

STUDI IN VITRO EKSTRAK KULIT JERUK PURUT UNTUK APLIKASI TERAPI DIABETES MELITUS

Cicilia Setyabudi¹⁾, Stefani Tanda¹⁾, Wenny Irawaty Santosa²⁾, dan Felycia Edi Soetaredjo²⁾
Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Jalan Kalijudan 37
Surabaya
Email: wenny_i_s@yahoo.com

ABSTRAK

Jeruk purut memiliki kandungan senyawa polifenol dan flavonoid yang diyakini memiliki sifat antioksidan sehingga mampu menangkal radikal bebas yang menghambat kinerja pankreas dalam menghasilkan hormon insulin untuk menstabilkan jumlah glukosa di dalam darah manusia. Antioksidan yang berasal dari limbah kulit jeruk purut menjadi fokus penelitian ini. Beberapa studi menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dalam limbah buah; seperti kulit dan biji; daripada bagian buah yang dapat dikonsumsi. Pada penelitian ini, senyawa antioksidan dalam kulit jeruk diekstrak dengan menggunakan metode maserasi menggunakan berbagai macam pelarut yang berbeda tingkat polaritasnya (air, etanol, etil asetat, dan heksana) dan variasi waktu ekstraksi pada temperatur ruang. Pada ekstrak yang diperoleh dilakukan uji kandungan total senyawa fenolik (TPC) dan total senyawa flavonoid (TFC). Dilakukan pula uji *in-vitro* terhadap ekstrak yang memberikan perolehan TPC dan TFC terbesar dari masing-masing pelarut untuk mengamati aktivitas antidiabetes dari ekstrak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa air memberikan perolehan TPC dan TFC terbesar pada 18 jam, sedangkan etanol dan etil asetat pada 45 jam. Uji *in-vitro* pada ekstrak-ekstrak tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kulit jeruk purut dengan pelarut etanol memberikan %inhibition enzim α -amylase tertinggi dibanding dengan pelarut lainnya, yaitu sebesar 34,2%.

Kata kunci : Kulit Jeruk Purut, Ekstraksi, TPC, TFC, Aktivitas Antidiabetes, Uji *In-Vitro*

I. Pendahuluan

Diabetes Melitus (DM) sudah menjadi keprihatinan tersendiri bagi masyarakat dunia sebagai salah satu penyakit paling mematikan. Perkiraan data terakhir menunjukkan bahwa sekitar 366 juta orang di dunia akan mengidap DM pada tahun 2030 (1). Sedangkan di Indonesia sendiri, diperkirakan pada tahun 2030 akan memiliki penyandang DM sebanyak 21,3 juta jiwa (2). DM atau penyakit kencing manis, adalah suatu penyakit yang disebabkan adanya gangguan pada sistem metabolisme karbohidrat di dalam tubuh. Gangguan tersebut terjadi karena kurangnya produksi hormon insulin oleh pankreas untuk mengubah glukosa menjadi tenaga serta sintesis lemak, sehingga mengakibatkan peningkatan kadar gula dalam darah (3, 4).

Penyebab DM berhubungan dengan peningkatan tegangan oksidatif. Tegangan oksidatif diakibatkan oleh produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS), Pembentukan satu *reactive species* di dalam tubuh dapat memicu pembentukan *reactive species* lainnya melalui reaksi radikal berantai (3, 5). Di bawah kondisi hiperglikemia produksi ROS dapat meningkat karena terganggunya metabolisme intraselular karbohidrat (6).

Secara alami, ROS dapat dihilangkan oleh sistem pertahanan antioksidan secara enzimatik maupun non-enzimatik di dalam tubuh (3). Namun, jika kondisi tubuh sudah tidak memungkinkan untuk menanggulangi radikal bebas dengan sendirinya, seperti halnya penderita DM, maka hal tersebut dapat diatasi dengan mengkonsumsi antioksidan. Berbagai jenis antioksidan seperti flavonoid dan polifenol terkandung dalam jumlah yang besar hampir diseluruh bagian dari tumbuh-tumbuhan. Antioksidan alami dari kulit jeruk purut menjadi fokus utama pada penelitian ini.

