

EFEK ANTIOKSIDAN FRAKSI ETIL ASETAT MINUMAN SINOM CAMPURAN JERUK NIPIS DAN MADU (*curcuma domestica val-tamarindus indica L.*) TERHADAP GULA DARAH TIKUS PUTIH SPRAQUE DAWLEY DIABETES MELITUS

N. K. Wiradnyani^{1*}, I M. M. Arimathea²

¹Program S1 Ilmu Gizi, Universitas Dhyana Pura, Badung, Bali, Indonesia

²Program Studi Bioteknologi, Universitas Dhyana Pura, Badung, Bali, Indonesia

*e-mail: ani_mw@yahoo.com

ABSTRAK

Minuman *sinom* yang dicampur jeruk nipis dan madu terbuat dari rimpang kunyit dan daun asam muda yang ditambahkan air jeruk nipis dan madu. Tujuan penelitian adalah untuk menentukan efek senyawa antioksidan fraksi etil asetat minuman *sinom* campuran jeruk nipis dan madu (SCJM) berbagai dosis terhadap gula darah puasa tikus putih *sprague dawley* (SD) diabetes melitus. Penelitian eksperimental menggunakan RAK, analisis ANOVA dengan uji lanjut BNT ini terdiri dari dua tahap yaitu : 1) uji kapasitas antioksidan berbagai pelarut (SCJM) menghasilkan 29691,1 µg AAEAC/g bahan yaitu angka tertinggi fraksi etil asetat dari n-heksana, khloroform dan air. Tahap ke-2 fraksi etil asetat dari SCJM di uji lanjut secara *invivo* ke tikus putih SD diabetes melitus dengan perlakuan berbagai dosis yaitu : kontrol (-) tikus normal 50, 100, 150, 200 mg/dl BB, kontrol (+) tikus diabetes. Hasil penelitian efek senyawa antioksidan SCJM fraksi etil asetat berbagai dosis berpengaruh nyata ($p < 0,01$) pada penurunan gula darah puasa (GDP) tikus putih SD diabetes melitus, dosis yang dapat menurunkan GDP terendah berdasarkan uji statistik adalah 150 mg/kg BB tikus yaitu 168,4 mg/dl dari perlakuan dosis yang lain.

Kata Kunci: etilasetat, gula darah, antioksidan, *sinom*

ABSTRACT

Sinom drinks mixed with lime and honey are made from rhizome of turmeric and young tamarind leaves which are added with lime juice and honey. The aim of the study was to determine the effect of antioxidant compounds of ethyl acetate on *sinom* drinks mixed with lime juice and honey (SCJM) various doses on fasting blood sugar *sprague dawley* (SD) white rats diabetes mellitus. Experimental research using RAK, ANOVA analysis with further BNT testing consisted of two stages: 1) test the antioxidant capacity of various solvents of SCJM yielding 29691.1 µg AAEAC / g ingredients namely the highest number of ethyl acetate fractions of n-hexane, chloroform, and water. Phase 2 Ethyl acetate fraction of SCJM was further tested in vivo to SD white rats with diabetes mellitus with various doses, namely: control (-) normal mice, 50, 100, 150, 200 mg/dl BW, control (+) of diabetic rats. The results of the study of the effect of the antioxidant compound SCJM ethyl acetate fraction of various doses significantly affected ($p < 0.01$) in decreasing fasting blood sugar (GDP) white SD diabetes mellitus rats, a dose that can reduce the lowest GDP based on statistical tests is 150 mg/kg BW of rats, 168.4 mg/dl from other doses.

