This flesh consists of an outer layer that has a high water content. *Solanum betaceum* seeds are light brown to black with a hard structure with a rather blunt shape, round and small but larger than tomato seeds (Kumalaningsih, 2006).

The results of the analysis and identification of phytochemical screening with various methods found that the ethanol extract of *Solanum betaceum* contained phytochemical compounds including flavonoids, tannins, and terpenoids (Table 5.1). These results are supported by previous studies which analyzed phenolic compounds in *Solanum betaceum* rich in hydroxynamic (421.6 mg / 100g dry) and anthocyanin (168.9 mg / 100g dry) (Espin et al., 2016). In this study quantitative tests of total flavonoids were carried out by spectrophotometric method and the results obtained were 0.22% b/b.

The results of flavonoid screening analysis using TLC method found routine compounds at Rf 0.26 -0.29 and 0.25-0.28.

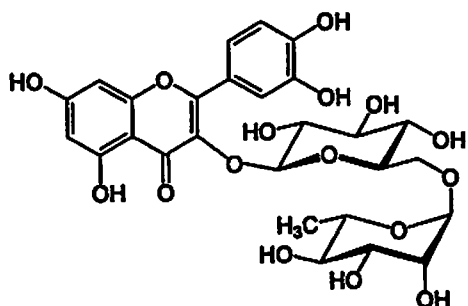


Figure 1. Routine compound images Numerous studies suggest that *Solanum betaceum* contains anthocyanin flavonoids including Cyanidin-3-rutinoside (Cyn-3-rut), delphinidin-3-rutinoside (DPn-3-rut), and pelargonidin-3-rutinoside (Pgn-3-rut) is an anthocyanidin derivative compound with different C-3 and C-5 position groups on the B. pelargonidin ring is known to have lower bond energy with C-3 and C-5 groups in the form of hydrogen groups, which makes the structure of Pgn-3-rut more stable ( Miguel 2011).

#### In Silico Analysis Test of In Silico Compounds and Metabolites on Acetylcholinesterases (AChE) and NMDA Receptors

The In Silico test is carried out to predict the interaction between ligands and target proteins. In this study the ligands used were routine compounds, and their metabolites and some anthocyanin compounds were reported in the research of Chen et al., 2017 and their metabolites.

In general, the four compounds of the *Solanum betaceum* plant show potential activity in both proteins, although protein-based Acetylcholinesterase (AChE) energy bonds show the lowest energy to the ligand, so there is a tendency to bind to the protein.

#### Interaction Inhibition of Acetylcholinesterase (AChE)

Inhibition of the AchE action occurs on the active side, it is known to have cavity with amino acids that interact with the ligand. In general, the cavity has two areas as the site of the catalytic active site (CAS) interaction and the peripheral anionic site (PAS), both of which contain important interaction points that determine

the inhibitory activity of the AChE enzyme. The CAS lies at the deepest basis of the site / cavity binding, characterized by several combinations of anionic areas, where the interaction of the AChE enzyme occurs; An esteratic site containing three amino acid residues as a catalytic area; Oxyanion and acyl pocket areas that select the substrate on the AChE binding site. While the PAS is located more outside about 15Å of CAS [21].

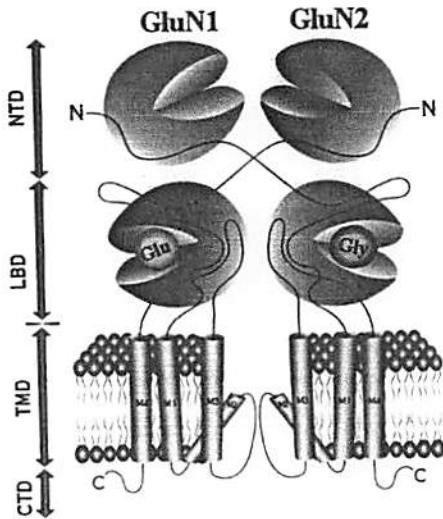
The esteratic area occurring in the CAS is an important area of interaction and contains the Ser200, His440, and Glu327 amino acids which will be the catalysis area that transfers the acetyl group from acetylcholine (Ach) to Ser200. Anionic areas contain aromatic amino acids such as Trp84 and Phe330 which also play a role in the hydrolysis of ACh. During the enzymatic reaction, a complex transition is made and stabilized by Gly118, Gly119, and Ala201 by forming a hydrogen bond, ie in the oxyanion area. While the acyl pocket area determines the specific criteria of the substrate, determined by the aromatic amino acids Phe288 and Phe290 by preventing access of large molecules to the catalysis area. The area that also interacts with the ligands is the peripheral anionic site (PAS) situated adjacent to or near the CAS and contains the aromatic residues Tyr70, Tyr121, Tyr334, Trp279, and Asp72. So interactions in CAS and PAS become parameters of ligand-protein interaction analysis [22–24].

The interaction of the compound from *Solanum betaceum* can be seen in Table 2. The analytical technique used is comparing the amino acid interactions in the ligand to the amino acid data interaction in previous studies, native ligand, and donepezil as the AchE inhibitor. Based on Table 2. It was found that the four ligands of *Solanum betaceum* have a majority bonding place to the important interaction points in AChE, especially the points on CAS and PAS.

#### Interaction Inhibition of NMDA Receptors

The NMDA protein structure is a heterotetramer protein containing two

Glycine or D-serine binding GluN1 subunits and two L-glutamate binding GluN2 subunits, both of which are activated by bonding with glycine and glutamate in the GluN1 and GluN2 subunits [16].



**Figure 2.** Structure of GluN1 and GluN2 Subunits on NMDA receptors (Kane & Costa 2015)

In general, GluN2B-selective antagonists are negative allosteric modulators such as phenylethanolamines (ifenprodil) that bind to the interface area between GluN1 and GluN2B in amino terminal domains (ADT) [18].

The structure of the terminal of dimer amino protein such as GluN1 / GluN2B shows the bonding site for ifenprodil as a selective GluN2B antagonist. The GluN2B selective antagonist shows strong inhibition over the selective antagonists of other non-competitive subunits [19].

The amine group at Arg115 in GluN1b forms a hydrogen bond with ifenprodil. From GluN2B the carbonyl oxygen atomic groups Glu236 and Glu110 form hydrogen bonds with ifenprodil. Weak interactions were found in the residues Arg115, Leu135, Tyr109, Phe113 and Thr110 from GluN1b and Thr233, Iso111, Pro78, Glu110, Ala107, and Phe176 residues from GluN2B [20].

At NMDA receptors it was found that the anthocyanin derivative compounds had activity which was generally not much

different from memantine as standard ligand. Although it was found that the 3-rut showed the lowest energy (-10.15 kcal / mol) lower than the memantine inhibition activity. The 3-rut showed activity on the amino acid residues Ser132, Glu236, Arg115, Phe113, and Asp136 forming hydrogen bonds; And amino acid residues Glu106, Gly112, Ile335, Ala107, Thr110, Pro78, Ile82, Phe114, Met134, Ala135, Thr174, Leu135, Met207, Thr233, Tyr175 and Lys131 with van der Waals interactions; Amino acids Phe176, Pro177, Ile133, Ile111 with alkyl interactions; Amino acid Tyr109 with Pi-sigma interaction. Thus, a similar interaction was obtained in the amino acid Arg115, Phe113, Leu135, Tyr109, Phe113, Thr110 on the GluN1b subunit; And amino acids Thr233, Glu110, Pro78, Ala107, Phe176 which show similarity of interaction points although from different types of interactions.

Meanwhile, the degradation or metabolism result compounds have various activities, which p-coumaric acid has a stronger inhibitory activity than other ligands. In addition, p-coumaric acid is also thought to penetrate the BBB with high bioavailability and can provide powerful pharmacological activity.

### Inhibitor Activity and Multi-Target Interaction Mechanism

Multi-target protein inhibition mechanisms including beta secretase, NMDA, and acetylcholinesterase may inhibit the damage or apoptosis of neuron cells in Alzheimer's patients [9]. Molecular docking is done on the protein crystal by setting the cavity where the ligand bonds to the protein. Energy inhibition of ligand in multi-target proteins can be seen in Table 1., the four ligands of the Solanum betaceum shows varying activity.

Cyanidin-3-routine (Cyn-3-rut), delphinidin-3-routine (Dpn-3-rut), and pelargonidin-3-routine (P-3-rut) are anthocyanidin derivatives with different C-3 and C-5 in the B. pelargonidin ring are known to have lower bonding energies with C-3 and C-5 groups in the hydrogen

group, which makes the P-3-rut structure more stable (Miguel 2011). On the other hand, caffeoylquinic acid (CQA) exhibits low bond energy with high intensity, meaning that CQA can occupy the bonding site and can minimize interactions in other amino acids. In fact, in previous studies experimentally derived CQA showed

neuroprotection activity in NMDA induced cell damage [10].

In general, the four compounds of the *Solanum betaceum* exhibit potential activity on all three proteins, based on their bond energy Acetylcholinesterase (AChE) show the lowest energy to the ligand, thus, there is a tendency to bind to the protein.

