

UJI IN-VITRO PENGHAMBATAN ENZIM ASETILKOLINESTERASE DAN IDENTIFIKASI FITOKIMIA FRAKSI AKTIF EKSTRAK ETANOL BUAH MENGGUDU (*Morinda citrifolia* L.)

IN-VITRO SCREENING FOR ENZYME ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY AND PHYTOCHEMICALS IDENTIFICATION OF ACTIVE FRACTION OF ETHANOLIC EXTRACT OF NONI FRUIT (*Morinda citrifolia* L.)

Shela Puzi Dina¹, Rina Herowati², Arief Nurrochmad³

¹ Akademi Farmasi ISFI

² Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi

³ Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Naskah diterima tanggal 29 Januari 2019

ABSTRACT

Acetylcholine is the neurotransmitter that plays a role in the regulation of cognitive functions, especially in encoding of new memories. Excessive hydrolysis of acetylcholine by the acetylcholinesterase enzyme can interfere memory encoding. Noni is widely available in Indonesia and had been proven to have the ability of acetylcholinesterase enzyme inhibition. This study aimed to determine the ability of fractions of ethanol extract of noni fruit to inhibit the enzyme acetylcholinesterase activity and identify chemical compounds in the active fraction of the ethanol extract of noni fruit with liquid chromatography-mass spectrometry analysis. Separation of chemical compounds was done through a two-stage extraction using maceration method and fractionated using vacuum liquid chromatography. AChE enzyme inhibition testing conducted by the Ellman's method (colorimetric method) at concentration of 1000, 500, 250, 125 µg/mL. Identification of chemical compounds was conducted liquid chromatography-mass spectrometry. IC₅₀ value of the fraction I, fraction II and fraction III of noni fruit showed respectively at 4882,29, 947,99, 1726,99, 18673,82 µg/mL. Active fraction expected contained linolenic acid, linoleic acid, pinoselinol, methyl linoleate and methyl oleate.

Keywords : *acetylcholine, acetylcholinesterase inhibitor, Morinda citrifolia L.*

ABSTRAK

Asetilkolin adalah neurotransmitter yang berperan dalam pengaturan fungsi kognitif terutama pembentukan memori baru. Hidrolisis berlebihan asetilkolin oleh enzim asetilkolinesterase dapat menyebabkan gangguan pada pembentukan memori. Mengkudu merupakan tanaman yang banyak terdapat di Indonesia dan telah teruji memiliki kemampuan penghambatan enzim asetilkolinesterase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim asetilkolinesterase fraksi-fraksi dari ekstrak etanol buah mengkudu dan identifikasi senyawa yang terkandung dalam fraksi aktif dari ekstrak etanol buah mengkudu melalui analisis *liquid chromatography-mass spectrometry*. Pemisahan senyawa dilakukan melalui dua tahap yaitu ekstraksi menggunakan metode maserasi dan fraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum. Pengujian penghambatan enzim asetilkolinesterase dilakukan dengan menggunakan metode Ellman (kolorimetri) pada konsentrasi 1000, 500, 250, 125 µg/mL. Identifikasi senyawa kimia fraksi teraktif dilakukan dengan analisis *liquid chromatography-mass spectrometry*. Nilai IC₅₀ ekstrak etanol, fraksi 1, fraksi 2 dan fraksi 3 buah mengkudu secara berturut-turut sebesar 4882,29, 947,99, 1726,99, 18673,82 µg/mL. Fraksi teraktif diduga mengandung asam linolenat, asam linoleat, pinoselinol, metil linoleat dan metil oleat.

Kata kunci : asetilkolin, penghambat asetilkolinesterase, *Morinda citrifolia* L.

Alamat korespondensi :
Sellapuzi@gmail.com

PENDAHULUAN

Fungsi kognitif dapat didefinisikan sebagai proses pengaturan informasi oleh organisme. Pengaturan informasi meliputi kegiatan memperoleh informasi (persepsi), memilih (perhatian), mewakili (pemahaman) dan mempertahankan (memori) informasi, serta menggunakannya untuk memandu perilaku (penalaran dan koordinasi motorik output) (Bostrom and Sandberg, 2009). Acetylcholine (ACh) adalah neurotransmitter pada sinapsis neuromuskuler, di ganglia sistem motorik visceral, dan di berbagai bagian dalam sistem saraf pusat). ACh dihidrolisis oleh enzim hidrolitik yang kuat, yaitu Acetylcholinesterase (AChE) (Purves et al., 2012). Kekurangan kadar ACh di otak terjadi pada penyakit demensia yang ditandai dengan penurunan fungsi kognitif (pengenalan, ingatan, daya membedakan) hingga terjadi keruntuhan mental (Tjay and Rahardja, 2015).

