

Aktivitas Penghambat Asetilkolinesterase Ekstrak Etanol 96% Daun *Syzygium cumini*, *Syzygium aromaticum*, *Syzygium polyanthum* Dan *Syzygium aquaeum*.

Dody Anggah Saputra, Abdul Rahman, Idha Kusumawati

¹Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas AirlanggaJl.Dharmawangsa Dalam, Surabaya 60286 Indonesia *E-mail: ldhakusumawati.unair@gmail.com**Abstract**

Inhibition of acetylcholinesterase (AChE), the key enzyme in the breakdown of acetylcholine, is considered as a promising strategy for the treatment of neurological disorders such as Alzheimer's disease, senile dementia, ataxia and myasthenia gravis. A thin-layer chromatography (TLC) autography was used to screen for finding better AChE inhibitors from natural resources. Using this methods this research showed that each of ethanol extracts of Syzygium cumini leaves, Syzygium aromaticum leaves, Syzygium polyanthum leaves, Syzygium aquaeum leaves had an acetylcholinesterase inhibitors activity.

Keyword: *Syzygium cumini, Syzygium aromaticum, Syzygium polyanthum, Syzygium aquaeum, Acetylcholinesterase inhibitors, TLC-autography assay.*

PENDAHULUAN

Penyakit Alzheimer (PA) adalah demensia progresif yang mempengaruhi kesadaran, kelakuan dan status fungsional (Dipiro *et al.*, 2008). PA dicirikan dengan gangguan memori dan fungsi kognitif yang progresif serta dapat menyebabkan keadaan vegetatif total dan kemudian kematian (Katzung, 2007).

PA merupakan penyebab kematian keempat pada orang tua di Amerika Serikat setelah penyakit jantung, kanker, dan stroke (Al Rasyid dan Dahlan., 2000). Diperkirakan jumlah pasien PA di Amerika Serikat sekitar 4,5 juta jiwa dan 17 – 25 juta jiwa di seluruh dunia. 5% dari orang-orang usia di atas 65 tahun adalah pasien PA, kemudian naik menjadi 20% dari mereka berusia lebih dari 80 tahun (Camps *et al.*, 2000).

Gejala umum PA adalah berkurangnya neurotransmisi kolinergik pada otak. Kekurangan ini disebabkan oleh berkurangnya aktifitas cholin transferase (enzim pembentuk asetilkolin) atau peningkatan aktifitas asetilkolinesterase, sehingga terjadi penurunan tingkat asetilkolin. Oleh karena itu, dominasi strategi yang digunakan dalam perawatan pasien penderita PA ditujukan pada potensiasi dari asetilkolin di otak dengan menurunkan tingkat degradasi. Hal ini dicapai dengan pemberian penghambat ampuh asetilkolinesterase (Liesener *et al.*, 2007).

Pada beberapa obat sintesis penghambat asetilkolinesterase seperti fisostigmin donepezil atau takrin, diketahui masih memiliki efek samping seperti hepatotoksitas dan gangguan pada saluran pencernaan (Jung and Park, 2007).

Senyawa golongan alkaloid, terpenoid, flavonoid dan derivat shikimat dari tanaman telah terbukti mempunyai potensi sebagai inhibitor asetilkolinesterase (Houghton *et al.*, 2006). Lalu berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada senyawa golongan flavonoid dalam tanaman *Agrimonia pilosa*, diketahui bahwa flavonoid quercetin dan flavonoid glikosida quercitrin dapat menghambat aktivitas asetilkolinesterase secara spektrofotometri, dengan nilai IC₅₀ sebesar 19,8 µM dan 66,9 µM (Jung and Park, 2007).

Di Indonesia, tanaman dari genus *Syzygium* memiliki potensi yang bagus, baik dilihat dari penyebaran populasinya maupun dari aktivitas biologisnya. Banyak tanaman dari genus *Syzygium* yang telah digunakan dalam pengobatan tradisional (Lima *et al.*, 2007).

Pada penelitian sebelumnya, telah dilaporkan daun juwet (*Syzygium cumini*), daun salam (*Syzygium*

polyanthum), daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*), dan daun jambu air (*Syzygium aquaeum*) mengandung myricitrin yang merupakan glikosida flavonoid golongan flavonol (Kusumawati *et al.*, 2008). Quercitrin dan myricitrin mempunyai persamaan yaitu merupakan golongan flavonol glikosida dengan posisi serta jenis gugus gula yang sama. Dengan adanya persamaan ini dimungkinkan keempat bahan uji juga mempunyai aktivitas sebagai inhibitor asetilkolinesterase.