**Table 1.** Molecular docking analysis of native and metabolite compounds with NMDA and AChE

Ligan	NMDA Receptor		Acetylcholinesterase	
	$\Delta G$ (kkal/mol)	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$\Delta G$ (kkal/mol)	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )
Rutin	-8,13	1,10uM	-8,70	417,01nM
Cyanidin rutinosida	-7.07	6.60	-10.16	1.01
Delphinidin rutinosida	-7.22	5.10	-9.30	153 x10 <sup>-3</sup>
Pelargonidin rutinosida	-10.15	36.5 x10 <sup>-3</sup>	-10.30	28.3 x10 <sup>-3</sup>
Kuersetin	-8,00	1,37	-8,41	0,681 uM
Caffeoylquinic Acid	-6.29	24.53	-7.20	5.24
Protocatechuic acid	-4.46**	542.02 uM	-4.21*	819.55 uM
Vanilic acid	-4.49*	515.73 uM	-5.12**	176.84 uM
2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde	-3.90*	1.37 mM	-4.13*	946.33 uM
p-coumaric acid	-5.82**	54.79 uM	-5.59**	80.09 uM
Galic acid	-4.58**	442.47 uM	-3.85*	1.50 mM
Syringic acid	-4.27*	737.69 uM	-4.27**	735.94 uM
p-hydroxybenzoic acid	-4.45*	545.11 uM	-4.59**	433.75 uM
Memantine	-7.52	3.06	-	-
Donepezil	-	-	-12.52	663 x10 <sup>-6</sup>

\*Based on cluster; \*\*Based on lowest energy

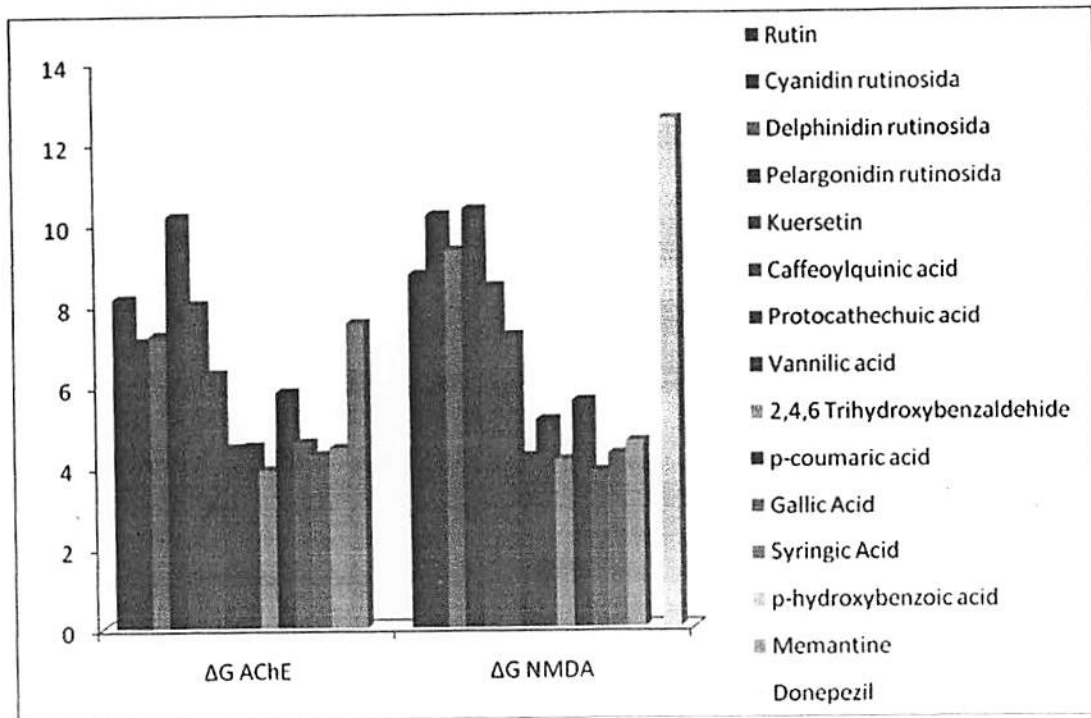


Figure 3. Histogram of native compound and three potential protein in Alzheimer disease based on  $\Delta G$  energy

Cyanidin-3-routine (Cyn-3-rut), delphinidin-3-routine (Dpn-3-rut), and pelargonidin-3-routine (P-3-rut) are anthocyanidin derivatives with different C-3 and C-5 in the B. pelargonidin ring are known to have lower bonding energies with C-3 and C-5 groups in the hydrogen group, which makes the P-3-rut structure more stable (Miguel 2011). On the other hand, caffeoylquinic acid (CQA) exhibits low bond energy with high intensity, meaning that CQA can occupy the bonding site and can minimize interactions in other amino acids. In fact, in previous studies experimentally derived CQA showed neuroprotection activity in NMDA induced cell damage [10].

In general, the four compounds of the *Solanum betaceum* exhibit potential activity on all three proteins, based on their bond energy. Acetylcholinesterase (AChE) show the lowest energy to the ligand, thus, there is a tendency to bind to the protein.

as hydrogen bond donor (HBD) in BACE1. The presence of a carbonyl group on the substrate / ligand as a hydrogen bond

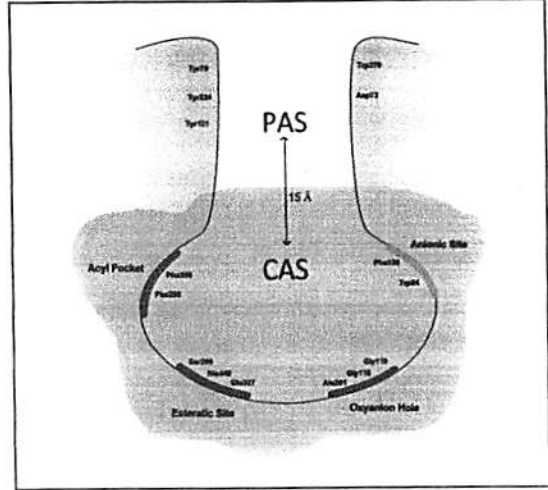
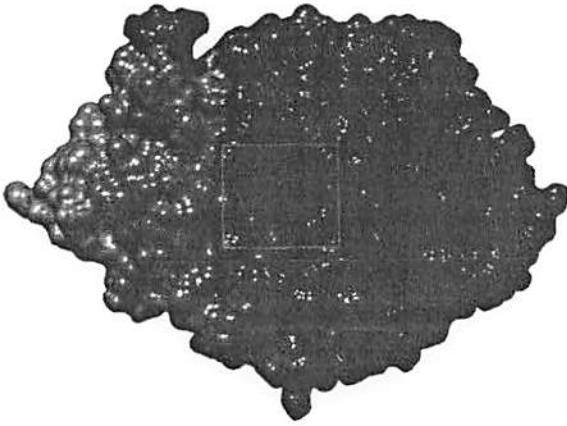
acceptor (HBA) which can interact with Thr232 and Gln73 residues [14].

The active aspartate residue (Asp32 and Asp228) is planar and in the Apo forms a hydrogen bond with a single water molecule between the two. The presence of water molecules is used to initiate nucleophilic interactions into hydrogen bonds in the carbonyl group peptide when the bonding occurs with the substrate. Residues 67-77 occur in  $\beta$ -hairpin conformations located outside the active site and forming a flap. The flap will open as long as the substrate enters, and is closed during the catalysis stage and reopens to release the hydrolysis product [15].

Thus, based on this finding, it is found that ligand interaction as an inhibitor against BACE1 needs to observe the point of interaction on the active side that gives pharmacological effect. The p-Coumaric Acid compound (the degradation product of cyaniding by gut microbiota) has the lowest energy in BACE1, which has an H-Bond interaction with carboxyl and hydroxyl groups on Asp3, Asp289 and Phe169 amino acid residues; And formed

the Van Der Walls interaction with the residues of Gly95, Ile179, Leu91, Trp176, Phe170, Ile171, Lys168, Gln134, Gly291, Thr292, Gly135. This compound is thought to be able to penetrate the BBB (based on SwissADME) and provide pharmacological effects through interaction with amino acid residues in the

binding site that have been described previously (Fig. 2).



**Figure 4.** The shape and structure of cavity compilers on AChE; The ligand is attached to the cavity (left) and the amino acid sequence that plays a role in the interaction (right).