Intervensi dapat dilakukan untuk meningkatkan fungsi kognitif dengan tujuan memperbaiki patologi atau cacat pada subsistem kognitif. Intervensi tersebut meliputi obat-obatan, diet, edukasi, pengendalian lingkungan, mental training, Transcranial Magnetic Stimulation dan modifikasi secara genetik (Bostrom and Sandberg, 2009). Saat ini, terapi masih identik dengan intervensi obat-obatan, seperti penghambat kolinesterase dan antagonis reseptor NMDA (Tjay and Rahardja, 2015). Penggunaan obat-obatan sintesis tidak terlepas dari efek samping yang merugikan sehingga obat tradisional mulai menjadi pilihan. Penelitian menunjukkan bahwa beberapa tanaman tradisional memiliki aktivitas terhadap fungsi kognitif dan memori terutama dalam penghambatan aktivitas enzim acetylcholinesterase (AChE) di antaranya *Ginkgo biloba* L. (Ding et al., 2013), pegagan (*Centella asiatica* L.) (Rahman et al., 2012), dan mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) (Pachauri et al., 2012).

Mengkudu merupakan tanaman yang banyak terdapat di Indonesia. Penelitian praklinis (uji toksisitas kronis dan sub kronis) (West et al., 2009a) dan klinis (double blind trial pada 96 probandus) (West et al., 2009b) menunjukkan bahwa buah mengkudu aman dikonsumsi. Ekstrak etanol buah mengkudu juga dapat menghambat aktivitas enzim AChE baik secara in vitro maupun in vivo (Pachauri et al., 2012).

Penelitian Pachauri et al. (2012) telah mencapai tahap fraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair, dimana fraksi yang berasal dari pelarut kloroform memiliki kemampuan penghambatan aktivitas enzim AChE lebih besar dibandingkan dengan fraksi yang berasal dari pelarut dengan kepolaran lebih tinggi (etil asetat

dan n-butanol). Senyawa-senyawa yang terlarut dalam fraksi kloroform diperkirakan adalah senyawa-senyawa dengan kepolaran rendah namun dapat juga berasal dari golongan alkaloid. Alkaloid memiliki penghambatan kuat terhadap aktivitas enzim AChE karena memiliki kemiripan dengan substrat (ACh) yaitu adanya gugus nitrogen (Pachauri et al., 2012).

Senyawa-senyawa pada mengkudu yang berperan dalam penghambatan enzim AChE diperkirakan dapat berasal dari golongan senyawa nonpolar, alkaloid, lignan dan flavonoid sehingga fraksinasi dengan kromatografi cair vakum (KCV) menggunakan seri eluen nonpolar hingga semipolar. Fraksi aktif diperoleh dengan pengujian penghambatan aktivitas enzim AChE secara in vitro. Identifikasi senyawa pada fraksi paling aktif dilakukan dengan menggunakan liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

LC-MS merupakan suatu teknik dengan perkembangan electrospray ionisation (ESI) yang sederhana dan kuat serta dapat diterapkan untuk berbagai molekul biologis. Standar isotop internal yang stabil memungkinkan tes yang sangat sensitif dan akurat untuk dikembangkan meskipun beberapa optimasi metode diperlukan untuk meminimalkan efek penekanan ion. Kecepatan scanning memungkinkan multiplexing tingkat tinggi dan banyak senyawa dapat diukur dalam analisis tunggal (Pitt, 2009). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim acetylcholinesterase dan identifikasi senyawa yang terkandung dalam fraksi aktif dari ekstrak etanol buah mengkudu melalui analisis LC-MS

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi bejana maserasi, oven (Memmert), kertas saring (Whatman), Waterbath (Memmert), Rotary evaporator (IKA), lemari asam (E-scinting), neraca analitik (Ohaus), kolom KCV (Iwaki), pompa KCV (Hitachi), plat KLT (Merck), chamber (Macherey Nagel), pipa kapiler (Nesco), LC-MS (Mariner Biospectrometry), alat-alat gelas (Pyrex), magnetic stirer (IKA), mortir dan stamper (OneMed), kolorimeter dari Elisa microplate reader (Biotek), microplate (Iwaki), mikropipet (Biohit), microtube (Axygen), kain flanel, dan botol kaca.

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi serbuk simplisia buah mengkudu, etanol 96%, n-heksana, etil asetat, silika gel G 60, DMSO, kontrol positif (neostigmin) dan enzim AChE tipe VI-S, dari electric eel, 5,5-dithiobis[2-nitrobenzoic acid], AChI, Tris-HCl buffer, aqua

destilata.

Metode

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu :

Identifikasi serbuk simplisia buah mengkudu

Identifikasi serbuk simplisia dilakukan di Laboratorium Taksonomi Universitas Setia Budi. Identifikasi meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis dilakukan dengan uji organoleptis meliputi bentuk, warna, bau dan rasa. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan untuk mengidentifikasi fragmen pengenalan buah mengkudu berdasarkan literatur. Serbuk simplisia diletakkan di atas kaca objek, ditetesi kloralhidrat dan ditutup dengan kaca penutup serta diamati di bawah mikroskop.

Pemisahan senyawa

Pemisahan senyawa dilakukan dengan ekstraksi dengan metode maserasi dan fraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum (KCV). Ekstrak etanol buah mengkudu dibuat dengan cara maserasi menggunakan etanol 96%. Serbuk kering sebanyak 1 kg dimasukkan ke dalam bejana maserasi dan ditambahkan 5 liter cairan penyari. Ekstraksi dilakukan selama 5 hari dengan pengadukan secara berkala dan dilakukan penggantian cairan penyari (remaserasi).