Uji invitro penghambat asetilkolinesterase salah satunya adalah secara spektrofotometri dengan metode Ellman. Dengan metode ini dapat diperoleh IC₅₀ (*inhibitory concentration 50%*) atau besar konsentrasi yang mampu menghambat aktivitas asetilkolinesterase sebesar 50%. Ekstrak dinilai aktif apabila memiliki nilai IC₅₀ pada konsentrasi dibawah 1000 mg/L (Nino *et al.*, 2006).

KLT-autografi digunakan untuk mengetahui profil kandungan yang memiliki aktifitas inhibitor asetilkolinesterase. KLT -autografi dapat digunakan dengan metode *Fast Blue B reagent* menggunakan naftil asetat dan Fast Blue B Salt. Hambatan terhadap asetilkolinesterase ditampakkan pada lempeng KLT dengan noda berwarna putih dengan latar belakang berwarna ungu (Lopes *et al.*, 2008). Kemudian dapat dilakukan identifikasi senyawa yang diduga mempunyai aktifitas inhibitor asetilkolinesterase. Penampak noda yang digunakan adalah penampak noda flavonoid, alkaloid, dan steroid/triterpenoid. Dengan pertimbangan pada penelitian yang telah dilaporkan, senyawa yang terbukti mempunyai potensi sebagai inhibitor asetilkolinesterase adalah golongan alkaloid, terpenoid, dan flavonoid (Houghton *et al.*, 2006). Senyawa yang diduga mempunyai aktivitas inhibitor asetilkolinesterase adalah golongan senyawa dari penampak noda yang dapat menghasilkan noda dengan nilai R_f yang sama dengan noda pada KLT-autografi.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian. Electric eel acetylcholinesterase tipe VI-S, Sigma C 3389-2KU, Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Sigma T-4661, 1-Naphtyl asetat, Merck 1.12154.0010, Fast Blue B salt, Merck K21873791 216, 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), Sigma D8130-56, acethyl iodide, Fluka Analytical 01480, myricitrin (Sigma-Aldrich), myricetin (Sigma-Aldrich), etanol pa. (Merck), kloroform p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), Standar

Sinensetin (Sigma), Lempeng KLT silica gel F₂₅₄ (Merck)

Sampel Penelitian. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun juwet (*Syzygium cumini*), daun salam (*Syzygium polyanthum*), daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*), dan daun jambu air (*Syzygium aqueum*) yang dipanen pada bulan Desember 2009 dari Kebun raya Purwodadi.

Penyiapan ekstrak etanol. Masing-masing serbuk simplisia daun kering sebanyak 250 g diekstraksi dengan menggunakan total pelarut etanol sebanyak 2,5 liter (900 mL, 800 mL, 800 mL) masing-masing diultrasonik selama 3 x 10 menit. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator dan disimpan dalam desikator rendemen dan kadar air dalam ekstrak ditampilkan dalam tabel 1.

Penyiapan larutan control. Kontrol negatif : 0,05 M buffer tris pH 7,8, Kontrol positif : donepezil (Aricept®) (0,08 µM)

Penyiapan larutan sampel uji. Ekstrak sampel 10,0 mg dilarutkan dalam dengan etanol dalam labu ukur 10 ml untuk mendapatkan larutan 1000 ppm. Kemudian dibuat pengenceran larutan uji menjadi 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm dan 100 ppm

Uji aktivitas inhibitor asetilkolinesterase secara spektrofotometri dengan metode Ellman. (Nino *et al.*, 2006).