**Table 2.** Essential Amino Acid Residue of Acetylcholinesterase Enzyme

Ligand	Amino Acid
Reference	CAS: Trp84, Phe330, Ser200, His440, Glu327, Phe288, Phe290, Gly118, Gly119 dan Ala201 PAS: Tyr70, Tyr121, Tyr334, Trp279, Asp72
Donepezil	Ile 287, Gly 335, Phe 288, Trp 279, Phe 290, Leu 282, Ser 122, Gly 123, Gln 69, Tyr 70, Pro 86, Val 71, Asn 85, Trp 84, Asp 72, Ser 81, Ser 286, Arg 289, Tyr 121, Phe 330, Tyr 334, Phe 331
Native Ligand	Gly 118, Gly 117, Glu 199, Gly 441, His 440, Phe 288, Phe 290, Ser 286, Arg 289, Leu 282, Tyr 121, Tyr 70, Trp 84, Phe 330, Trp 279, Phe 331, Tyr 334

**Table 3.** Essential Amino Acid Residue of Acetylcholinesterase Enzyme with native compound belong to *Solanum betaceum*

Ligand	Types	Amino Acid
Merge (reference, donepezil, and native ligand)	CAS: Esteratic Site	Ser200, His440, Glu327
	CAS: Acyl Pocket	Phe288, Phe290
	CAS: Oxyanion Hole	Gly118, Gly119 dan Ala201
	CAS: Anion Site	Phe330, Trp84
	PAS	Trp279, Tyr334, Tyr70, Asp72, Tyr121
	<b>Merge</b>	Leu282, Arg289, Phe331



Cyanidin-3-Rutinoses (Cyn-3-rut)	<b>CAS: Esteratic Site</b>	Ser200, His440
	<b>CAS: Acyl Pocket</b>	Phe290, Phe288
	<b>CAS: Oxyanion Hole</b>	Gly118
	<b>CAS: Anion Site</b>	Phe330, Trp84
	<b>PAS</b>	Trp 279, Tyr 334, Tyr70, Asp72, Tyr121
	<b>Merge</b>	Phe331, Arg289
	<b>Other</b>	Ile444, Gly123, Gln69, Pro86, Val71, Asn85, Gly335, Tyr130, Glu199, Ile287
Delphinidin-3-rutinoses (Dpn-3-rut)	<b>CAS: Esteratic Site</b>	Ser200, His440,
	<b>CAS: Acyl Pocket</b>	Phe290, Phe288,
	<b>CAS: Oxyanion Hole</b>	Gly119, Ala201
	<b>CAS: Anion Site</b>	Phe330, Trp84
	<b>PAS</b>	Asp72, Trp279, Tyr121, Tyr334
	<b>Merge</b>	Arg289, Phe331, Leu282
	<b>Other</b>	Asn85, Ser122, Gly117, Tyr130, Gly441, Ser81, Glu199
Pelargonidin-3-rutinoses (Pgn-3-rut)	<b>CAS: Esteratic Site</b>	Ser200, His440
	<b>CAS: Acyl Pocket</b>	Phe288Phe290
	<b>CAS: Oxyanion Hole</b>	Gly118
	<b>CAS: Anion Site</b>	Phe330
	<b>PAS</b>	Tyr334, Tyr121, Tyr70, Asp72, Trp279
	<b>Merge</b>	Phe331, Leu282, Arg289
	<b>Other</b>	Ile287, Ser286, Glu199, Gly117, Leu127, Ser124, Gly123, Asn85, Val71, Ser122
Caffeoylquinic Acid (CQA)	<b>CAS: Esteratic Site</b>	Ser200, His440
	<b>CAS: Acyl Pocket</b>	Phe290, Phe288
	<b>CAS: Oxyanion Hole</b>	Gly118, Ala201
	<b>CAS: Anion Site</b>	Phe330, Trp84
	<b>PAS</b>	Trp279, Tyr334, Tyr121
	<b>Merge</b>	Arg289, Phe331
	<b>Other</b>	Ile287, Gly117, Ile 444, Tyr130, Glu199, Gly441
Kuesetin	<b>CAS: Esteratic Site</b>	Ser200, His440
	<b>CAS: Acyl Pocket</b>	
	<b>CAS: Oxyanion Hole</b>	Gly118
	<b>CAS: Anion Site</b>	Trp84
	<b>PAS</b>	Asp72, Tyr121, Tyr70
	<b>Merge</b>	Arg289, Phe331
	<b>Other</b>	Ser122, Asn85, Gln69, Pro86, Gly123,

Leu127, Ser124, Gly117, Tyr130, Glu199,  
Ile444, Gly441

Rutin	CAS: Esteratic Site	Ser200, His440
	CAS: Acyl Pocket	Phe288, Phe290
	CAS: Oxyanion Hole	Gly118, Gly119, Ala201
	CAS: Anion Site	Phe330, Trp84
	PAS	Trp279, Tyr70, Asp72, Tyr121, Tyr334
	Merge	Phe331
	Other	Gly117, Asn85, Val71, Ser122, Phe335, Phe331, Ile444, Gly441, Gly199

**In silico ADME analysis**

In Silico evaluation parameters is that a compound is calculated using a web-based application to predict

physicochemical properties, drug-likeness, some pharmacokinetic profile parameters in absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME).

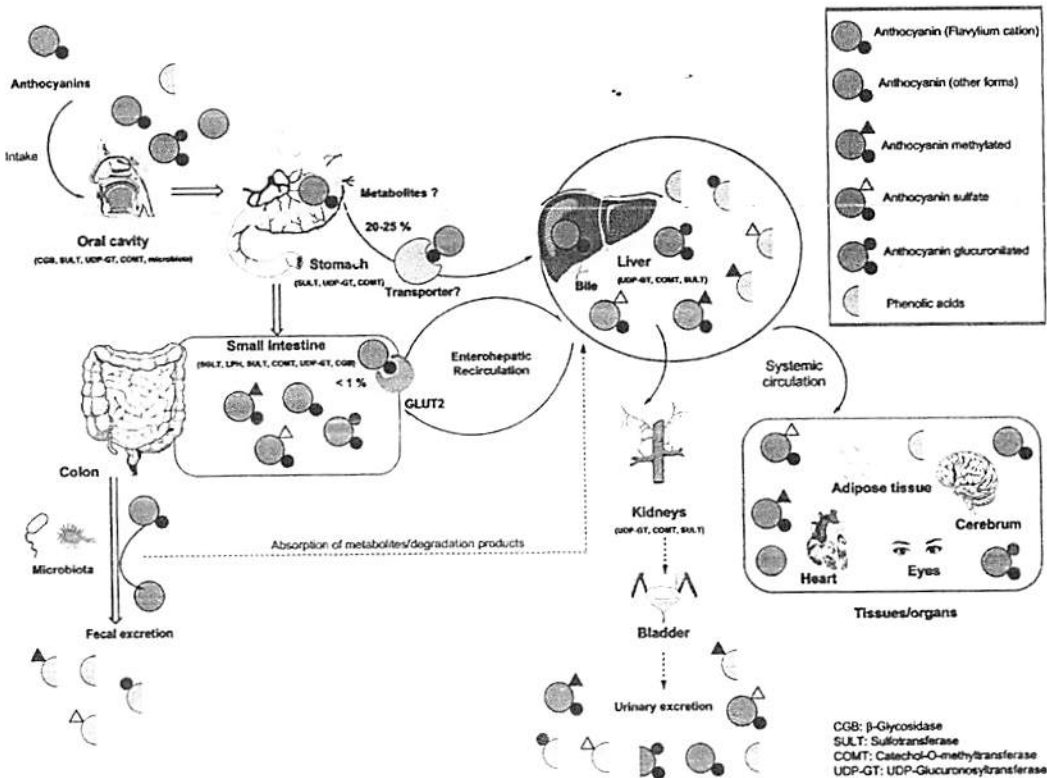


Figure 5. The anthocyanin absorption, distribution and metabolism scheme (Fernandes & Faria 2013)

In addition to the strong inhibitory activity of AChE, the fundamental parameter in AChE inhibitors is the ability of compounds to penetrate the BBB, thus it is necessary to consider the

physicochemical properties of the compound, while the permeability of the BBB is affected by lipophilicity, hydrogen-bond desolvation potential, molecular size, and cargo pKa [25,26].

The eligibility of the compound to be a drug candidate should have characteristics based on Lipinski's rule of five (mol\_MW <500, QPlogPo / w <5, donorHB ≤ 5, accptHB ≤ 10) to predict the candidate compound to penetrate into the CNS (Meena et al 2015). Based on the four ligand rules, the Cyn-3-rut, P-3-rut, and Dpn-3-rut compounds have a glycosyl group of routine, which makes the compound size larger.

The toxicity of a compound can be seen through its interaction with CYP450 derivative inhibitors such as CYP1A2 inhibitors, CYP2C19 inhibitors, CYP2C9 inhibitors, CYP2D6 inhibitors and CYP3A4 inhibitors. One of the low test toxicity requirements of a drug candidate is that it does not interact with the CYP450 derivative inhibitor.

#### *Absorption and Bioavailability of anthocyanins*

Anthocyanins are part of the flavonoid derivatives and it is reported that anthocyanins have rapid absorption, but the lowest bioavailability in flavonoids [28].

In the previous study, it was found that the bioavailability of Dpn-3-glu and Cyn-3-glu was lower than Dpn-3-rut and Cyn-3-rut. Thus, the effectiveness of

The anthocyanin that can not be absorbed in the stomach are rapidly absorbed in the intestine, especially in the form of bases such as anthocyanin quinodal pseudobase. It was explained in previous research that intestinal absorption is aided by glucose transporter (SGLT1), GLUT2, or hydrolysis by brush border enzyme prior to passive diffusion. Moreover, gut microbiota also assist in the termination of glycosidic bonds and anthocyanins degrade into other compounds that can be detected in large amounts of blood plasma [27,30,31].