Langkah pertama dalam fraksinasi dengan KCV adalah mengemas kolom. Kolom kromatografi dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Pompa vakum dihentikan dan 100 mL n-heksana dituangkan ke permukaan penjerap dan divakumkan kembali. Kolom dihisap sampai kering dan telah siap digunakan. 75 gram ekstrak etanol buah mengkudu dimasukkan ke dalam kolom yang telah dilapisi kertas saring, Elusi dimulai dengan eluen n-heksana (100 %), kemudian dilakukan peningkatan kepolaran bertahap yaitu n-heksana : etil asetat dengan rasio perbandingan 99 : 1, 98 : 1, 97 : 3, 96 : 4, 95 : 5, 94 : 6, 92 : 8, 90 : 10, 88 : 12, 87 : 13, 86 : 14, 84 : 16. Volume eluen yang digunakan setiap elusi adalah sebanyak 50 mL. Fraksi-fraksi nonpolar-semipolar diidentifikasi dengan KLT. Bercak pada plat KLT diamati di bawah sinar UV. Bercak yang sama diidentifikasi memiliki komponen kimia yang sama dan dapat dijadikan satu fraksi.

Penyiapan larutan uji

Larutan uji digunakan dalam penelitian ini antara lain ekstrak etanol buah mengkudu, fraksi-fraksi nonpolar-semipolar ekstrak etanol buah mengkudu dan neostigmin (kontrol positif). Pembuatan larutan uji ekstrak etanol buah mengkudu, fraksi-fraksi nonpolar-semipolar ekstrak etanol buah mengkudu dilakukan dengan

cara memasukkan 2 mg (terlarut dalam pelarut yang sesuai) bahan-bahan tersebut ke dalam microtube dan ditambahkan buffer tris HCl pH 8 hingga tanda batas untuk memperoleh konsentrasi 2000 µg/mL. Pengenceran dilakukan untuk memperoleh konsentrasi yang lebih kecil (1000, 500, 250, 125 µg/mL); Larutan neostigmin 500 µg/mL diencerkan dengan buffer tris HCl pH 8 untuk memperoleh konsentrasi 62,5; 31,25; 15,625; 7,812 dan 3,906 µg/mL.

Pengujian penghambatan aktivitas enzim AChE secara in vitro

Pengujian penghambatan aktivitas enzim AChE dilakukan dengan metode Ellman dikombinasi dengan metode yang dikembangkan Rhee et al. (2001). Microplate 96 wells diisi dengan 25 µL larutan uji, 50 µL Tris-HCl buffer 50 mM pH 8, 25 µL larutan enzim AChE (0,2 unit/ml), diinkubasi pada temperatur 25°C selama 10 menit, ditambahkan 125 µL DTNB 3 mM. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 405 nm menggunakan kolorimeter dari Elisa microplate reader. Absorbansi sebelum penambahan substrat digunakan sebagai blanko. Selanjutnya, 25 µL AChI 15 mM ditambahkan ke dalam microplate 96 wells dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 405 nm menggunakan kolorimeter dari Elisa microplate reader dengan interval waktu satu menit sebanyak 5 kali (pada kontrol negatif 25 µL larutan uji diganti dengan buffer tris HCl pH 8) –(Rhee et al., 2001).

Persentase penghambatan aktivitas enzim AChE dihitung dengan persamaan :

%Penghambatan =

$$\frac{\text{slope kontrol negatif} - \text{slope larutan uji}}{\text{slope kontrol}} \times 100\%$$

Identifikasi senyawa kimia dengan LC-MS dilakukan pada fraksi dengan penghambatan aktivitas enzim AChE tertinggi. Analisis LC-MS dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Kolom yang digunakan adalah C18 (RP 18), 150 mm x 2 mm. Sistem elusi isokratik dengan eluen metanol. Laju alir eluen 0,5 mL/menit. Suhu kolom diatur pada suhu ruangan yaitu 25°C.

Preparasi LC-MS dilakukan sebelum analisis sampel. Pertama, dilakukan purging pada kolom LC untuk menghilangkan sisa eluen dan dilanjutkan dengan pumping eluen selama 5 menit dan equilibrate selama 5 menit untuk menstabilkan LC. Selanjutnya, dilakukan optimasi spektrometri masa dan kondisi sumber ion dengan memvariasikan beberapa parameter.

Setelah preparasi LC-MS selesai, sampel yang telah dilarutkan dalam metanol

mengandung 0,3 % asam asetat diinjeksikan ke LC-MS sebanyak 20 µL. Sampel akan dipisahkan oleh HPLC fase terbalik untuk kemudian dianalisis MS dengan metode ionisasi ESI. Identifikasi fitokimia dilakukan dengan membandingkan spektra MS dengan bobot molekul senyawa menurut literatur.