Jeruk purut, merupakan tumbuhan endemik di kawasan Asia Tenggara, termasuk Indonesia sehingga dapat dengan mudah dijumpai. Jeruk purut dilaporkan mengandung berbagai macam senyawa fenolik dan flavonoid yang dilaporkan memiliki aktivitas antidiabetes seperti *gallic acid*, naringin, hesperidin, dan naringenin(7-11). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Chan dkk (2009) kulit jeruk purut yang diekstrak dengan menggunakan etanol pada berbagai variasi kondisi memberikan hasil kadar TPC rata-rata yang cukup besar yaitu ± 1200 mg asam GAE (*Gallic Acid Equivalent*) / 100 gram berat kering sampel (12). Hal ini diperkuat dengan penelitian yang menunjukkan bahwa jeruk purut memiliki kadar TPC dan TFC yang paling tinggi jika dibandingkan dengan spesies lain dari genus yang sama (13). Berdasarkan data-data tersebut di atas, kulit jeruk purut sangat berpotensi untuk diteliti dan dikembangkan sebagai salah satu agen terapi DM.

Pada penelitian ini, ada beberapa faktor yang berkaitan dengan ekstraksi antioksidan dari kulit jeruk purut yang akan dipelajari secara mendalam, yaitu variasi polaritas pelarut yang digunakan dan waktu ekstraksi untuk

memperoleh kadar antioksidan tertinggi dari tiap pelarut. Ekstraksi akan dilakukan dengan metode maserasi pada suhu ruang. Kadar antioksidan pada ekstrak kulit jeruk purut dianalisa dan dinyatakan dalam TPC (Total Phenolic Content) dan TFC (Total Flavonoid Content). Ekstrak kulit jeruk purut dengan TPC dan TFC tertinggi, kemudian diuji secara in-vitro dengan menggunakan enzim α -amylase sebagai standar untuk meninjau aktivitas antidiabetes ekstrak kulit jeruk purut yang dinyatakan dalam % inhibition.

II. Metode Penelitian

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquades, etanol, etil asetat, heksana, metanol p.a, rutin p.a, reagen *Folin-Ciocalteu* p.a, Na_2CO_3 p.a, *gallic acid* p.a, DNS p.a, NaOH, p.a, $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ p.a, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ p.a, AlCl_3 p.a, glukosa p.a, amilum p.a, Garam rochelle p.a, enzim α -amylase p.a. Bahan baku jeruk purut diperoleh dari Ponorogo, Jawa Timur.

Alat-alat instrument yang digunakan adalah *Sieve Shaker* (Retsch, AS 200); *Hot Plate* (LABINCO, L-81); Spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu, UVmini-1240); HPLC (Jas.co, Detektor : UV-2077 Plus, Pompa : PU-2089 Plus); *Moisture ballance* (Ohaus, MB35 HALOGEN); *Centrifuge* (Hettich Zentrifugen, EBA 20) pada 3000 rpm; *Rotavapor* (*Heater* : IKA HB-10, *Rotator* : IKA RV-10) pada 60°C, 80 rpm; *Vacuum Oven* (Vacucell) 0,4 atm, 60°C; *Vacuum pump* (Gast DOA-P504-BN).

II.1. Persiapan Bahan Baku

Jeruk purut segar dicuci, dipotong-potong kulitnya, lalu dikeringkan dibawah sinar matahari selama 48 jam, hingga diperoleh *moisture content* sebesar 5-6%. Kulit jeruk purut diayak untuk memperoleh ukuran partikel antara 1,6-1,7 mm. Selanjutnya dilakukan ekstraksi serbuk kasar kulit jeruk purut dengan metode maserasi menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda polaritas yaitu aquades, etanol, etil asetat, dan heksana.