In general, the absorption of anthocyanins in different organs produce the bioavailability of the compound in the blood plasma of different anthocyanins, including anthocyanins (native form), anthocyanin conjugated (-glukoronidasi, -

anthocyanin derivatives as disease prevention or treatment depends on bioavailability. Therefore, anthocyanin pharmacological activity is influenced by glycosylation, sugar properties (glycons), and also modulated by its aglycone properties [29].

In the gastric organ, most of anthocyanin absorption occurs in the jejunum (55%) and less absorption occurs in the duodenal (10%). The absorption of anthocyanin in vivo experiment shows the anthocyanin's ability to penetrate the gastric mucosa. The anthocyanin-glucoside form can be absorbed rapidly and efficiently up to 25% (depending on anthocyanin type), then quickly excreted in the form of bile and its metabolites. The mechanism of anthocyanin absorption in the GI is not clearly known, but the anticlinic kinetic anthocyanin (flux) information in GI becomes an important point in understanding anthocyanin absorption. Bilitranslokase bring anthocyanins in acidic conditions and is inhibited by anthocyanins quinodal base (pH 4-6), while the shape quinodal pseudobase (pH 4-5) will be facilitated absorption diffusion through GLUT1 transporter, OAT2, SMCT1 and SMCT2.

metilasi, acetylation, etc.), or in the form of a simple compound degradation products. In previous studies, anthocyanins can be used as a neuroprotective spinal cord [32] and Alzheimer's therapy that reaches the brain through the BBB in the form of anthocyanins and its metabolites [33].

#### *Biotransformation*

In general, flavonoid metabolism occurs in 2 compartments, ie in the first component occurs in tissues such as the small intestine, liver, and kidney. While the colon (colon) contains a second compartment. Absorbed and unabsorbable flavonoids will be secreted with bile to reach the colon [28].

In vitro studies, it was found that the increase of B-ring hydroxylation in

pelargonidine, cyaniding and delphinidin was associated with decreased stability, which can be affected by various factors such as pH, temperature, concentration, solvents, enzymes, etc. There are 4 changes of structure influenced by pH, ie flavylum cation, quinodial base, carbinol (quinodal pseudobase) and chalcone forms. Anthocyanins are more stable in acidic conditions (pH 1-3) in the form of flavylum cation. While the pH > 4 condition, the anthocyanin will change in the form of carbinol and chalcone, then chalcone structure will experience degradation and produce phenolic acid and aldehyde products [30].

Although it is undeniable, *p*-hydroxybenzoic acid is found in rats 2 hours after digestion, which does not mean biotransformation can occur in the gastric, but instability and degradation of anthocyanidin occurs in gastric [27].

Human microbiota has an enzymatic system that has ability to metabolize and produce metabolite compounds with different bioavailability and pharmacological activities (Rafaela et al., 2017). Previous studies have reported that gut microbiota plays a role in anthocyanin degradation of 31.24-46.17% by five intestinal bacteria (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *B. animalis*, *S.thermophiles*), whereas non-enzymatic degradation occurs around 19.42% for 48 hours. The effect of metabolism by bacteria will break the glycosidic bond and break the anthocyanin heterocyclic ring. Cyn-3-rut, Dpn-3-rut and Pgn-3-rut produce biotransformation products of chologenic acid, crypto-genic acid, caffeic acid and ferulic compounds (Table 4.) produced by gut microbiota for 24 hours, eventhough there is no biotransformation mechanism by enzymes in gut microbiota known by the scientist [31,34].

**Table 4.** Biotransformation of anthocyanins produced by gut mycrobiota for 24 hours (Chen et al. 2017)

Molecule	Metabolite	Status	Permeation	
			GI	BBB
Cyn-3-rut	Protocatechuic acid	Main*	High	No
	Vanilic acid	Main*	High	Yes
	2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde	Main*	High	No
	<i>p</i> -coumaric acid	Main*	High	Yes
	Caffeic acid	Minor	High	No
	Tartaric acid	Minor	High	No
	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	Minor	High	Yes
	Catechol	Minor	High	Yes
Dpn-3-rut	Gallic acid	Main*	High	No
	Syringic acid	Main*	High	No
	2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde	Main*	High	No
	Ferulic acid	Minor	High	Yes
	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	Minor	High	Yes
	Pyrogallol	Minor	High	Yes
Pgn-3-rut	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	Main	High	Yes

\* Compounds produced in the first 4 hours

The evaluation result of ADMET major native compound on *Solanum betaceum* showed that its molecular size caused a

small absorption value of GI (see table 4), but after the degradation process in the intestine and biotransformation, it resulted

in various active metabolite compounds (see table 3). It active metabolite had physicochemical properties which differs from the native compound with high GI absorption value and compound that able to penetrate the BBB (see figure 5). The predicted results of ADMET in silico also show that native anthocyanin compounds do not interact with the derivative of CYP450 inhibitor (see table 4), thus, it is predicted to have very low toxicity. Molecular docking results show that native compounds and various metabolite compounds in *Solanum betaceum* have substantial inhibitory effects on  $\beta$ -Secretase, NMDA and AChE which can be seen from the resulting  $\Delta G$  value (see table 1), so it is potentially used as a candidate drug of Alzheimer's disease.

It is important to learn that the anthocyanin compounds in the living organism will undergo changes after absorption, detoxification, metabolism and excretion. It produce various compounds

such as native anthocyanin and other forms, stratononidation anthocyanin, sulphated anthocyanins, methylated anthocyanins and so on. This underlies the influence on the target organ of the compounds. Central nervous system work as target has a special ability that is the compound able to penetrate the BBB. The mechanism of action of the *Solanum betaceum* bioactive compound as a candidate for Alzheimer's disease drugs is hypothesized through two paths: direct and indirect pathways.

Feasibility of compounds used as drug candidates need to have characteristics based on Lipinski's rule of five (mol\_MW <500, QPlogPo / w <5, donor HB  $\leq$  5, accept HB  $\leq$  10) to predict which candidate compounds can penetrate into the CNS (Meena et al. 2015). Based on the fourth rule of ligand, the Cyn-3-rut compound, Pgn-3-rut, and Dpn-3-rut have glycosyl groups in the form of rutinose, which makes the size of the compound larger.

**Table 5.** ADME parameters, Pharmacokinetic Properties, Drug Likeness, and Medicinal Chemistry Analysis

Parameter	Rutin	Kuesetin	Cyn-3-rut	Dpn-3-rut	Pgn-3-rut	Memantine	Denepezil
<b>Physicochemical Properties</b>							
Formula	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N	C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> N O <sub>3</sub>
Molecular weight (g/mol)	610,52	302,24	595.53	611.53	579.53	179.30	379.49
<b>Lipophilicity</b>							
Log P <sub>o/w</sub> (iLOGP)	2,43	1,63	-4.22	-2.33	-3.90	2.51	3.92
Log P <sub>o/w</sub> (XLOGP3)	-0,33	1,54	-1.51	-1.87	-2.32	3.28	4.28
Log P <sub>o/w</sub> (WLOGP)	-1,69	1,99	-0.77	-1.06	-0.47	2.69	3.83
Log P <sub>o/w</sub> (MLOGP)	-3,89	-0,56	-3.08	-3.55	-2.61	3.02	3.06
Log P <sub>o/w</sub> (SILICOS-IT)	-2,11	1,54	-3.43	-3.90	-2.96	2.76	4.91
Consensus Log P <sub>o/w</sub>	-1,12	1,23	-2.60	-2.54	-2.45	2.85	4.00
<b>Water Solubility</b>							
Log S (ESOL)	-3,30 (Soluble)	-3,16 (Soluble)	-2.47 (Soluble)	-2.33 (Soluble)	-1.86 (Very Soluble)	-3.02 (Soluble)	-4.81 (Moderate)
Log S (Ali)	-4,87 (Soluble)	-3,91 (Soluble)	-3.28 (Soluble)	-3.34 (Soluble)	-2.02 (Soluble)	-3.05 (Soluble)	-4.81 (Moderate)
Log S (SILICOS-IT)	-0,29	-3,24	0.28	0.88	-0.31	-2.80	-6.90

	(Soluble)	(Soluble)	(Soluble)	(Soluble)	(Soluble)	(Soluble)	(Poorly)
	e)	e)	e)	e)	e)	e)	
<b>Pharmacokinetics</b>							
GI Absorption	Low	High	Low	Low	Low	High	High
BBB permeant	No	No	No	No	No	Yes	Yes
P-gp Substrate	Yes	No	No	No	No	No	Yes
CYP1A2 inhibitor	No	Yes	No	No	No	No	No
CYP2C19 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No
CYP2C9 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No
CYP2D6 inhibitor	No	Yes	No	No	No	No	Yes
CYP3A4 inhibitor	No	Yes	No	No	No	No	Yes
Log $K_p$ (skin permeation)	-10,26 cm/s	-7,05 cm/s	-11,00 cm/s	-11,36 cm/s	-11,48 cm/s	-5,06 cm/s	-5,58 cm/s
<b>Druglikeness</b>							
Lipinski Rule	No; 1 <i>violatio</i> <i>n</i>	Yes; 0 <i>violatio</i> <i>n</i>	No; 3 <i>violatio</i> <i>n</i>	No; 3 <i>violatio</i> <i>n</i>	No; 3 <i>violatio</i> <i>n</i>	Yes; 0 <i>violatio</i> <i>n</i>	Yes; 0 <i>violatio</i> <i>n</i>
Bioavailability Score	0,17	0,55	0,17	0,17	0,17	0,55	0,55