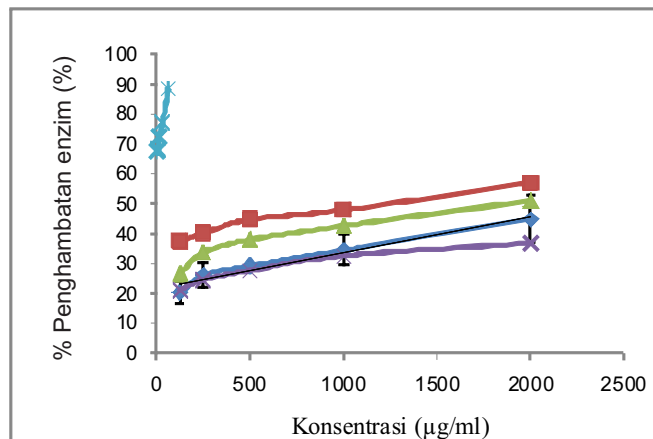
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi 1 kg serbuk simplisia buah mengkudu menghasilkan ekstrak kental sebesar 77,435 gram (rendemen 7,74%). Berdasarkan hasil fraksinasi 20 g ekstrak etanol buah mengkudu diperoleh fraksi 1, fraksi 2, dan fraksi 3 berturut-turut sebesar 1703 mg (rendemen 8,51 %), sebesar 959 mg (rendemen 4,79 %), 636 mg (rendemen 3,18 %).

Pengujian penghambatan enzim asetilkolinesterase pada penelitian ini dilakukan dengan metode kolorimetri (Metode Ellman). Slope kontrol negatif (enzim tanpa sampel) yang diperoleh pada penelitian sebesar 0,087. Persentase penghambatan enzim pada Gambar 1 dihitung berdasarkan perbandingan selisih slope enzim dan sampel terhadap slope enzim.

Nilai IC₅₀ diperoleh dengan analisis log probit. Hasil perhitungan IC₅₀ dengan analisis log probit dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan perbandingan nilai IC₅₀ masing-masing sampel, diketahui fraksi satu memiliki daya hambat terbesar. Nilai IC₅₀ ekstrak mengkudu dan fraksi-fraksinya menunjukkan penghambatan enzim yang lemah sedangkan pada penelitian sebelumnya, ekstrak mengkudu dan fraksi-fraksinya menunjukkan penghambatan sedang hingga kuat. Hal-hal yang menyebabkan perbedaan hasil dapat terjadi di antaranya enzim yang digunakan, perbandingan jumlah sampel dan enzim, pelarut pada proses fraksinasi serta kelarutan sampel dalam buffer.

Fraksi dengan kemampuan penghambatan aktivitas enzim AChE terbesar (F1), dianalisis dengan LCMS. Berdasarkan pemisahan LC fraksi I ekstrak etanol buah mengkudu, diperoleh 5 puncak dengan persen intensitas cukup tinggi pada waktu retensi 2,2;



Keterangan :
 - Ekstrak etanol buah mengkudu
 - Fraksi 1 buah mengkudu
 - Fraksi 2 buah mengkudu
 - Fraksi 3 buah mengkudu
 - Neostigmin

Gambar 1. Grafik persentase penghambatan enzim AChE

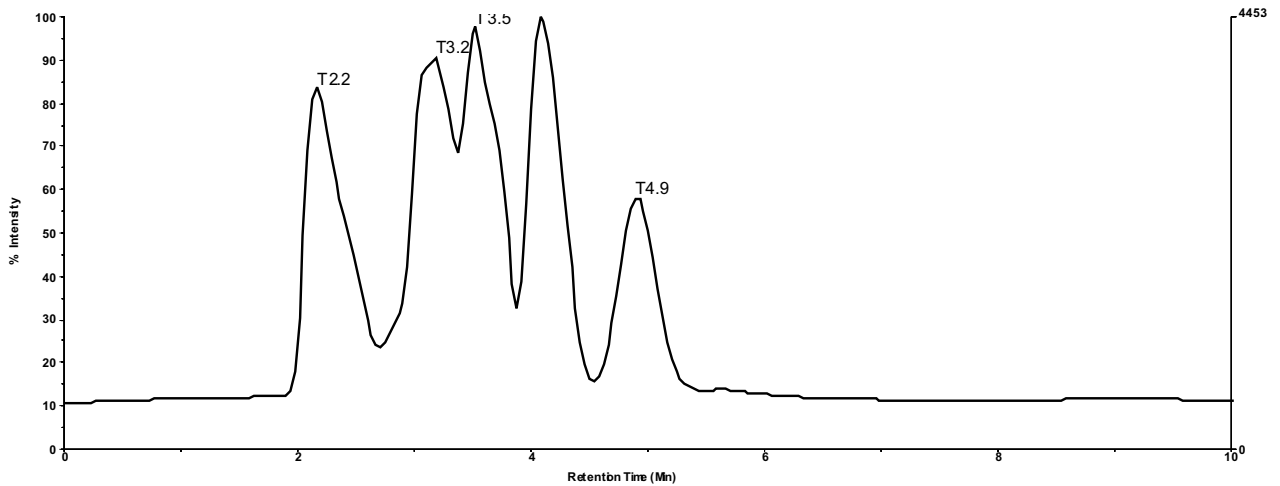
Tabel 1. Nilai IC₅₀ penghambatan neostigmin, ekstrak etanol buah mengkudu dan fraksi-fraksinya terhadap enzim asetilkolinesterase