II.2. Ekstraksi Senyawa Fenolik dan Flavonoid dengan Metode Maserasi

Ekstraksi serbuk kasar kulit jeruk purut dengan metode maserasi dilakukan dalam botol coklat tertutup dengan variasi waktu tertentu dari 3 sampai 60 jam. Serbuk kasar kulit jeruk purut sebanyak 0,5 gram dicampur dengan 20 mL pelarut aquadest, etanol, etil asetat, dan heksana (1:40). Setelah proses ekstraksi berakhir, hasil ekstraksi disentrifugasi pada 3.000 rpm selama 30 menit dengan *Centrifuge* (Hettich Zentrifugen, EBA 20) untuk memisahkan filtrat dari padatan yang tersuspensi di dalam filtrat.

II.3. Penentuan TPC (Total Phenolic Content)

Jumlah komponen senyawa fenolik ditentukan dengan menggunakan metode kolorimetri *Folin-Ciocalteu* (12). Uji TPC dilakukan dengan mengambil ekstrak cair dari tiap pelarut sebanyak 0,2 mL kemudian ditambahkan 1,7 mL aquadest serta 1 mL reagen *Folin-Ciocalteu* 1:10 (v/v) lalu didiamkan selama 1 menit pada suhu ruang. Campuran lalu ditambahkan 3 mL natrium karbonat 7,5% (w/v). Setelah didiamkan kembali selama 30 menit pada suhu ruang, larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (Shimadzu UVmini-1240) pada panjang gelombang 736 nm untuk pelarut aquadest, 731 nm untuk pelarut etanol, dan 726 nm untuk pelarut etil asetat. Hasil TPC ekstrak dinyatakan dalam ekuivalen asam galat (mg GAE/g kulit jeruk) dengan persamaan (I) berikut :

$$\text{TPC} = c \times n \times \frac{v}{\text{g kulit jeruk}} \quad (\text{I})$$

dimana:

TPC = konsentrasi senyawa fenolik pada ekstrak (mg GAE/g kulit jeruk)

c = konsentrasi senyawa fenolik (mg asam galat/L)

n = faktor pengenceran (kali)

v = volume pelarut yang digunakan saat ekstraksi (0,02 L)

II.4. Penentuan TFC (Total Flavonoid Content)

Jumlah komponen senyawa flavonoid ditentukan dengan menggunakan metode kolorimetri Aluminium Klorida (14). Uji TFC dilakukan dengan mengambil ekstrak cair dari tiap pelarut sebanyak 0,4 mL kemudian ditambahkan 1,8 mL metanol dan 2 mL AlCl_3 10%. Campuran lalu dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruang, larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 421 nm untuk pelarut aquadest, 425 nm untuk pelarut etanol, dan 422 nm untuk pelarut etil asetat. Hasil TFC ekstrak dinyatakan dalam ekuivalen rutin (mg RE/g kulit jeruk) dengan persamaan (II) berikut :

$$\text{TFC} = c \times n \times \frac{v}{\text{g kulit jeruk}} \quad (\text{II})$$

dimana:

TFC = konsentrasi senyawa flavonoid pada ekstrak (mg RE/g kulit jeruk)

c = konsentrasi senyawa flavonoid (mg rutin/L)

n = faktor pengenceran (kali)

v = volume pelarut yang digunakan saat ekstraksi (0,02 L)

II.5. Uji In-Vitro dengan Enzim α -amylase

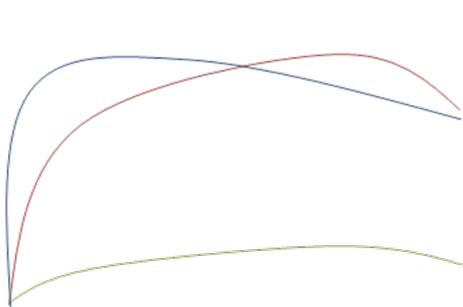
Uji in-vitro untuk mengetahui aktivitas antidiabetes dari ekstrak dalam menghambat kinerja enzim α -amylase dilakukan dengan memisahkan ekstrak dari pelarutnya dengan jalan pengeringan vakum. Selanjutnya

ekstrak kering dilarutkan dalam aquadest dengan perbandingan 1% (b/v). Larutan ekstrak tersebut kemudian dicampurkan dengan larutan enzim α -amylase 1% (b/v) dan larutan amilum 1% (b/v), lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang (15, 16). Reaksi enzimatis dihentikan dengan penambahan larutan DNS pada campuran, lalu dipanaskan selama \pm 5 menit dan diukur absorbansinya pada 492 nm. Hasil uji in-vitro dinyatakan dalam % inhibition sebagai berikut:

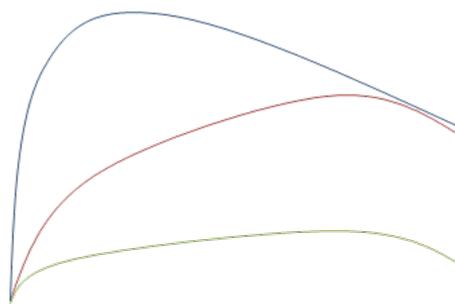
$$\% \text{ inhibition} = \left| \frac{C_{\text{kontrol}} - C_{\text{ekstrak air}}}{C_{\text{kontrol}}} \right| \times 100\%$$

III. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Kadar TPC dan TFC yang diperoleh dari ekstraksi kulit jeruk purut disajikan pada Gambar.1 dan Gambar.2 berikut ini.



Gambar 1. Hubungan antara waktu ekstraksi dan TPC pada pelarut (♦) Air, (●) Etanol, (■) Etil Asetat, (▲) Heksana



Gambar 2. Hubungan antara waktu ekstraksi dan TFC pada pelarut (♦) Air, (●) Etanol, (■) Etil Asetat, (▲) Heksana

Dari Gambar.1 dan Gambar.2. terlihat bahwa konsentrasi antioksidan, yang dinyatakan dalam TPC dan TFC, dipengaruhi oleh lamanya waktu ekstraksi serta jenis pelarut yang digunakan. Perolehan TPC dan TFC tertinggi untuk masing-masing pelarut, yaitu air pada 18 jam (TPC=29,3 mg GAE/g kulit jeruk; TFC=14,9 mg RE/g kulit jeruk), etanol pada 45 jam (TPC=29,1 mg GAE/g kulit jeruk; TFC=10,5 mg RE/g kulit jeruk), etil asetat pada 45 jam (TPC= 6,9 mg GAE/g kulit jeruk; TFC=3,9 mg RE/g kulit jeruk). Sedangkan, TPC dan TFC pada ekstrak dengan pelarut heksana sama sekali tidak terdeteksi. Hal ini ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada ekstrak heksana setelah ditambahkan reagen.

III.1. Pengaruh Waktu Ekstraksi terhadap Ekstrak Kulit Jeruk Purut

Secara umum, dari Gambar.1 dan Gambar.2 terlihat bahwa semakin lama waktu ekstraksi, maka konsentrasi antioksidan, dalam hal ini perolehan TPC dan TFC, yang terekstrak semakin tinggi. Namun seiring dengan bertambahnya tingkat kejenuhan pelarut dari waktu ke waktu hingga tercapai kesetimbangan konsentrasi antara kulit jeruk purut dengan pelarut, maka konsentrasi antioksidan yang terekstrak pun berada pada titik konstan (Gambar.1). Hal ini sesuai dengan hukum Fick II yang menyatakan bahwa difusi menyebabkan perubahan konsentrasi dalam kedua media, yang dalam hal ini adalah matriks kulit jeruk dan pelarut, seiring dengan berjalannya waktu hingga mencapai kondisi konstan dimana konsentrasi kedua media sudah sama dan tidak terjadi difusi lebih lanjut (12). Penambahan waktu ekstraksi di atas waktu optimum menyebabkan perolehan TPC menurun (Gambar.1 dan Gambar.2). Hal ini disebabkan dengan semakin lamanya waktu ekstraksi, maka kontak antara antioksidan dengan radikal bebas dari lingkungan akan semakin lama pula. Dalam hal ini, gangguan radikal bebas dapat disebabkan karena adanya cahaya dan oksigen.