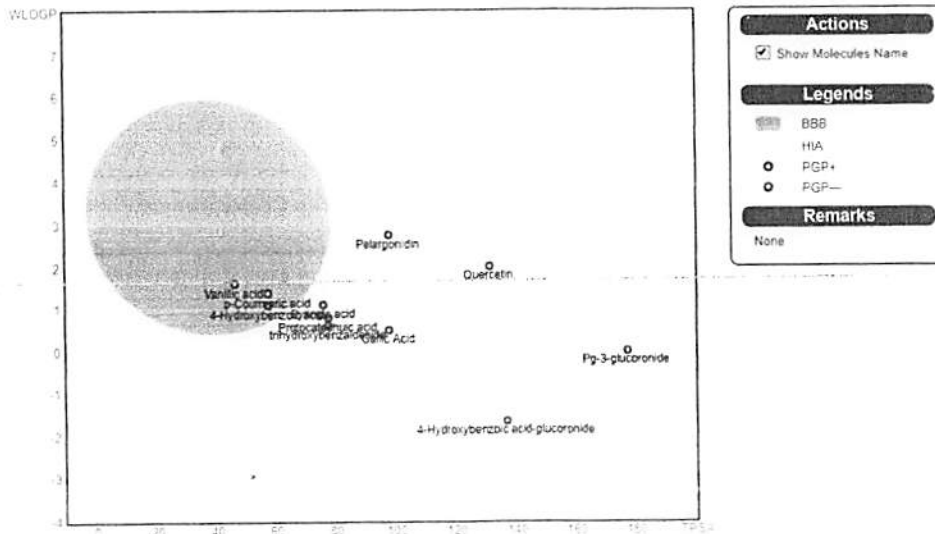


Figure 6. Permeability of anthocyanins and their derivatives by SwissADME

The indirect pathway through the peripheral vascular endothelium as well as the brain and the pathway directly cross the brain barrier (Blood Brain Barrier). [35] Indirect paths of flavonoid metabolite ability affect memory and cognition by activating eNOS and inhibiting NAPDH oxidase thereby increasing NO reserve. Nitric oxide plays a major role in the control of blood vessels, vasodilation and blood flow in the body. Control of both temporal and spatial blood flow and neuronal activity is a process called

cerebrovascular coupling, which is vital for brain integrity and cognition. Increased NO rapidly responds to neural activation through activation of NMDA receptors, glutamate signaling, arteriolar and small capillaries diffusion resulting in increased blood flow to the brain. This molecular mechanism involves Ca<sup>2+</sup> dependent, signaling cGMP or Akt / PKB, thus increasing the demands of oxygen and nutrients[35]. The direct path of the flavonoid metabolite may cross the brain barrier, activating the ERK-CREB, BDNF,

Akt / PKB, and mTROR-Arc pathways that will change the synaptic function, increase synaptic plasticity, further improve memory and cognition [35].

Another suggested mechanism is through the inhibitory effect on the major enzyme formation of amyloid beta plaque ( $A\beta$ ).  $A\beta$  plaque is an insoluble protein fragment which is the result of an imperfect cutting of a protein called amyloid precursor protein (APP).  $A\beta$  deposition in the brain is one of the implications of AD pathogenesis, an initiation of neuron dysfunction, neuro degeneration, and dementia. Research to inhibit  $A\beta$  plaque deposition is currently focused on inhibition of the beta secretase enzyme (BACE1), an enzyme that plays an important role in cutting the amino acid-forming APP. Currently treatment of Alzheimer's disease still use acetyl cholinesterase inhibitors. Acetyl cholinesterase inhibitors play a role in enhancing the acetylcholine neurotransmitter in order to improve memory and cognitive function. New research is continuing to find potential targets in inhibiting neuron dysfunction, neuro degeneration, and decreased memory and cognitive function in Alzheimer's disease. The discovery of new drugs through the exploration of natural compound active ingredients with multi target is expected to be an opportunity to produce potent drug candidates. (fig 9)

### Conclusion

The results of the flavonoid screening analysis showed that *Solanum betaceum* contains various kinds of bioactive compounds that have positive effects on health including flavonoids, tannins, and terpenoids. The results of TLC densitometry showed that flavonoid compounds were suspected to be routine. The results of the in silico molecular docking test predict that routine compounds and several other metabolites were effective as inhibitors

of the Acetylcholinesterase enzyme and are not effective in the mechanism of action of NMDA receptor inhibitors. In Silico research is an early step in the discovery of potential multi-target drugs and needs to be tested in vitro / in vivo and further clinical trials.

Molecular docking results show that native compounds and various metabolite compounds in *Solanum betaceum* have substantial inhibitory effects on  $\beta$ -Secretase, NMDA and AChE that they are potentially used as candidates for Alzheimer's disease drugs. The results of the evaluation of ADMET major compound on *Solanum betaceum* showed that the size of molecule caused small GI absorption, but after going through the process of degradation in the intestine and biotransformation, it then produced various kinds of active metabolite compounds. It have different physicochemical properties with native compounds; high value of GI absorption and it can penetrate the BBB. This is one of the requirements of drug candidates with targeted central nervous system. The predicted results of ADMET in silico also show that the native anthocyanin compound in *Solanum betaceum* does not interact with the derivative of CYP450 inhibitor, thus it is predicted to have very low toxicity. In Silico research is an early step in the discovery of potential multi-target drugs and needs to be tested in vitro / in vivo and further clinical trials.

### Acknowledgement

We would like to thank Dr. Setyanto Tri Wahyudi, S.Si., M.Si (Division of Biophysics, Department of Physics, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Institute Pertanian Bogor) and Dra. Azminah., M.Si (Faculty of Pharmacy, University of Surabaya) who has provided referral in the refinement of this research

**Author's Contributions**

Authors declare that we have no competing interests.

**Competing Interests**

Authors declare that we have no competing interests.