Sampel	IC ₅₀ (µg/ml)
Neostigmin	3,44
Ekstrak etanol buah mengkudu	4882,29
Fraksi1 buah mengkudu	947,99
Fraksi 2 buah mengkudu	1726,99
Fraksi 3 buah mengkudu	18673,82

3,2; 3,5; 4,1 dan 4,9 menit seperti terlihat pada Gambar 2. Kelimpahan senyawa pada sampel diperoleh dengan membandingkan luas area. Puncak pertama memiliki kelimpahan terbesar diikuti oleh puncak kedua, keempat, ketiga dan kelima. Adanya 5 puncak diduga terdapat 5 senyawa pada fraksi I. Selanjutnya, masing-masing puncak akan dianalisis oleh MS sehingga diperoleh bobot molekul dengan penambahan ion positif. Spektra MS dapat dilihat pada Gambar 3. Beberapa senyawa pada buah mengkudu yang memiliki bobot molekul (setelah

Tabel 2. Dugaan senyawa pada fraksi I ekstrak etanol buah mengkudu yang memiliki bobot molekul (setelah penambahan ion positif) yang mirip dengan spektra MS

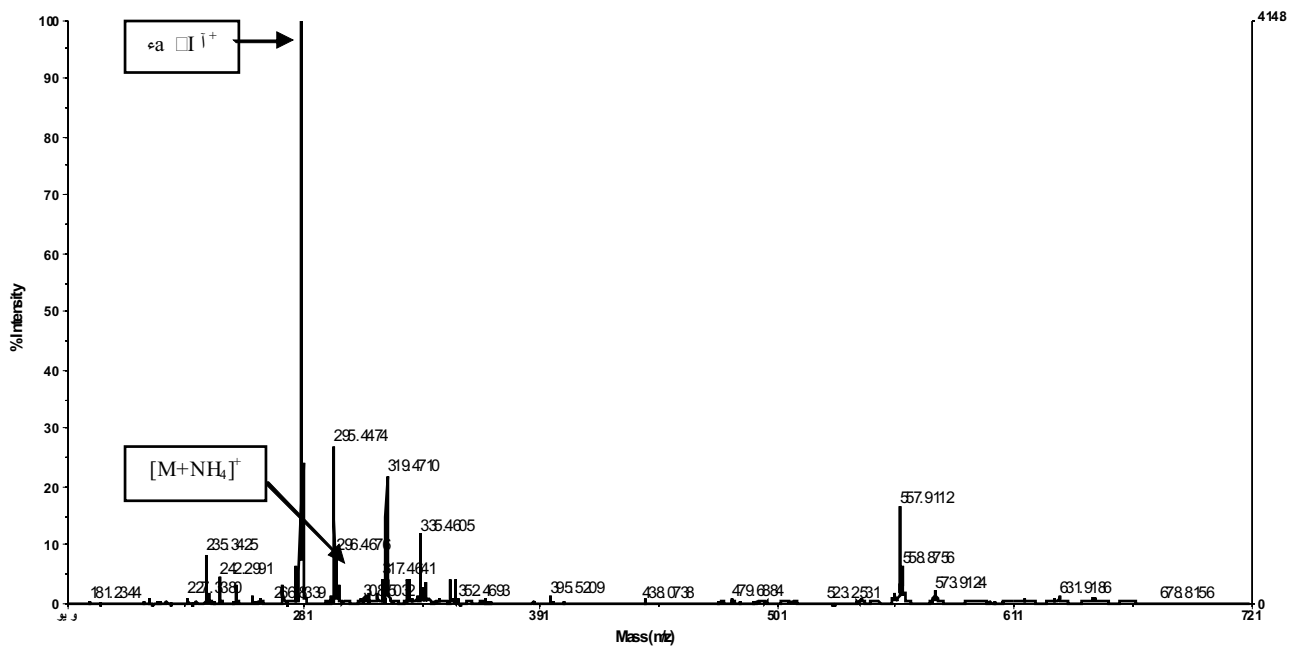
Waktu retensi (menit)	[M+H] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M+Na] ⁺	Perkiraan senyawa	BM (g/mol)
2,2	279,4439	296,4676		Asam linolenat	278,43
3,2	281,4676	298,5085	303,4664	Asam linoleat	280,4472
3,5	359,5965	376,6416	381,5965	Pinoresinol	358,38508
4,1	295,4904	312,5368	317,4894	Metil linoleat	294,47
4,9	297,5078	314,5575	319,5058	Metil oleat	296,49