Larutan asetilkolinesterase (0,3 U/ml) sebanyak 200 µl ditambah dengan 200 µl masing – masing larutan sampel 1000 ppm dan 0,05 M buffer tris pH 7,8 sebanyak 200 µl. Lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 30°C. Setelah itu ditambahkan 200 µl larutan asetiltiokolin iodida 15 mM dan 1000 µl larutan DTNB 3 mM pada campuran larutan awal. Penentuan panjang gelombang terpilih dengan mencari panjang gelombang maksimal yang terbanyak muncul dari kontrol negatif selama 14 menit dengan interval pengukuran setiap 1 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang terpilih selama 5 menit dengan interval pengukuran setiap 30 detik (replikasi tiga kali). Aktivitas inhibitor asetilkolinesterase (IC₅₀) dihitung berdasarkan analisis regresi linear antara % hambatan asetilkolinesterase dan konsentrasi sampel.

$$\% \text{ IA} = \left(\frac{\text{rerata } \Delta \text{AK}(-) - \text{rerata } \Delta \text{Asampel}}{\text{rerata } \Delta \text{AK}(-)} \right) \times 100\%$$

28

Kondisi kromatografi untuk KLT-autografi. Plate yang digunakan adalah Plate silica gel 60F254 (E. Merck, Darmstadt, Germany). Samples ditotolkan 30 ul 1000 ppm. Fase gerak CHCl₃:etil asetat : asam formiat = 3 : 3 : 0,5(v/v/v). Penampak noda Asetilkolinesterase dan Fast Blue B Reagent

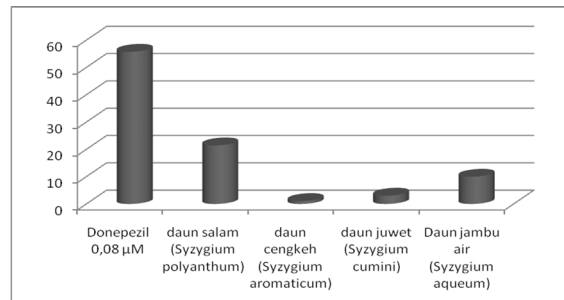
HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen dan kadar air dalam ekstrak yang dihasilkan dapat dilihat pada tabel 1. Pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa kadar air masih memenuhi batas yaitu di bawah 10%.

Tabel 1. Rendemen dan kadar air ekstrak

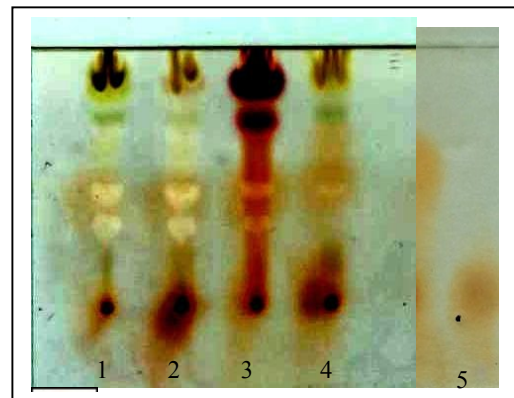
Simplisia	Rendemen (%)	Kadar air (%)
Daun juwet	10,2	4,2
Daun cengkeh	16,36	5,1
Daun salam	9,24	3,9
Daun jambu air	22,64	8,7

Berdasarkan hasil uji inhibitor asetilkolinesterase secara spektrofotometri dengan metode Ellman, diperoleh % IA dari keempat bahan uji kurang dari 50% dapat dilihat pada gambar 1. Dari hasil tersebut diperkirakan nilai IC₅₀ dari keempat bahan uji tersebut bernilai lebih dari 1000 ppm. Ekstrak dinilai aktif apabila memiliki nilai IC₅₀ pada konsentrasi dibawah 1000 mg/L. Dengan demikian keempat sampel dinilai tidak aktif. (Nino *et al.*, 2006).

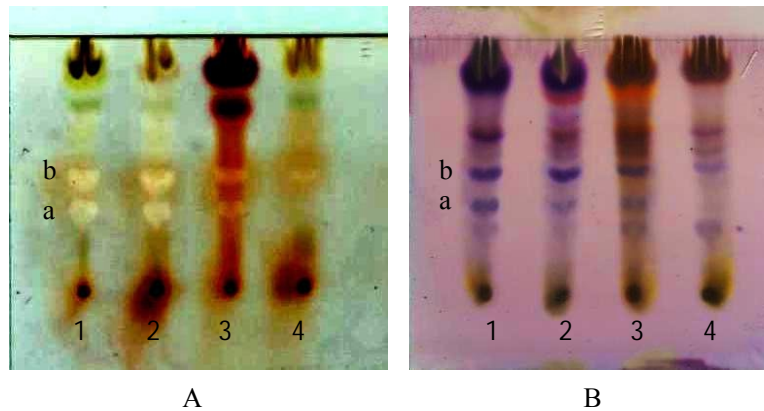


Gambar 1. Aktifitas hambatan Asetilkolinesterase dari keempat sampel uji (1000 ppm)