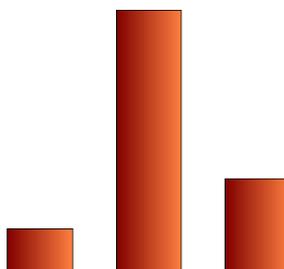
III.2. Pengaruh Polaritas Pelarut terhadap Ekstrak Kulit Jeruk Purut

Dari perolehan TPC dan TFC di atas (Gambar 1 dan Gambar 2) terlihat bahwa polaritas pelarut berpengaruh terhadap jumlah senyawa-senyawa antioksidan yang berdifusi dari matriks kulit jeruk ke dalam pelarut. Baik senyawa fenolik maupun senyawa flavonoid pada kulit jeruk purut dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut air, etanol, dan etil asetat. Sedangkan pelarut heksana sama sekali tidak mampu melarutkan sedikitpun senyawa-senyawa antioksidan dalam kulit jeruk purut. Kecenderungan tingkat perolehan TPC dan TFC berdasarkan polaritasnya adalah air > etanol > etil asetat > heksana, yang mana juga sesuai dengan urutan pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya yang dinyatakan dalam konstanta dielektrik (KD), yaitu air (KD=78,54) > etanol (KD=24,55) > etil asetat (KD=6,02) > heksana (KD=1,89). Hal ini dikarenakan dengan semakin besarnya polaritas pelarut, semakin mudah bagi pelarut tersebut untuk menembus jaringan-jaringan pada tumbuhan, dalam

hal ini kulit jeruk purut, dan mengekstrak berbagai macam senyawa yang ada (17, 18). Selain itu, perolehan ini juga mengindikasikan bahwa senyawa fenolik maupun flavonoid yang terdapat pada kulit jeruk purut cenderung bersifat polar dan semi polar.

III.3. Uji In-Vitro dengan Enzim α -amylase

Pengaruh polaritas pelarut terhadap % inhibition disajikan pada Gambar 3 berikut ini.



Gambar 3. Perolehan % inhibition enzim α -amylase dari ekstrak kering kulit jeruk purut yang diperoleh dari penggunaan berbagai pelarut

Pada Gambar.3 terlihat bahwa ekstrak kulit jeruk purut dengan pelarut air, etanol dan etil asetat menunjukkan aktivitas antidiabetes, yaitu menghambat kinerja enzim α -amylase dalam mengkonversi karbohidrat kompleks (amilum) menjadi glukosa. Tampak bahwa ekstrak kering kulit jeruk purut dengan pelarut etanol memberikan perolehan % inhibition yang paling besar (34,2%) diantara pelarut lainnya, yaitu air dan etil asetat dimana masing-masing memberikan hasil sebesar 12,3% dan 5,7%.

Terkait dengan perolehan TPC (Gambar 1) dan TFC (Gambar 2), diharapkan bahwa dengan semakin besar perolehan TPC dan TFC, maka semakin besar pula kemampuan ekstrak kulit jeruk purut dalam menghambat enzim α -amylase, akan tetapi dari hasil studi ini tidak semuanya menunjukkan kecenderungan tersebut. Contohnya, pelarut air memberikan perolehan TPC dan TFC yang paling tinggi diantara semua jenis pelarut yang digunakan tetapi % inhibition-nya paling kecil. Untuk pelarut etanol, perolehan TPC dan TFC-nya paling tinggi dan memberikan perolehan % inhibition yang paling tinggi seperti yang diharapkan. Sedangkan penggunaan pelarut etil asetat memberikan perolehan TPC dan TFC yang paling kecil namun memberikan %inhibition dua kali lipat lebih tinggi daripada pelarut air. Ketidakkonsistennya hal ini mungkin dapat dijelaskan oleh perbedaan senyawa-senyawa fenolik dan flavonoid yang dapat diekstrak berdasarkan polaritas masing-masing pelarut. Selain itu, metode pengeringan yang dilakukan untuk mendapatkan ekstrak kering juga dapat mempengaruhi kestabilan atau tingkat degradasi senyawa fenolik/flavonoid (19) yang dapat berakibat pada perbedaan hasil uji in-vitro.