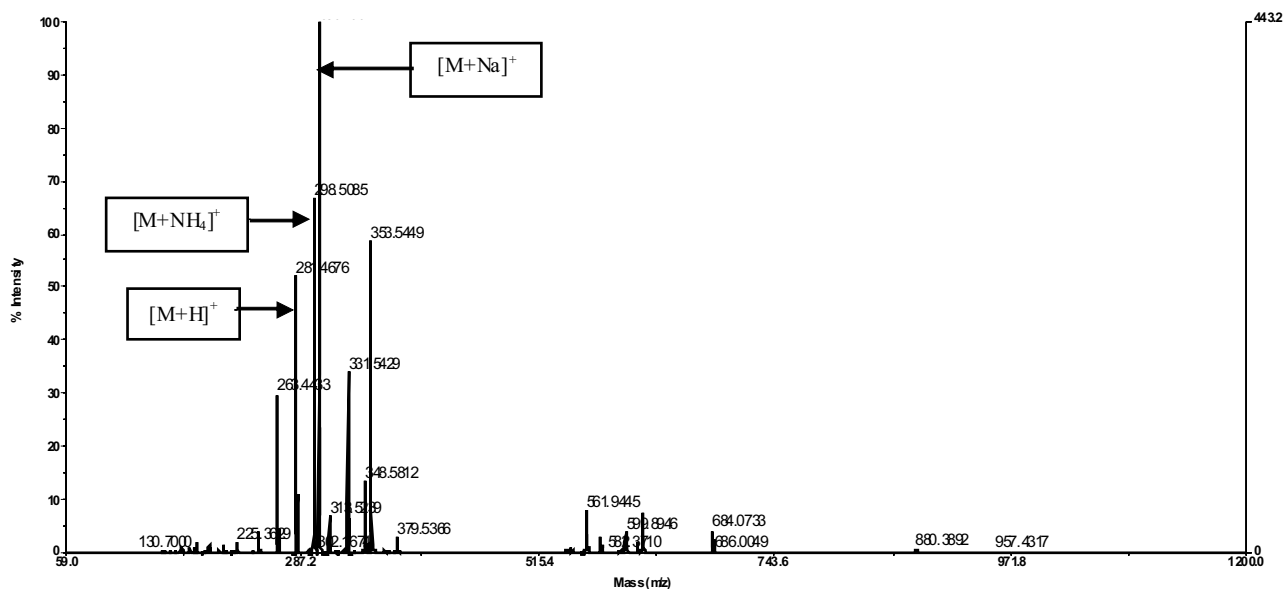
Keterangan:

Indeks	Waktu (menit)	Batas bawah	Batas atas	Tinggi	Area	Kelimpahan (%)
1	2,166283	1,467267	2,672000	373	3405,90	25,79123
2	3,177733	2,749617	3,333617	404	2715,86	20,56589
3	3,528067	3,411400	3,839350	435	1996,99	15,12224
4	4,072183	3,916967	4,499633	445	3160,90	23,93597
5	4,888017	4,577416	5,432300	258	1926,00	14,58467

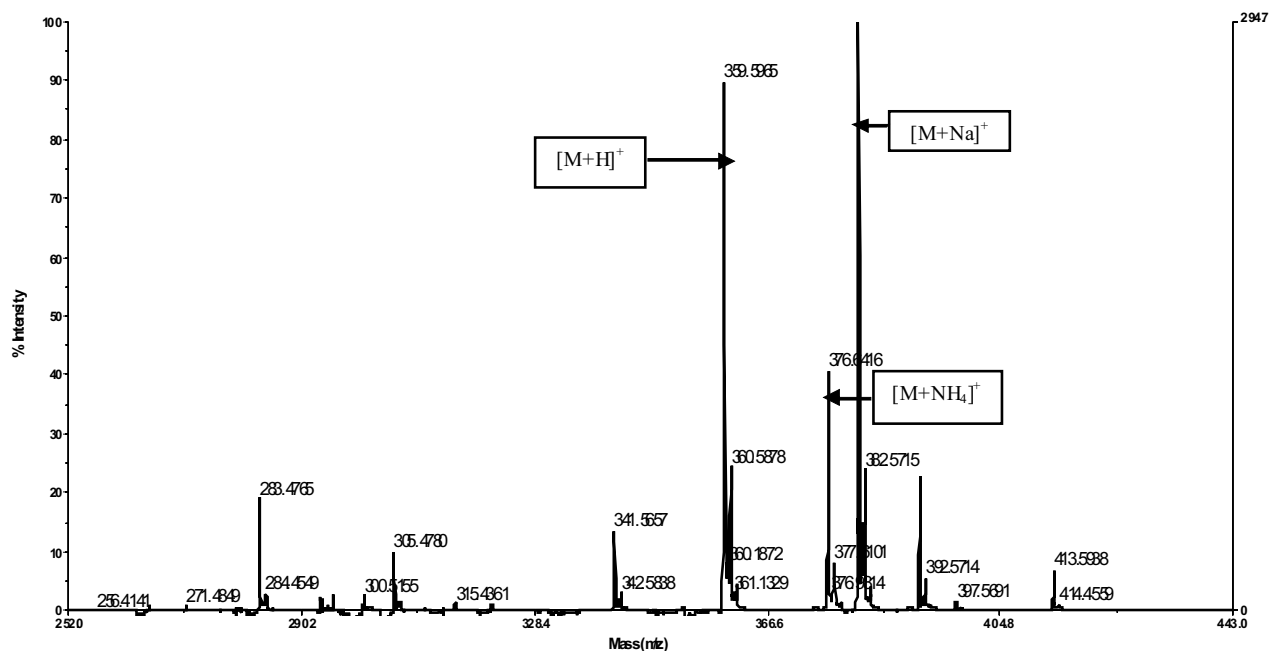
Gambar 2. Profil LC fraksi 1 ekstrak etanol buah mengkudu