Selanjutnya hasil uji KLT-autografi menunjukkan hasil sebagai berikut:



Gambar 2. Lempeng KLT dari ekstrak etanol 96 % (1) daun juwet, (2) daun cengkeh, (3) daun salam, (4) daun jambu air, (5) myricetin dan (6) donepenezil, setelah disemprot Asetilkolinesterase dan Fast Blue B Reagent dengan fase gerak = CHCl₃ : etil asetat : asam formiat = 3 : 3 : 0,5.



Gambar 3. Lempeng KLT dari ekstrak etanol 96 % (1) daun juwet, (2) daun cengkeh, (3) daun salam, (4) daun jambu air setelah disemprot Asetilkolinesterase dan Fast Blue B Reagent (A) Anisaldehyde-asam sulfat (B)

Setelah dilakukan identifikasi noda, noda putih dari KLT Bioautografi mempunyai Rf yang sama dengan noda ungu hasil penampak noda steroid/terpenoid. Maka disimpulkan senyawa aktif yang diduga adalah golongan terpenoid/steroid.

Selanjutnya dilakukan uji terhadap myricitrin dan myricetin secara spektrofotometri maupun KLT-autografi, untuk mengetahui aktivitas inhibitor asetilkolinesterase senyawa tunggal yang di duga aktif sebagai inhibitor asetilkolinesterase secara in vitro itu sendiri. Pada spektrofotometri, myricitrin dinilai tidak aktif sedangkan myricetin dinilai aktif dengan nilai IC_{50} sebesar 31.533 ppm. Begitu juga pada uji KLT Bioautografi, myricitrin tidak menunjukkan dan myricetin dapat menunjukkan hambatan hambatan pada asetilkolinesterase. Dari hasil ini dapat diduga bentuk aglikon dinilai lebih aktif sebagai inhibitor asetilkolinesterase dalam uji in vitro.

PUSTAKA

- Al Rasyid dan Dahlan P, 2000, *Penyakit Alzheimer : Prevalensi dan Insidensi*, Bagian ilmu Penyakit Saraf Fakultas Kedokteran UGM SMF Penyakit Saraf RSUP Dr. Saidjito,
- Camps P, El-Achab R, Morral J, Torrero DM, Badia A, Banos JE, Vivas NM, Barril X, Orozco M, Luque FJ, 2000, New tacrine-huperzine A hybrids (huperines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease, *J Med Chem* 43: 4657-4666.
- Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM, 2008. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*, The McGraw-Hill Companies, United States of America.
- Houghton PJ, Rena Y, and Howes MJ, 2006. Acetylcholinesterase Inhibitors From Plants and Fungi, *www.rsc.org/npr*, diakses tanggal 24 Desember 2009.
- Jung M, and Park M, 2007, Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*, *Molecules* 12, 2130-2139
- Katzung BG, 2007. *Basic & Clinical Pharmacology*, 10th Ed., McGraw-Hill Medical
- Kusumawati I, Rahman A, Dyatmiko W, 2008, tlc densitometric profile and hipoglicemic effect of the leaves extract of four species belong to Syzygium genus, *17th symposium on the development and application of naturally occurring drug material*.
- Liesener A, Perchuc A, Schoni R, Schebb NH, Wilmer M, Karst U, 2007. Screening of acetylcholinesterase inhibitors in snake venom by electrospray mass spectrometry, *Pure and Applied Chemistry*.
- Lima LA, Siani AC, Brito FA, Sampaio ALF, Henriques MdGMO, Riehl CAdS, 2007. Correlation Of Anti-Inflammatory Activity With Phenolic Content In The Leaves Of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae), *Quim. Nova*, No. 4, Vol. 30, p. 860-864, Brazil: Cidade Universitária.
- Lopes EMC, Carreira RC, Agripino DG, Torres LMB, Cordeiro I, Bolzani VS, Machado SCD, Young MCM, 2008. Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest - Ilha do Cardoso State Park, *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18 (Supl.): 655 – 660.
- Niño J, Hernández JA, Correa YM, Mosquera OM, 2006. In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. *Mem Inst Oswaldo Cruz Vol. 101*, (7): 783-785, Rio de Janeiro.