

ABSTRAK

AKTIVITAS INHIBISI ASETILKOLINESTERASE BEBERAPA JENIS SAYURAN SERTA ISOLASI SENYAWA AKTIFNYA PADA TUMBUHAN TERPILIH

Oleh

Maulita Cut Nuria

NIM: 30715010

(Program Studi Doktor Farmasi)

Kepikunan merupakan masalah kesehatan global yang membutuhkan penanganan serius. Data statistik tahun 2015 memperkirakan sekitar 46,8 juta orang di seluruh dunia mengalami kepikunan. Umumnya penderita kepikunan adalah dari kelompok manusia lanjut usia (lansia). Kementerian Kesehatan Indonesia memperkirakan jumlah lansia sekitar 27,08 juta pada tahun 2020. Alzheimer adalah penyakit yang salah satu gejalanya adalah kepikunan, yang terjadi akibat penurunan neurotransmitter asetilkolin. Penyebab utama penyakit alzheimer belum diketahui secara pasti. Penyakit ini seringkali dikaitkan dengan beberapa faktor diantaranya genetik, infeksi virus, hingga pola makan yang tidak sesuai. Salah satu upaya untuk meningkatkan daya ingat adalah meningkatkan asetilkolin dengan cara menghambat enzim asetilkolinesterase (AChE). Senyawa penghambat AChE dapat diperoleh dari tumbuhan dan kebiasaan mengkonsumsi sayuran setiap hari dapat menurunkan resiko kepikunan.

Tujuan penelitian ini adalah menentukan aktivitas inhibisi AChE 18 jenis tumbuhan yang biasa dikonsumsi oleh masyarakat suku Sunda dan suku Jawa. Berbagai hasil riset menunjukkan bahwa senyawa-senyawa dari alam seperti senyawa golongan alkaloid, fenolik dan flavonoid memiliki potensi untuk menanggulangi penyakit neurodegeneratif. Penelitian ini dilakukan skrining fitokimia ekstrak secara kualitatif dan penetapan kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak secara kuantitatif. Fraksi potensial dari tumbuhan terpilih diteliti lebih lanjut kandungan kimianya. Struktur senyawa yang diisolasi dari fraksi potensial ditentukan dan nilai IC_{50} isolat terhadap AChE dihitung.

Pengujian aktivitas inhibisi ekstrak, fraksi dan isolat terhadap AChE dilakukan secara *in vitro* dengan metode Ellman. Skrining fitokimia ekstrak dilakukan terhadap senyawa golongan triterpenoid/steroid, alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin dan tanin. Pengukuran kadar fenolik total dilakukan dengan metode Folin Ciocalteu, sedangkan kadar flavonoid total menggunakan pereaksi aluminium klorida. Isolasi senyawa meliputi tahap ekstraksi, fraksinasi, pemisahan, pemurnian dan karakterisasi. Ekstraksi dilakukan secara maserasi menggunakan etanol 95%. Penetapan ekstrak potensial dilakukan dengan cara menentukan jenis-jenis ekstrak yang memiliki nilai IC_{50} kurang dari 1000 $\mu\text{g/mL}$. Proses fraksinasi terhadap

ekstrak potensial dilakukan secara partisi cair-cair menggunakan pelarut dengan kepolaran bertingkat, yaitu pelarut *n*-heksan, etil asetat, metanol, metanol 70% dan air. Penetapan fraksi potensial dilakukan dengan cara memilih fraksi yang memiliki nilai IC_{50} paling kecil dan rendemen yang relatif besar. Pemisahan dan pemurnian senyawa pada fraksi potensial dilakukan secara Kromatografi Cair Vakum (KCV), dilanjutkan pemisahan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) preparatif dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) preparatif fase terbalik. Karakterisasi isolat dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis, spektrometri massa dan spektrometri NMR. Elusidasi struktur didasarkan pada data-data yang berasal dari hasil karakterisasi.

Hasil penelitian menunjukkan ada 12 jenis tumbuhan yang memiliki aktivitas inhibisi AChE sedangkan 6 jenis tumbuhan tidak mempunyai aktivitas ketika diuji pada rentang konsentrasi yang digunakan. Aktivitas ini belum pernah dilaporkan sebelumnya. Ekstrak tumbuhan yang memiliki nilai $IC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ (ekstrak potensial) yaitu ekstrak herba kenikir, daun singkong, daun kemangi dan polong kecipir. Skrining fitokimia menunjukkan bahwa seluruh ekstrak mengandung senyawa golongan fenolik dan flavonoid. Kadar fenolik dan flavonoid total dari keempat ekstrak potensial juga relatif lebih besar dibandingkan ekstrak lainnya. Fraksi potensial tumbuhan yang diteliti lebih lanjut adalah fraksi larut metanol daun singkong (FLMS). Hasil isolasi dari fraksi potensial diperoleh dua senyawa flavonoid glikosida yang telah ditetapkan strukturnya yaitu kaempferol-3-*O*-rutinosida (nikotiflorin) dan kuersetin-3-*O*-rutinosida (rutin). Kedua senyawa tersebut memiliki aktivitas inhibisi AChE dengan nilai IC_{50} nikotiflorin sebesar $310,2 \pm 7,1 \mu\text{g/mL}$ sedangkan IC_{50} rutin belum dapat ditentukan sampai dengan konsentrasi uji tertinggi ($500 \mu\text{g/mL}$).