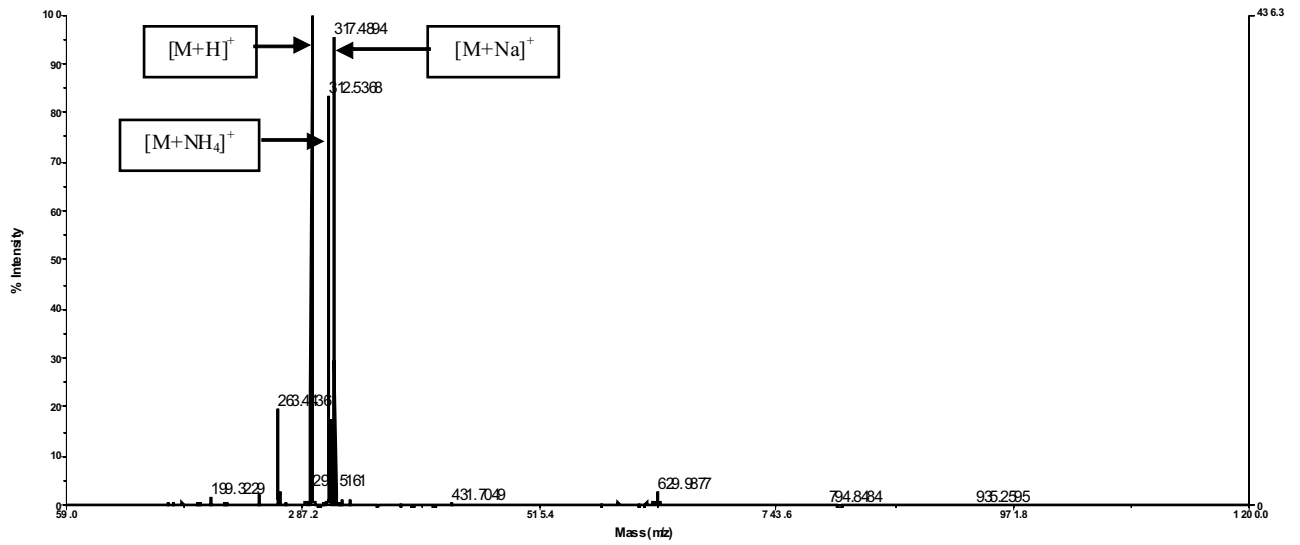
(a) Waktu retensi 2,2 menit



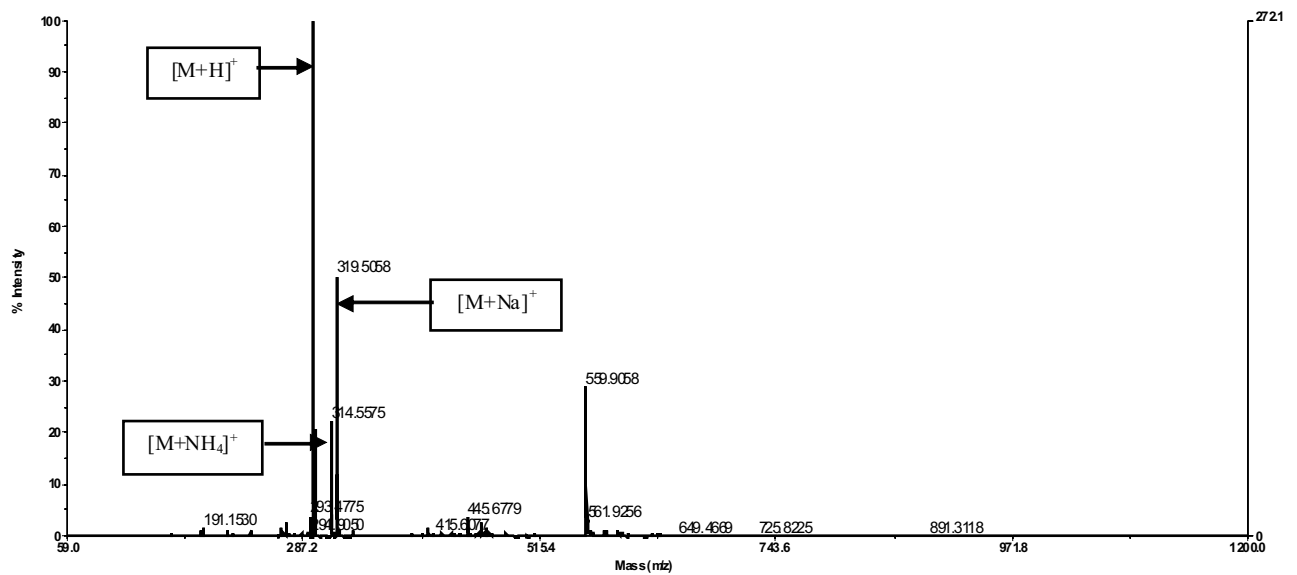
(b) Waktu retensi 3,2 menit



(c) Waktu retensi 3,5 menit



(d) Waktu retensi 4,1 menit



(e) Waktu retensi 4,9 menit

Gambar 3. Spektra MS fraksi 1 ekstrak etanol buah mengkudu a) waktu retensi 2,2 menit, b) waktu retensi 3,2 menit, c) waktu retensi 3,5 menit, d) waktu retensi 4,1 menit dan e) waktu retensi 4,9 menit