**References**

- [1] D. Olivares, V. Deshpande, Y. Shi, D. Lahiri, N. Greig, J. Rogers, X. Huang, N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine, *Curr. Alzheimer Res.* 9 (2014) 746–758. doi:10.2174/156720512801322564.
- [2] A.C. Herrera, M. Knapp, World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia, *Alzheimer's Disease International*, London, 2016.
- [3] S.H. Mokhtar, M.M. Bakhuraysah, D.S. Cram, S. Petratos, The Beta-Amyloid Protein of Alzheimer's Disease: Communication Breakdown by Modifying the Neuronal Cytoskeleton, *Int. J. Alzheimers. Dis.* 15 (2013).
- [4] M. Percoma, L. Berumen, K. Padilla, G. Alcocer, Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease, *Biomed Res. Int.* (2016).
- [5] M. Hashemi, A. Zali, Novel Treatments for Alzheimer's Disease, *Int. Clin. Neurosci. J.* 4 (2017) 39–45.
- [6] D. Ben-Sachar, D. Laifensfeld, Mitochondria, Synaptic Plasticity, And Schizophrenia, *Int. Rev. Neurobiol.* 59 (2004) 273–296.
- [7] A. Rajasekaran, G. Venkatasubramanian, M. Berk, M. Debnath, Neuroscience and Biobehavioral Reviews Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Pathways, mechanisms and implications, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 48 (2015) 10–21. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.11.005.
- [8] C. Osorio, N. Hurtado, C. Dawid, T. Hofmann, F.J. Heredia-mira, A. Lucia, Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits, *Food Chem.* 132 (2012) 1915–1921. doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.026.
- [9] A. Kumar, C. Murleedharan, Current and novel therapeutic molecules and targets in Alzheimer's disease, *J. Formos. Med. Assoc.* 115 (2016) 3–10. doi:10.1016/j.jfma.2015.04.001.
- [10] X. Tian, J. Wang, J. Zhu, Y. Fan, W. Meng, R. Fan, Q. Zhao, 1, 5- O -Dicaffeoyl-quinic Acid as a Novel Potential NMDA Receptor Inhibitor from Traditional Chinese Medicine Database by Virtual Screening, *Chinese Herb. Med.* 8 (2016) 366–370. doi:10.1016/S1674-6384(16)60064-3.
- [11] A. Krishnan, M. Keshewani, D. Velmurugan, Identification of new BACE1 inhibitors using Pharmacophore and Molecular dynamics simulations approach, *J. Mol. Graph. Model.* 76 (2017) 56–69. doi:10.1016/j.jmgm.2017.06.001.
- [12] R. Palakurti, R. Vadrevu, docking for identification of potential inhibitors of b -secretase, *Comput. Biol. Chem.* 68 (2017) 107–117. doi:10.1016/j.compbiolchem.2017.03.001.
- [13] H. Shimizu, A. Tosaki, K. Kaneko, T. Hisano, T. Sakurai, N. Nukina, Crystal Structure of an Active Form of BACE1, an Enzyme Responsible for Amyloid B-Protein Production, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 3663–3671. doi:10.1128/MCB.02185-07.
- [14] T. GU, W.-Y. Wu, Z.-X. Dong, S.-P. Yu, Y. Sun, Y. Zhong, Y.-T. Lu, N.-G. Li, Development and Structural Modification of BACE1 Inhibitors, *Molecules.* 22 (2017). doi:10.3390/molecules22010004.
- [15] M. Bajda, J. Jończyk, B. Malawska, S. Filipek, Application of Computational Methods for the Design of BACE-1 Inhibitors: Validation of in Silico Modelling, *Int. Journal Mol. Sci.* 15 (2014) 5128–5139. doi:10.3390/ijms15035128.
- [16] G. Kumar, R. Patnaik, Exploring neuroprotective potential of *Withania somnifera* phytochemicals by inhibition of GluN2B-containing NMDA receptors: An in silico study, *Med. Hypotheses.* 92 (2016) 35–43. doi:10.1016/j.mehy.2016.04.034.
- [17] L.T. Kane, B.M. Costa, Identification of novel allosteric modulator binding sites in NMDA receptors: A molecular modeling study, *J. Mol. Graph. Model.* 61 (2015) 204–213. doi:10.1016/j.jmgm.2015.06.007.
- [18] M. Hedegaard, K.B. Hansen, K.T. Andersen, H. Bräuner-osborne, S.F. Traynelis, Neurochemistry International Molecular pharmacology of human NMDA receptors, *Neurochem. Int.* 61 (2012) 601–609. doi:10.1016/j.neuint.2011.11.016.
- [19] K.K. Ogden, S.F. Traynelis, New advances in NMDA receptor pharmacology, *Trends Pharmacol. Sci.* 32 (2011) 726–733. doi:10.1016/j.tips.2011.08.003.
- [20] M.K. Mazumder, A. Borah, Piroxicam inhibits NMDA receptor-mediated excitotoxicity through allosteric inhibition of the GluN2B subunit: An in silico study elucidating a novel mechanism of action of the drug q, *Med. Hypotheses.* 83 (2014) 740–746. doi:10.1016/j.mehy.2014.09.031.
- [21] T.B. Silva, J. Carlos, S. Teixeira, T. Silva, J. Reis, J. Teixeira, F. Borges, Alzheimer &™ s disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes, *Ageing Res. Rev.* 15 (2014) 116–145. doi:10.1016/j.arr.2014.03.008.
- [22] P. Meena, V. Nemaish, M. Khatri, A. Manral, P. Mehta, M. Tiwari, Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of novel piperidine and piperazine derivatives as multi-targeted agents to treat Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 1135–1148. doi:10.1016/j.bmc.2014.12.057.
- [23] M. Bajda, A. Wieckowska, M. Hebda, N. Guzior, C. Sotriffer, B. Malawska, Structure-Based Search for New Inhibitors of



- Cholinesterases, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 5608–5632. doi:10.3390/ijms14035608.
- [24] M. Harel, J. Sussman, Acetylcholinesterase : From 3D Structure to Function, *Chem. Biol. Interact.* 187 (2010) 10–22. doi:10.1016/j.cbi.2010.01.042.
- [25] S. Wei, F. Abas, K. Wai, K. Shaari, N.H. Lajis, Bioorganic & Medicinal Chemistry 2-Benzoyl-6-benzylidenecyclohexanone analogs as potent dual inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 3742–3751. doi:10.1016/j.bmc.2016.06.016.
- [26] R. Dhanalakshmi, R. Manavalan, In Silico Docking Approach for Anti-Atherosclerotic Activity of Phytoconstituens of *Corchorus aestuans* and ADMET Prediction, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 8 (2015).
- [27] I. Fernandes, A. Faria, Bioavailability of anthocyanins and derivatives, *J. Funct. Foods.* 7 (2013) 54–66. doi:10.1016/j.jff.2013.05.010.
- [28] P.C.H. Hollman, Absorption , Bioavailability , and Metabolism of Flavonoids, *Pharm. Biol.* 42 (2004) 74–83.
- [29] A. Rafaela, C. Braga, D.C. Murador, L. Mendes, D.S. Mesquita, V.V. De Rosso, Bioavailability of anthocyanins: gaps in knowledge, challenges and future research, *J. Food Compos. Anal.* (2017). doi:10.1016/j.jfca.2017.07.031.
- [30] J. Fang, Bioavailability of Anthocyanins, *Drug Metab. Rev.* 4 (2014) 1097–9883. doi:10.3109/03602532.2014.978080.
- [31] Y. Chen, Q. Li, T. Zhao, Z. Zhang, G. Mao, W. Feng, X. Wu, L. Yang, Biotransformation and metabolism of three mulberry anthocyanin monomers by rat gut microflora, *Food Chem.* 237 (2017) 887–894. doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.054.
- [32] K. Kim, T. Nam, Y. Park, Y. Kim, S. Park, Neuroprotective Effect of Anthocyanin on Experimental Traumatic Spinal Cord Injury, *J. Korean Neurosurg. Soc.* 49 (2011) 205–211.
- [33] A. Faria, M. Meireles, I. Fernandes, C. Santos-buelga, C. Calhau, Flavonoid metabolites transport across a human BBB model, *Food Chem.* 149 (2014) 190–196. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.095.
- [34] J. Cheng, X. Liu, Z. Chen, Y. Zhang, Y. Zhang, Mulberry anthocyanin biotransformation by intestinal probiotics, *Food Chem.* 213 (2016) 721–727. doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.032.
- [35] Suhartati and Khaerunnisa, *Flavonoid*, Airlangga University Press, Surabaya. 2017

# EFFECTS OF SOLANUM BETACEUM ON MEMORY, N-METHYL-D-ASPARTATE, AND BRAIN DERIVED NEUROTHROPIC FACTOR IN RATS-ALZHEIMER'S DISEASE INDUCED

INDRI SAFITRI<sup>a</sup>, AGUS TURCHAN<sup>b</sup>, HANIK BADRIYAH HIDAYATI<sup>c</sup>,  
SUHARTATI<sup>d</sup>, SITI KHAERUNNISA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departement of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Indonesia

<sup>b</sup>Departement of Neurosurgeon, Universitas Airlangga –Dr. Soetomo Hospital, Indonesia

<sup>c</sup>Departement of Neurology, Universitas Airlangga –Dr. Soetomo Hospital, Indonesia

<sup>d</sup>Departement of Medical Biochemistry, Universitas Wijaya Kusuma, Indonesia

\*Email of the corresponding author: [indrisafitri@gmail.com](mailto:indrisafitri@gmail.com)

Telephone: +628123014624, Fax numbers: +62315022472

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was conducted to evaluate the neuroprotective role of *Solanum betaceum* against memory loss due to alzheimer's disease induced in rats.

### Methods:

Fifty adult male albino rats were divided into five groups AD-induced rats by aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) with dose 2g/L for a period of 21 days and in 22<sup>th</sup> day administered parallelly with *Solanum betaceum* in group K2,K3,K4 (100 mg/kg b.w/day; 200 mg/kg b.w/day ; 400 mg/kg b.w/day) respectively for 14 days. The level of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA), Brain Derived Neurothropic Factor (BDNF) and memory were also measured.

**Results:** *Solanum betaceum* administration could prevent from memory loss due to alzheimer's disease induced in rats significantly (p=0,037) by decreased time to reach the target at Morris water maze and maintained the levels of NMDA and BDNF significantly/not significantly (p=.....). The results indicated that extracts of *Solanum betaceum* showed significant increase in brain BDNF and significant decreases in brain NMDA and memory in AD-induced rats. Treatment with *Solanum betaceum* in a dose of 100 mg/kg b.w. was more powerful in protection from Alzheimer's disease as indicated by both biochemical and memory findings.

**Conclusion:** This study revealed that the treatment of AD-induced rats with *Solanum betaceum* extracts significantly improve memory function and level of BDNF and reduce level of NMDA the neurodegeneration characteristic of Alzheimer's diseases in rats. Noteworthy, *Solanum betaceum* extract showed more interest in improvement Alzheimer's disease in rats.