IV. Kesimpulan

Antioksidan yang terdapat pada kulit jeruk purut cenderung bersifat polar dan semi-polar, dengan air sebagai pelarut yang mampu mengekstrak antioksidan dari kulit jeruk purut dengan perolehan tertinggi, yaitu TPC=29,3 mg GAE/g kulit jeruk dan TFC=14,9 mg RE/g kulit jeruk pada 18 jam. Meskipun demikian, senyawa antioksidan dari kulit jeruk purut yang terekstrak pada pelarut etanol menunjukkan aktivitas antidiabetes tertinggi yaitu sebesar 34,2%.

Daftar Pustaka

1. (WHO) WHO. *Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/IDF Consultation*. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2006.
2. (KEMENKESRI) KKRI. *Diabetes Melitus Penyebab Kematian Nomor 6 di Dunia: Kemenkes Tawarkan Solusi CERDIK Melalui Posbindu*. Indonesia: Departement Kesehatan Republik Indonesia; 2013.
3. Arulseivan P, Umamaheswari A, Fakurazi S. Therapeutic approaches for diabetes with natural antioxidants. *Research Signpost*. 2012;37/661(2):237-66.
4. Lanywati E. *Diabetes Mellitus, Penyakit Kencing Manis*. Yogyakarta: Kanisius; 2001.
5. Arya A, Nyamathulla S, Noordin MI, Mohd MA. Antioxidant and Hypoglycemic Activities of Leaf Extracts of Three Popular Terminalia Species. *E-Journal of Chemistry*. 2012;9(2):883-92.
6. Niedowicz DM, Daleke DL. The Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2005;43:290-330.
7. Osama M. Ahmed AMM, Adel Abdel-Moneim, Mohamed B. Ashour. Antidiabetic Effects of Hesperidin and Naringin in Type 2 Diabetic Rats. *Diabetologia Croatica* 2012;41-2:53-67.

8. Un Ju Jung M-KL, Kyu-Shik Jeong, Myung-Sook Choi. The Hypoglycemic Effects of Hesperidin and Naringin Are Partly Mediated by Hepatic Glucose-Regulating Enzymes in C57BL/KsJ-db/db Mice. *Journal of Nutrition*. 2004;134:2499-503.
9. David Hansi Priscilla DR, Aishwarya Suresh, Vinod Kumar, Kavitha Thirumurugan. Naringenin Inhibits α -glucosidase Activity: A Promising Strategy for The Regulation of Postprandial Hyperglycemia in High Fat Diet Fed Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Elsevier Chemico-Biological Interactions*. 2014;210:77-85.
10. R. R. Ortiz-Andrade JCSn-S, G. Navarrete-Vázquez, S. P. Webster, M. Binnie, S. Garcı́a-Jiménez, I. Leoń-Rivera, P. Cigarroa-Vázquez, R. Villalobos-Molina, S. Estrada-Soto. Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rat models and its implications on extra-pancreatic glucose regulation. *Journal Compilation Blackwell Publishing Ltd*. 2008.
11. Goyal SSPaRK. Cardioprotective effects of gallic acid in diabetes-induced myocardial dysfunction in rats. *Pharmacognosy Research*. 2011;3(4):239–45.
12. Chan SW, Lee CY, Yap CF, Wan Aida WM, Ho CW. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*. 2009;16.
13. Ghafar MFA, Prasad KN, Weng KK, Ismail A. Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *African Journal of Biotechnology*. 2009;9(3):326-30.
14. Jun Liu CW, Zuozhao Wang, Cheng Zhang, Shuang Lu, Jingbo Liu. The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chemistry*. 2011;Volume 126(Issue 1):261-9.
15. Megha G. Chaudhari BBJ, Kinnari N. Mistry. In Vitro Anti-Diabetic and Anti-Inflammatory Activity of Stem Bark of *Bauhinia Purpurea* *Bulletin of Pharmaceutical and Medical Sciences* 2013;1(2):139-50.
16. Nair SS, Kavrekar V, Mishra A. In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *Pelagia Research Library*. 2013;3(1):128-32.
17. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 2011;1(1):98-106.
18. Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*. 2009;14:2167-80.
19. M.K. Mohd Zainol AA-H, F.Abu Bakr, S. Pak Dek. Effect of different drying methods on the degradation of selected flavonoids in *Centella asiatica*. *International Food Research Journal*. 2009;16:531-27.