penambahan ion positif) yang mirip dengan spektra MS dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil analisis spektra MS, diperoleh dua prediksi senyawa pada fraksi I adalah asam linolenat, asam linoleat, pinoselinol, metil linoleat dan metil oleat. Berdasarkan hasil penelitian *in silico* Srikanth et al. (2017), diperoleh lima senyawa pada ekstrak buah mengkudu yang memiliki afinitas lebih baik daripada obat penghambat terhadap enzim AChE secara *in silico* yaitu : (+)-3,3'-bisdemetiltanegool, 3,3'-bisdemetilpinoselinol, (-)-pinoselinol, asam isoamericanolat A, kuersetin. Efek penghambatan mungkin berhubungan dengan efek kumulatif dari ikatan kuat H₂, interaksi cationin-π-π-π dan interaksi hidrofobik terhadap enzim (Srikanth et al., 2017).

Pengujian yang dilakukan oleh El-Hasan et al. (2003) menunjukkan bahwa syringaresinol memiliki daya hambat signifikan terhadap aktivitas enzim AChE dengan nilai IC₅₀ 200 µg/ml sedangkan pinoselinol, leucanthenitol dan E-ferulaldehid menghambat aktivitas enzim AChE dengan rentang sebesar 20–35% pada konsentrasi lebih tinggi (El-Hasan et al., 2003). Berdasarkan penelitian lain, pinoselinol dapat memperbaiki kerusakan memori pada mencit yang diinduksi dengan penghambat kolinergik, memfasilitasi induksi potensiasi jangka panjang hipokampus, memblokir enzim AChE serta memfasilitasi masuknya kalsium ke dalam sel neuro 2a (Yu et al., 2019).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh nilai IC₅₀ ekstrak etanol, fraksi 1, fraksi 2 dan fraksi 3 buah mengkudu secara berturut-turut sebesar 4882,29, 947,99, 1726,99, 18673,82 ppm. Fraksi teraktif dalam pengujian penghambatan aktivitas enzim AChE diduga mengandung senyawa asam linolenat, asam linoleat, pinoselinol, metil linoleat dan metil oleat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Selama penulisan karya tulis ini berlangsung, tidak lepas dari bimbingan serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak atas dukungan, bantuan serta kerja samanya hingga terselesaikannya karya tulis ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bostrom, N., Sandberg, A., 2009. Cognitive Enhancement: Methods, Ethics, Regulatory Challenges. *Sci. Eng. Ethics* 15, 311341. <https://doi.org/10.1007/s11948-009-9142-5>
- Ding, X., Ouyang, M.-A., Liu, X., Wang, R.-Z., 2013. Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Flavonoids from the Leaves of *Ginkgo biloba* against Brown Planthopper. *J. Chem.* 2013, 14. <https://doi.org/10.1155/2013/645086>
- El-Hasan, A., El-Sayed, M., Hamed, A., Verpoorte, R., 2003. Bioactive constituents of *Leptadenia arborea*. *Fitoterapia* 74, 184187. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00314-3](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00314-3)
- Pachauri, S.D., Tota, S., Khandelwal, K., Verma, P.R., Nath, C., Hanif, K., Shukla, R., Saxena, J.K., Dwivedi, A.K., 2012. Protective effect of fruits of *Morinda citrifolia* L. on scopolamine induced memory impairment in mice: a behavioral, biochemical and cerebral blood flow study. *J. Ethnopharmacol.* 139, 3441. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.057>
- Pitt, J.J., 2009. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* 30, 1934.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.-S., White, L.E., Mooney, R.D., Platt, M.L., 2012. *Neuroscience* 5th edition. Sinauer Associates, USA.
- Rhee, I.K., van de Meent, M., Ingkaninan, K., Verpoorte, R., 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from *Amaryllidaceae* using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatogr. A* 915, 217223. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0)
- Srikanth, J., Kavimani, S., Reddy, C.U.M., Chitra, K., 2017. Comparative Molecular Docking Study of Phytoconstituents Identified in *Morinda Citrifolia* Linn on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *J. Chem. Pharm. Res.* 9(4), 121125.
- Tjay, T.H., Rahardja, K., 2015. *Obat-obat Penting Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya*, 7th ed. PT Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia, Jakarta.
- West, B.J., Su, C.X., Jensen, C.J., 2009a. Hepatotoxicity and subchronic toxicity test of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. *J. Toxicol. Sci.* 34, 583585. <https://doi.org/10.2131/jts.34.581>
- West, B.J., White, L.D., Jensen, C.J., Palu, Afa K., 2009b. A Double-Blind Clinical Safety Study of Noni Fruit Juice. *Pac. Health Dialog* 15, 2132.
- Yu, J., Kwon, H., Cho, E., Jeon, J., Kang, R.H., Youn, K., Jun, M., Lee, Y.C., Ryu, J.H.,

Kim, D.H., 2019. The effects of pinoresinol on cholinergic dysfunction-induced memory impairments and synaptic plasticity in mice. *Food Chem. Toxicol.* 125, 376-382. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.017>