Penelitian ini memberikan informasi ilmiah bahwa ekstrak etanol herba kenikir, daun singkong, daun kemangi dan polong kecipir sebagai penghambat enzim AChE. Keempat ekstrak tersebut memiliki kadar fenolik dan flavonoid total yang relatif besar, sehingga kemungkinan hal tersebut berkorelasi dengan aktivitas inhibisi AChE. Kandungan senyawa aktif seperti flavonoid merupakan sumber bahan baku obat yang berasal dari alam dan dapat digunakan sebagai inhibitor AChE.

Kata kunci: Asetilkolinesterase, sayuran, ekstrak potensial, fraksi potensial, fenolik, flavonoid

ABSTRACT

ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY OF SOME VEGETABLES AND ISOLATION OF THE ACTIVE CONSTITUENTS FROM SELECTED PLANT

By

Maulita Cut Nuria

NIM: 30715010

(Doctoral Program in Pharmacy)

Dementia is a global health problem that requires serious treatment. Statistical data in 2015 estimated about 46.8 million people in the world were living with dementia. Generally, dementia affects elderly population. The Indonesian Ministry of Health estimates the number of elderly to be around 27.08 million in 2020. Alzheimer's disease is a disease that is characterized by dementia, which is associated with decreased of neurotransmitter acetylcholine. The main cause of Alzheimer's disease is not known certainly. The disease is associated with several factors including genetic, viral infections, and inadequate diet. One of the means to improve memory is to increase acetylcholine by inhibiting the acetylcholinesterase enzyme (AChE). Inhibitor AChE compounds can be obtained from plants and people who consume vegetables every day can reduce the risk of dementia.

The purpose of this study was to investigate the AChE inhibitory activity of 18 vegetables that are widely used by Indonesian Sundanese and Javanese ethnics groups. Many research studies showed that compounds originating from nature such as alkaloid, phenolic and flavonoid compounds could be used to treat neurodegenerative diseases. In this study, qualitative phytochemical screening of extracts and quantitative determination of total phenolic and flavonoid content of the extract were conducted. Potential fraction of the selected plant was further investigated for the chemical ingredient. The structure of compounds isolated from potential fraction were determined and the IC_{50} of AChE inhibition were calculated.

The inhibitory activity of extracts, fractions, and isolates against AChE was carried out in vitro by Ellman's colorimetric method. Phytochemical screening was carried out on triterpenoid/steroid, alkaloid, phenolic, flavonoid, saponin and tannin compounds. Analysis of total phenolic content was carried out by the Folin-Ciocalteu method, meanwhile total flavonoid content was determined using aluminum chloride. The stages of isolation were extraction, fractionation, separation, purification, and characterization. Extraction was done by maceration using 95% ethanol. The determination of potential extracts was done by determining the extracts that had IC_{50} values of less than 1000 $\mu\text{g/ml}$. The potential

extracts was partitioned using *n*-hexane, ethyl acetate, methanol, 70% methanol and water, respectively. The determination of the potential fraction was done by selecting the fraction that had the smallest IC₅₀ value and relatively high yield. Separation and purification of compounds in the potential fraction were carried out by Vacuum Liquid Chromatography (VLC), followed by preparative High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and preparative reverse phase Thin Layer Chromatography (TLC). The characterization of isolates was carried out by the UV-Vis spectrophotometry, mass spectrometry and NMR spectrometry. Structure elucidation was based on data derived from the characterization results.

The results showed there were 12 plant species that inhibited the activity of AChE, while 6 plant species had no activity when tested in the concentration used. This activity has never been reported before. Plant extracts that had IC₅₀ values of less than 1000 µg/mL (potential extracts) were *Cosmos caudatus*, *Manihot esculenta*, *Ocimum americanum*, and *Psophocarpus tetragonolobus*. Phytochemical screening showed that all of the extracts contained phenolic and flavonoid compounds. Total phenolic and flavonoid contents of the four potential extracts were also greater than other extracts. The potential fraction of plants which was further investigated was the methanol soluble fraction of cassava leaf (MSFC). Isolation results from selected plants obtained two flavonoid glycoside compounds whose structures were determined as kaempferol-3-*O*-rutinoside (nicotiflorin) and quercetin-3-*O*-rutinoside (rutin). Both of these compounds had AChE inhibitory activity with IC₅₀ values of nicotiflorin were 310.2 ± 7.1 µg/mL and IC₅₀ values of rutin could not be determined until the highest concentration tested (500 µg/mL).

This research provides evidence of the potential of ethanol extracts of *C. caudatus*, *M. esculenta*, *O. americanum* and *P. tetragonolobus* as AChE inhibitors. These extracts had relatively high contents of total phenolic and flavonoid, which might be responsible for the AChE activity. The active compounds such as flavonoids were a source of natural products and could be used as an AChE inhibitor.

Keywords: *Acetylcholinesterase, vegetables, potential extracts, potential fractions, phenolic, flavonoid*