Keywords: ethylacetate, blood sugar, antioxidant, *sinom*

PENDAHULUAN

Kapasitas antioksidan minuman *sinom* (MS) pada fraksi air yaitu 199,100 µg AAEAC (*Ascorbic Acid Equivalent Antioksidan Capacity*) /gr bahan diketahui memiliki kapasitas antioksidan yang paling tinggi diantara fraksi n-heksana (42,800 µg AAEAC/gr bahan), kloroform (94,200 µg AAEAC/gr bahan), etil asetat (66,600 µg AAEAC/gr bahan) (Wiradnyani, 2018) dan

teruji dengan metode GCMS, diduga mengandung senyawa tumeron (49,84%), artumeron (21,32%), curlon (27,25%) dan 9-oktadekanoat (69,43%) (Wiradnyani, 2014). Fraksi etil asetat, khloroform dan n- heksana mengandung senyawa yang diduga seperti tumeron, artumeron dan curlon memiliki prosentase relatif lebih kecil dari fraksi air (Wiradnyani, 2014). Minuman *sinom* sudah banyak dirasakan oleh sebagian besar masyarakat untuk menyembuhkan berbagai

penyakit degenerative khususnya penyakit diabetes melitus dan dishmoria. Namun dalam penggunaannya biasanya ditambahkan air jeruk nipis dan madu. Penambahan air jeruk nipis dan madu memberikan aroma yang lebih segar dan harum, dapat juga mengurangi rasa pahit dari rasa kunyit, menambah nutrisi secara alami, selain dapat menghilangkan jerawat (Mumpuni, 2010). Penentuan kapasitas antioksidan minuman *sinom* campuran jeruk nipis dan madu SCJM fraksi etil asetat secara kuantitatif pada penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan dosis yang dapat menurunkan gula darah puasa terendah.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas bahan baku dan bahan kimia. Bahan baku yaitu rimpang kunyit yang diperoleh dari pasar tradisional Badung, Denpasar, Bali, daun asam yang masih muda dari pucuk daun sampai helai daun ke-tujuh dari daerah Buduk, Mengwi, Badung, Bali, air jeruk nipis, dan madu hutan dari daerah Sumba. Bahan kimia yang digunakan terdiri atas pelarut etil asetat, khloroform, n-heksana (PA merek Emsure Acs 215), kertas saring (Whatman no.1), asam askorbat, H₂SO₄, DPPH, methanol, Nicotinic acid, B2 vitamin powder, acetone NH₄OH, Indikator, Silika gel GF254 (Merck), 1gr Aloksan dosis 50 mg/dl BB tikus, 40 tikus putih SD dari Balai Veteriner Farmako Surabaya, aquades, air demineralisasi, formalin, asam sitrat, natrium sitrat, dan pakan tikus standar, buffer.

Alat

Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik, timbangan biasa, spektrofotometer merek Shimadzu UV-160, rotary vacum evaporator, corong pisah, aluminium foil, Erlenmeyer 250 ml, beaker glass 500 ml, tabung reaksi (Pyrex), kain saring, gelas ukur 100 ml, pipet volume, pipet tetes, pipet mikro, eksikator, labu takar, vortex, magnetic stirrer, *blood glucose test* meter (merk Nesco), botol gelap, *glucose stick* (merk

Nesco), 8 buah kandang tikus 35 x 35 cm, jarum sonde 2 cc.

Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Laboratorium Pengolahan Pangan dan Laboratorium Analisis Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Udayana, Laboratorium Kimia Forensik Polri Bali, Laboratorium bersama Univeritas Dhyana Pura.

Cara Kerja

Uji Kapasitas Antioksidan

Penelitian tahap ke-1; yaitu uji kapasitas antioksidan dilakukan dengan cara: penyiapan sampel rimpang kunyit yang diperoleh di pasar tradisional Badung, Denpasar, Bali dan daun asam yang masih muda dari pucuk daun sampai helai ketujuh dari daerah Jimbaran, kabupaten Badung, Provinsi Bali. Rimpang kunyit dikupas, ditimbang sebanyak 50 gram, dicuci, dihaluskan menggunakan *blender* dengan menambahkan 400 ml air selama 3,5 menit, disaring untuk mendapatkan filtrat, kemudian dipanaskan sampai mendidih selama 1 menit. Filtrat yang diperoleh lalu dicampur dengan filtrat daun asam muda yang sudah dicuci, diperoleh dengan cara menimbang seberat 250 gram daun asam muda, ditambahkan 300 ml air, kemudian dipanaskan dengan cara mendidihkan selama 1 menit. Setelah dingin setiap 100 ml ditambahkan 10 gram air jeruk nipis dan madu. Minuman SCJM selanjutnya dimasukan ke dalam botol kaca dan didinginkan sampai tidak ada uap panasnya, selanjutnya siap digunakan untuk pengujian.