### Keywords

*Solanum betaceum*, Memory, NMDA, BDNF, AlCl<sub>3</sub>, Alzheimer

## INTRODUCTION

Populasi manusia kategori lanjut usia di seluruh dunia kini menghadapi epidemi penyakit Alzheimer (*Alzheimer Disease / AD*), dengan jumlah kasus diperkirakan naik

menjadi 106 juta hingga tahun 2050 (Yegambaram *et al.*, 2015). Penyakit Alzheimer adalah penyebab utama kematian di negara maju dengan risiko 70% disebabkan genetika. Sisanya 30 % dari risiko AD dihipotesiskan oleh faktor lingkungan dan pola gaya hidup manusia. (Yegambaram *et al.*, 2015) Indonesia belum memiliki data-data pasti tentang angka kejadian demensia akibat AD, tetapi mengacu pada angka kejadian di luar negeri. Diperkirakan jumlah usia lanjut di Indonesia berkisar 18,5 juta orang dengan angka insidensi dan prevalensi AD belum diketahui dengan pasti. Jumlah tersebut akan ada yang menderita demensia dan 55,6 persen diantaranya disebabkan oleh AD. Antara tahun 2000 dan 2010, proporsi kematian disebabkan AD meningkat 68%. (Kusumoputro dan Sidiarto, 2004)

Deposisi Amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) pada otak merupakan salah satu implikasi dari patogenesis AD (Klafki *et al.*, 2006). Plak  $\beta$ -amiloid menyebabkan neurodegenerasi melalui pembentukan senile plaque, fosforilasi protein Tau yang menyebabkan pembentukan *Neurofibrillary tangle* (NFT), disfungsi mitokondria, stres oksidatif, transport aksonal, dan kerusakan membran. (Modi *et al.*, 2012) Reseptor NMDA adalah kanal ion yang bergantung pada neurotransmitter glutamate dan voltasi  $Mg^{2+}$  sehingga dapat mengatur lalu lintas pergerakan kalsium ke dalam sel saraf (*dendritic spine*). Hal ini sangat penting pada proses *learning* dan *memory* pada otak. (Carlson, 2013)

*Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) memiliki efek neurotropik pada sistem saraf pusat (SSP) dan merupakan molekul kunci dalam pemeliharaan plastisitas sinaptik dan penyimpanan memori pada hipokampus. Perubahan level dan ekspresi BDNF ditemukan pada SSP dan serum darah pasien AD yang mengindikasikan bahwa BDNF berperan penting dalam patogenesis AD. (Song *et al.*, 2014)

Tahun 2015, biaya perawatan seseorang yang hidup dengan Alzheimer dan penyakit demensia lainnya diperkirakan menelan US \$226 milyar dan diperkirakan hingga tahun 2050 meningkat menjadi US\$1,1 trilyun (*Alzheimer's Association*, 2015). Tahun 2009 diperkirakan 12.5 miliar jam kerja produktif dihabiskan untuk perawatan individu dengan gangguan kognitif yang setara nilainya dengan US\$144 miliar (Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention U.S., 2011). Perawatan lansia Alzheimer dapat menimbulkan *caregiver burden* meliputi dampak fisik, dampak emosional, dampak sosial dan dampak ekonomi bila tidak dapat ditangani secara efektif. (Mace & Rabins, 2006).

Cara menghemat yang paling efektif adalah jika permulaan alzheimer dan demensia lainnya dapat ditanggihkan atau jumlah insidens dikurangi dengan cara-cara pencegahan yang timbul dari penelitian baru. (Poerwadi, 2013).

Terong Belanda (*Solanum betaceum*) yang juga dikenal nama Tamarillo merupakan tumbuhan dari keluarga *Solanaceae*. Mayoritas masyarakat kita tak banyak mengenal Terong Belanda. Beberapa studi melaporkan bahwa Terong Belanda dapat meningkatkan daya tahan tubuh, mencegah kanker, mencegah sembelit, menangkal radikal bebas, serta baik untuk kecerdasan otak. (Kumalaningsih, 2006). Komponen fitokimia yang telah dilaporkan dalam Terong Belanda adalah flavonoid golongan antosianin, flavonol, asam fenolat serta karotenoid. (Lister *et al.*, 2005 ; Kumalaningsih, 2006; Mertz *et al.*, 2009 ; Espin *et al.*, 2016). Flavonoid dilaporkan dapat meningkatkan memori dan fungsi kognisi melalui dua jalur, yaitu jalur langsung dan tidak langsung. (Suhartati dan Khaerunnisa, 2016)

Uji pendahuluan yang telah diperoleh tahun 1 adalah analisis skrining fitokimia dalam *Solanum betaceum* menunjukkan terdapatnya flavonoid, tannin, terpenoid, tannin galat, dengan total flavonoid sebesar 0,22% b/b. Hasil uji KLT densitometry menunjukkan ditemukan senyawa Rutin pada Rf 0.26 -0.29 and 0.25-0.28. Hasil uji *In Silico* menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang terdapat dalam *Solanum betaceum* terhadap aktivitas enzim kolinesterase dan  $\beta$ -Secretase serta reseptor NMDA, memiliki harga  $\Delta G$  dan  $K_i$  rendah yang menunjukkan prediksi kemampuan yang hampir sebanding dengan memantine dan

donepezile. Hasil ADME-toxicity menunjukkan bahwa senyawa potensial dalam *Solanum betaceum* tidak mempengaruhi aktivitas CYP450 dan memiliki solubilitas yang cukup tinggi sehingga diprediksi aman.

Penelitian ini dilakukan analisis pengaruh *herba Solanum betaceum* terhadap hewan coba yang dipapar Aluminium sebagai model hewa coba AD dengan output perbandingan kemampuan learning dan memory yang diukur melalui parameter *escape latency*, NMDA dan BDNF hipokampus.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and reagents

Level of NMDA and BDNF were obtained from mybiosource.com, California, Sandiego USA, with Cat No.MBS269995, Cat No. MBS261374 respectively. Aluminium chloride ( $AlCl_3$ ) with Cat No.8.01081.0500, MERCK, USA. All other chemicals and reagents were used of reagent grade and highest purity. *Solanum betaceum* was purchased from farmland in Wonosobo, Central Java, Indonesia, and identified from Indonesian Institute of Science.

### Experimental design

Stock solution of Aluminium Chloride used was 3 g/L (3 mg/mL). The animals (male albino rats, 3 month, 150-180g) were divided into five groups of 10 rats per cage (group). They were acclimatized to the laboratory conditions and maintained under 12 h light and dark cycles at room temperature. Group  $K_0$  (negative control), Group  $K_1$  :  $AlCl_3$  , Group  $K_2$  :  $AlCl_3$  and ethanol extract of *Solanum betaceum* 100 mg/BW [18], Group  $K_3$  :  $AlCl_3$  and ethanol extract of *Solanum betaceum* 200 mg/kgBW [18], Group  $K_4$  :  $AlCl_3$  and ethanol extract of *Solanum betaceum* 400 mg/kgBW [18]. Duration of  $AlCl_3$  administration was 21 days (day 1<sup>st</sup> until 21<sup>th</sup>), followed by administration of *Solanum betaceum* in day 22<sup>th</sup> until 36<sup>th</sup>. The experiments were carried out in accordance with the guidelines Ethical clearance provided by the Animal Care and Use Committee (ACUC), Faculty of Medicine, Airlangga University with certificate No.259/EC/KEPK/FKUA/2018.

### Preparation of *Solanum betaceum*'s ethanol extract

*Solanum betaceum* were dried by fresh dryer. Dry powder was extracted by maceration using ethanol solvent for 3 x 24 hours three times at room temperature, then separated between filtrate and residue. The ethanol extract was filtered and evaporated with a rotary vacuum evaporator to obtain a viscous extract. The ethanol extract of *Solanum betaceum* was added to the treatment diet in the form of a suspension using 1% CMC with a dose of 2ml / 200g b.w. *Solanum betaceum* extract was simultaneously administered to the treatment group before exposure to  $AlCl_3$  during the experiment.

### Consolidation training and memory test (Morris water maze)

The Morris Water Maze is a circular pool filled with water. Rats were trained to use extra-maze visual cues to locate an escape platform hidden just below the surface of the opaque water (Morris, 1984). Most protocols used four start locations: N, S, E and W. Animals were given a series of daily trials using a random or semi-random set of start locations. Semi-random start position sets were most common, such that the four positions were used, with the restriction that one trial each day was from each of the four positions. A few investigators used eight start locations.<sup>30</sup> The memory test was performed on the last day and removing all of the symbol marks used. The frequency of reaching targets and settling time in the area was calculated based on the recording. The memory test was expressed in seconds as the time required for Rat to reach the target. Rat with less time indicate that it has a good memory.

**Laboratory Examination**

**Determining level of NMDA and BDNF**

The fixed hippocampus of the left or right hemisphere were analyzed using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. The fixed hippocampus was homogenized using a sonicator with added buffer lysis then centrifuged at 15000 x g for 15 min at 4 °C and the supernatant was used for the analysis. Samples were stored at -20 ° C. The level of NMDA, and BDNF in the hippocampus to determine using ELISA test.

**Statistical analysis**

The statistical analysis was performed by one-way ANOVA and Kruskal Wallis test. The statistical significance between the experimental groups was assessed by Least Significant Difference (LSD) and *Mann Whitney U* test with  $p < 0.05$ . Data analysis was used SPSS ver.23.