Fraksinasi minuman SCJM dengan menggunakan etil asetat, yang dilakukan sebagai berikut: 100 ml minuman SCJM dimasukan ke dalam labu pisah yang telah dikeringkan dalam *oven* selama 15 menit pada suhu 100° C, selanjutnya ditambahkan etil asetat 100 ml, dikocok 10 kali dan didiamkan selama 30 menit. Fraksi etil asetat dievaporasi dengan suhu 45° C dan tekanan 280 mbar

untuk menghilangkan pelarut. Uji antioksidan fraksi minuman SCJM dilakukan berdasarkan penelitian (Winarsi, 2007) dengan rumus:

$$\frac{\text{Konsentrasi (ppm)} \times \text{Tv} \times \text{Fp} \times 1000.000}{\text{W sampel (mg)}} \quad (1)$$

Keterangan:

Tv = total volume (liter),

Fp = pengeceran,

Konsentrasi = hasil penghitungan kurva standar,

AAEAC = *Ascorbic Acid Equivalent Antioksidan Capacity*.

Penetapan dosis dan persiapan fraksi minuman SCJM adalah: dosis yang diberikan adalah dosis lazim konsumsi suplemen per hari pada manusia yang dikonversi dari manusia ke tikus. Perhitungan pemberian dosis berdasarkan pada "body surface area" (BSA) mengikuti penelitian yang dilakukan oleh Reagan-Shaw *et al* (2007). Rumus konversi dosis disajikan sebagai berikut :

$$\text{HED (mg/kg)} = \text{animal dose (mg/kg)} \times \frac{\text{animal Km}}{\text{human Km}} \quad (2)$$

diasumsikan suplemen antioksidan perhari pada manusia rata-rata sebesar 500 mg/60 kg BB, maka HED (*human equivalent dose*) (mg/kg) = 8,3. Apabila dikonversi ke tikus maka perhitungan menjadi :

$$8,3 \text{ mg/kg} = \text{animal dose (mg/kg BB)} \times \frac{6}{37}, \\ \text{animal dose} = 8,3 \times \frac{37}{6}, = 51,2 \text{ mg/kg BB} \quad (3)$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka dosis yang diberikan untuk tikus bervariasi dari 50, 100, 150 dan 200 mg /kg BB tikus. Fraksi etil asetat minuman SCJM sudah ditimbang beratnya sesuai dengan dosis yang akan diberikan pada tikus dilarutkan di dalam 2 ml aquades, kemudian dihomogenkan dengan vortek agar tercampur dengan merata. Pemberian fraksi etil asetat SCJM cara ini bertujuan untuk mempermudah pemberian pada tikus putih secara oral yang diberikan sesuai dengan masing-masing dosis fraksi setiap pagi pada jam 07.30 – 08.00 WIB.

Penentuan Dosis

Penelitian tahap ke-2 menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dilakukan secara *bioassay* menggunakan 20 ekor tikus putih SD dengan perlakuan dosis pemberian fraksi etil asetat minuman SCJM penelitian tahap ke-1 yang terdiri dari 5 taraf yaitu: tikus kontrol (-) diberikan fraksi etil asetat SCJM 0 mg/kg BB atau diberi aquades 2 ml/ekor, tikus kontrol positif (+) tikus diabetes tanpa pemberian SCJM, diberikan secara oral (disonde) fraksi etil asetat SCJM: (K1) dosis 50 mg/kg, (K2) dosis 100 mg/kg, (K3) dosis 150 mg/kg, (K4) dosis 200 mg/kg BB tikus, masing-masing ditambahkan 2 ml aquades, pemberian satu kali sehari pagi hari. Masing-masing ada 5 kelompok dan 4 ekor tikus sebagai ulangan. Pengukuran kadar gula darah diadakan pada tahap ini, setiap 3 hari sekali dari pengambilan data ke-0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 dan 21. Pemeriksaan gula darah dilakukan setiap jam 07.00-08.00 WITA, setelah dipuaskan selama 12 jam tetapi tetap diberi minum. Kadar gula darah diukur dengan alat *blood glucose test* meter Gluco Dr. Selanjutnya di analisis dengan menggunakan Anova 1 %, uji lanjut BNT.

Penentuan jumlah ulangan dan sampel: penelitian ini menggunakan 20 unit tikus jantan galur SD berumur dua bulan dengan berat badan 200 sampai dengan 250 gr, dari 20 ekor ini diambil masing-masing empat ekor untuk setiap taraf perlakuan sehingga jumlah ulangan adalah empat kali. Penggunaan jumlah sampel yang lebih besar pada penelitian ini untuk menghindari terjadinya kekurangan sampel sampai pada akhir penelitian yang diduga akibat kematian sampel.

ANALISIS DATA

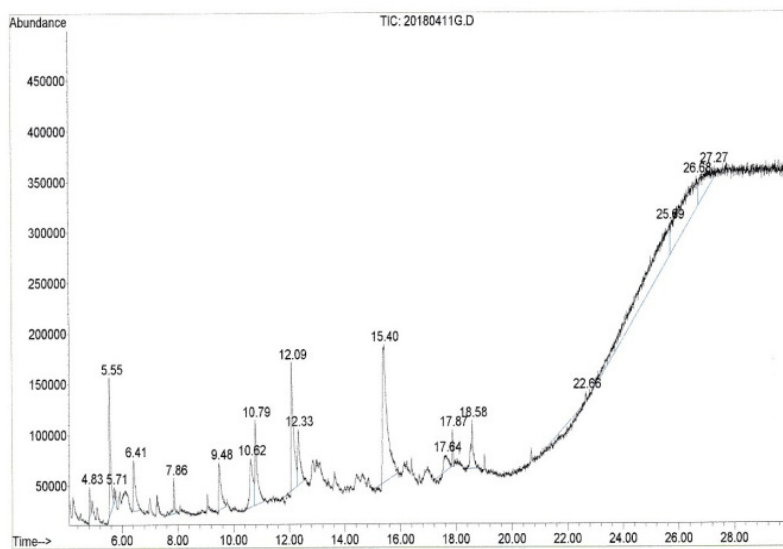
Uji kapasitas antioksidan dan rendemen fraksi minuman sinom campuran jeruk nipis dan madu dianalisis dengan menggunakan analisis varian (ANOVA). Apabila terdapat pengaruh yang bermakna (taraf 1%) maka analisis dilanjutkan dengan uji beda rerata antar perlakuan dengan uji perbandingan berganda Uji Beda Nyata terkecil (BNT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa yang diduga terkandung dalam minuman SCJM setelah difraksinasi dengan menggunakan berbagai pelarut telah diketahui bahwa kapasitas antioksidan tertinggi adalah minuman SCJM yang menggunakan pelarut

etil asetat. Minuman SCJM oleh GCMS terdeteksi 18 komponen senyawa penyusun seperti disajikan pada Gambar 1.

Senyawa mayor ini memiliki aktivitas biologis sebagai antikanker dan antidiabetes (Wiradnyani, 2019). Hasil GCMS dapat dilihat pada Tabel 1.

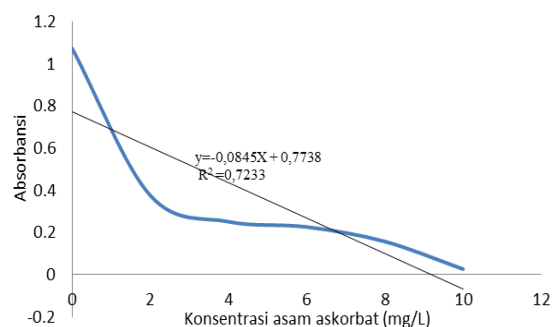


Gambar 1. Kromatogram GCMS Senyawa yang Terdapat pada Fraksi Etil Asetat Minuman SCJM