**RESULT AND DISCUSSION**

The level of NMDA and BDNF in hippocampus and memory of control and experimental animals are summarized in Table 1. A significant decrease ( $p < 0.05$ ) in level of ..... and increase time ( $p < 0.05$ ) in memory test was observed in Group K1 rats  $AlCl_3$  exposed compared to Group K0 rats. *Solanum betaceum* per administered Group K2,K3,K4 rats showed a significant ( $p < 0.05$ ) increase in their level of ..... and decrease time in memory test compared to Group K1 rats which shows the protective effect of memory loss by *Solanum betaceum*.

**Table 1: Mean and standart deviation of CREB, BDNF, Oligodendrocytes and memory of rats control and experiment group.**

Variable	Group <sup>#</sup>					SI	Anova
	K0	K1	K2	K3	K4		
NMDA	.....±..... <sup>a</sup>	.....±..... <sup>a</sup>	.....±..... <sup>a</sup>	.....±..... <sup>a</sup>	.....±..... <sup>a</sup>	ng/ml	.....
BDNF	.....±..... <sup>a</sup>	.....±..... <sup>a</sup>	.....±..... <sup>a</sup>	.....±..... <sup>a</sup>	.....±..... <sup>a</sup>	ng/ml	.....

\* = Significantly with  $p < 0,05$

# = Mean±SD

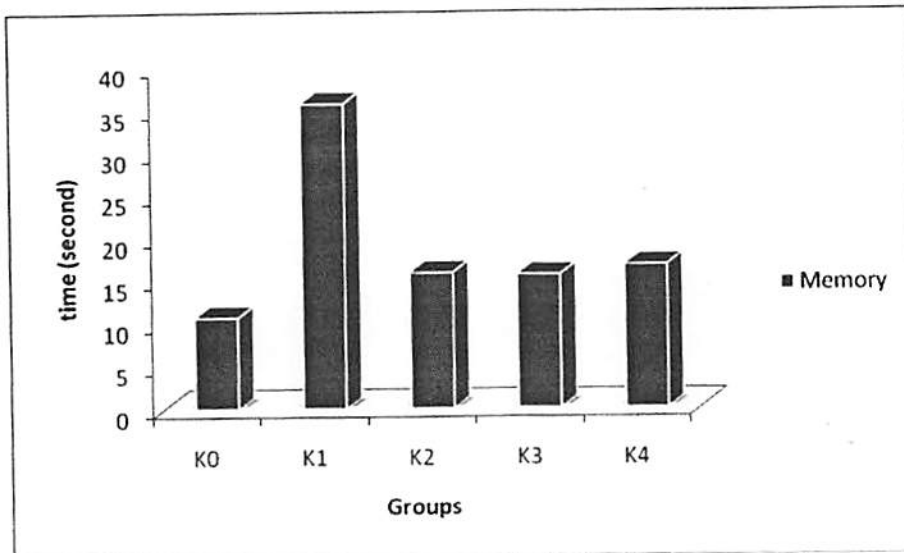
<sup>a,b,c,d</sup> = different superscript means significant between groups

**Table 2: Mean and median of NMDA, Neuron, Microglia and Astrocytes of rats control and experiment group.**

Variable	Categori	Group					SI	Kruskal Wallis
		K0	K1	K2	K3	K4		
Memori	Mean	10,71 <sup>a</sup>	35,71 <sup>b</sup>	15,85 <sup>a</sup>	15,57 <sup>a</sup>	16,71 <sup>a</sup>	second	0,038*
	median	11	27	13	8	16		
	minimum	3	20	4	3	3		
	maximum	21	83	50	33	51		

\*=Significantly with  $p < 0,05$

<sup>a,b,c,d</sup> = different superscript means significant between groups



**Fig 1. Histogram of Memory, NMDA and BDNF between Groups**

## CONCLUSION

The results indicated that extracts of *Solanum betaceum* showed significant/non significant increase in brain BDNF and significant decreases in brain NMDA and memory in AD-induced rats. Treatment with *Solanum betaceum* in a dose of ..... mg/kg b.w. was more powerful in protection from Alzheimer's disease as indicated by both biochemical and memory findings. This study revealed that the treatment of AD-induced rats with *Solanum betaceum* extracts significantly improve memory function and level of BDNF and reduce level of NMDA the neurodegeneration characteristic of Alzheimer's diseases in rats. However, further studies pertaining to the another parameter involve of action of alzheimer's disease induced in rats are warranted.

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that we have no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by Universitas Airlangga, Surabaya, East Java, Indonesia and Ministry of Research, Technology and Higher Education, Republic of Indonesia.

## REFERENCES

- Albrekkan FM, Worden MK, 2013, 'Mitochondrial dysfunction and alzheimer's disease', *Journal of Endocrine and Metabolic Diseases*, 3; 14-19.
- Ballinger, SW, Patterson, C, Yan, CN, Doan, R & Burow, DL, Young, CG, Yakes, FM, Van Houten, B, Ballinger, CA, Freeman, BA, Runge, MS 2000, 'Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells', *Circulation Research*, 86(9):960-966.
- Barrick and Clark, 2011, *The nervous system*, in Sherwood, L, *Human Physiology; From cell to system*, ninth edition, USA: Chengage learning, pp 157-163.

- Butterfield DA, Swomley AM, and Sultana R, 2013, 'Amyloid b-Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression', *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(8): 823-835.
- Eckert A, Schmitt K and Gotz J, 2011, 'Mitochondrial dysfunction - the beginning of the end in Alzheimer's disease? Separate and synergistic modes of tau and amyloid- $\beta$  toxicity', *BioMed Central*, 3(15) ; 1-11.
- Espin, S, Manzano, SG, Taco, V, Poveda, C, Durán, BA, Paramas, AMG, Buelga, CS, 2016, 'Phenolic composition and antioxidant capacity of yellow and purple-red Ecuadorian cultivars of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.)', *Food Chemistry*, 194: 1073–1080.
- Gayton and Hall, 2011, *Textbook of medical physiology, twelfth edition*, Philadelphia: Saunders, pp.704-718.
- Iskandar Japardi, 2002, Penyakit Alzheimer, Usu Digital Library, Page 1-11.
- Janicka M, Wasik AK, Kot J, and Namieśnik J, 2010, 'Isoprostanes-Biomarkers of Lipid Peroxidation: Their Utility in Evaluating Oxidative Stress and Analysis', *Int. J. Mol. Sci*, 11: 4631-4659
- Jayadev S, Steinbart EJ, Chi YY, Kukull WA, Schellenberg GD, Bird TD, 2008, 'Conjugal alzheimer disease: risk in children when both parents have alzheimer disease'. *Arch Neurol*, 65(3): 373-378.
- Kandel, ER, Schwartz, JH, Jessl, TM, Siegelbaum, SA, Hudspeth, AJ, 2013, *Principle of neural science, fifth edition*, USA: McGraw-Hill, pp.1447-1483.
- Klafki HW, Staufenbiel M, Kornhuber J, Wiltfang J, 2006, 'Therapeutic approaches to alzheimer's disease', *Brain*, 129: 2840-2855.
- Kusumoputro S, Sidiarto LD, 2004, *Mengenal awal pikun Alzheimer*, Jakarta : UI-Press, 1-15
- Madeo J and Elsayad C, 2013, 'The role of oxidative stress in alzheimer 's disease', *J Alzheimers Dis Parkinson*, 3(2) ;1-5
- Mertz, C, Gancel, AL, Gunata, Z, Alter, P, Mayer, CD, Vaillant , F, Perez, AM, Ruales, J, Brat, P, 2009, 'Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits', *Journal of Food Composition and Analysis*, 22 : 381–387.
- Modi H, Patel V, Patel K, Shrimanker M and Bhadani S, 2012, 'A review on PPAR $\gamma$ - a novel therapeutic target for alzheimer's disease', *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(3): 1397-1405.
- Nallakurumban, P, Suja. N, Vijayakumar, A, Geetha, Karpagapandi, L, 2015, 'Estimation of Phytochemicals and Antioxidant Property of Tamarillo (*Solanum betaceum*) and A Value Added Product Tamarillo Sauce', *IJSPR*, 9(2): 61-65.

Richardsz SS, Sweet RA. Dementia. In: Sadock BJ, Sadock VA, Ruiz P. *Comprehensive text book of psychiatry volume 1*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2009; 1176-1185.

Sharma, VK, 2009, 'Morris water maze: a versatile cognitive tool', *J Biosci Tech*, vol. 1, pp. 15-19.

Song JH, Yu, JT, Tan L, 2014, ' Brain-derived neurotrophic factor in alzheimer's disease: risk, mechanism and therapy', *Mol Neurobiol*.

Suh YH, Checler F, 2002, 'Amyloid precursor protein, presenilins, and  $\alpha$ -synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological application in alzheimer disease', *Pharmacol Rev*. 54: 469-525.

Suhartati dan Khaerunnisa S, 2013, *Metabolisme Karbohidrat dan Siklus Asam Sitrat*, Surabaya : AUP

Yegambaram M, Manivannan, B, Beach, TG, Halden, RU, 2015, 'Role of environmental contaminant in the etiology of alzheimer's disease: a review', *Current Alzheimer's Research*, 12, 116-146.