Tabel 1. Identifikasi dengan GCMS Fraksi Etil Asetat Minuman SCJM

No	RT	Area (%)	Nama Senyawa	Qual
1	4.83	0,56	1-Butanamine,N-methyl-N-nitro	53
2	5.54	4,95	L-Sorbose	40
3	5.71	0,32	3-Furaldehyde	38
4	6.41	2,95	Propylcarbamate	23
5	7.86	1,20	2,4 Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one	53
6	9.48	2,73	4,5-Diamino-2-hydroxypyrimidine	53
7	10.62	3,88	Propanal, 2,3-dihydroxy-,(S)-4H-Pyran-4-one,2,3-dihydro-3,5-dihydroxyl-6-methyl-	25
8	10.79	5,04		83
9	12.08	7,76	5-Hydroxymethylfurfural	87
10	12.33	3,28	3-Buten-2-one,4-(2-azido-1-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexyl) butanoic acid, 3 oxo-,hexyl ester	10
11	15.4	16,7	Pivalaldehyde	18
12	17.64	0,81	Epicurzerenone	58
13	17.86	1,05	N,N'-Dimethyl-1,4-butanediamine	27
14	18.58	4,03	Cyclotrisiloxane,hexamethyl	49
15	22,67	17,90	Naphtho{2,1-}furan,dodecahydro-6,9a-dimethyl-, {3aS-3a.alpha.,5a.alpha.,6.alpha.,9a.beta.,9b.alpha.)}	49
16	25.69	27,31	4-(4-Hydroxyphenyl)-4-methyl-2-pentanone	43
17	26.68	2,62	Tumerone	38
18	27.27	5,58	Arsenous acid,tris (trimethylsilyl) ester	49

Uji Kapasitas Antioksidan dimulai dengan penentuan standar asam askorbat atau vitamin C dalam mereduksi radikal bebas DPPH(1,1-difenil-2-pikrilhidra-zil) 0,1 mM dapat dilihat pada Gambar 2 yaitu kurva kalibrasi asam askorbat standar hubungan kapasitas antioksidan (mg/l) fraksinasi dengan pelarut etil asetat ekstrak minuman SCJM.



Gambar 2. Kurva Kalibrasi Asam Askorbat Standar

Hasil Kapasitas Antioksidan Rata-Rata Minuman SCJM

Tabel 2. Hasil Pengujian Kapasitas Antioksidan ($\mu\text{g AAEAC/g}$ bahan) Perlakuan Berbagai Pelarut Minuman SCJM

Pelarut	Kapasitas Antioksidan ($\mu\text{g AAEAC/g}$ bahan)
n-Heksan	16551.1 ^{ac} \pm 4,688
Cloroform	23819.1 ^{bc} \pm 4,688
Etil Asetat	29691.1 ^d \pm 4,688
Air	18089.7 ^{de} \pm 4,688

Notasi huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan pada $p < 0,05$ (BNT).

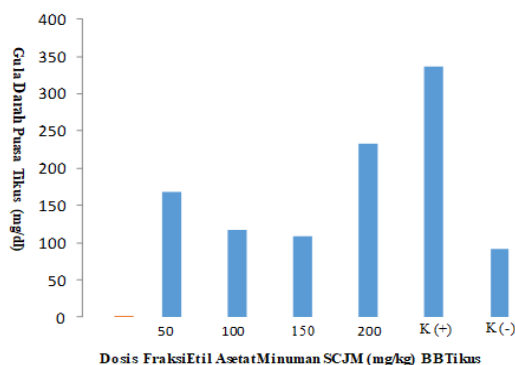
Kapasitas antioksidan minuman SCJM hasil fraksi dengan perlakuan berbagai jenis pelarut dari hasil penelitian dicantumkan pada Tabel 2. Besarnya kapasitas antioksidan fraksi etil asetat memiliki nilai tertinggi yaitu 2969,1 $\mu\text{g AAEAC/g}$ bahan, dibandingkan n-heksan (16551,1 $\mu\text{g AAEAC/g}$), kloroform (23819,1 $\mu\text{g AAEAC/g}$) dan air (18089,7 $\mu\text{g AAEAC/g}$).

Hal ini disebabkan oleh kemampuan senyawa bioaktif yang ada di dalam minuman SCJM sangat sesuai dengan sifat-sifat pelarut etil asetat sehingga sifat semi-polar pelarut etil

asetat dimiliki juga oleh senyawa bioaktif minuman SCJM yang mampu mengkelat radikal bebas pada DPPH, penelitian ini sesuai dengan analisis senyawa antioksidan fraksi etil asetat daun Libo (*Ficus Variegata Blume*) yang diteliti oleh Novitasari (2016).

Rata-Rata Gula Darah Puasa (GDP) Tikus Putih SD Diabetes Berbagai Dosis Fraksi Etil Asetat Minuman SCJM

Berdasarkan uji statistik, analisis keragaman menunjukkan bahwa senyawa antioksidan pada perlakuan berbagai dosis 50, 100, 150, 200 mg/kg BB tikus, fraksi etil asetat minuman SCJM pada tikus SD diabetes melitus berpengaruh nyata ($p < 0,01$) terhadap GDP tikus.



Gambar 3. Grafik rerata berbagai dosis Fraksi Etil Asetat (MSJM) terhadap GDP tikus DM

Gambar 3 menjelaskan bahwa GDP tikus terbaik adalah yang diberikan dosis 150 mg/kg karena memberikan nilai terendah (168,4 mg/dl), berbeda nyata dari perlakuan dosis yang lainnya. Glutathione reduktase memperbaiki fungsi mitokondria sangat dibutuhkan untuk membuat flavin mononukleotida (FMN) dan flavin adenine dinukleotida (FAD). Antioksidan seperti ini lebih baik (sinergisme) kemampuannya mengkelat radikal bebas ada pada sel β karena induksi Streptozotzin (Setyo, 2012).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Perlakuan berbagai dosis pemberian fraksi minuman SCJM berpengaruh nyata ($p < 0,01$) terhadap GDP tikus putih SD diabetes melitus

2. Kapasitas antioksidan tertinggi SCJM berbagai pelarut adalah fraksi etil asetat (29691,1 (μg AAEAC/g bahan)
3. Dosis terbaik yang dapat menurunkan GDP terendah berdasarkan uji lanjut BNT adalah 150 mg/kg BB dapat menurunkan GDP 168,4 mg/dl.
4. Fraksi etil asetat minuman SCJM digunakan untuk menurunkan GDP

Saran

Penelitian ini sebaiknya di lanjutkan melakukan uji penurunan gula darah puasa pada manusia.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kemenristek Dikti yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Emiwati, 2007. Efek Konsumsi Minuman Bubuk Kakao Bebas Lemak terhadap Sifat Antioksidan dan Proliferative Limfosit Manusia. *Disertasi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Erwin, E., Etriwati, E., Muttaqin, M., Pangesttiningsih, T.W., Widyarini, S. 2013, Ekspresi Insulin pada Pankreas Mencit (*Musculus*) yang Diinduksi dengan Streptozotocin Berulang, *J Kedokteran Hewan*. 7(2): 97-100.
- Purbaya, J. R. 2002. Mengenal & Memanfaatkan Khasiat Madu alami. Bandung: Pionir Jaya.
- Kumalaningsih, S. 2006. Antioksidan Alami. Surabaya: Trubus Agrisarana.
- Lukita-Atmadja W., Ito, Y., Baker, G.L., McCuskey, R.S. 2002. Effect of curcuminoids as anti-inflammatory agents on the hepatic microvascular response to endotoxin. *SHOCK*, 17 (5): 399-403.
- Mumpuni, Y.A., Wulandari. 2010. Cara Jitu Mengatasi Jerawat, Yogyakarta: Andi.
- Novitasari, M. R, Febrina, L., Agustina, R., Rahmadani, A., Rusli, R. 2016. Analisis GCMS Senyawa Aktif Antioksidan Fraksi etil asetat Daun Libo (*Ficus variegata Blume*), *Jurnal Sains dan kesehatan*. 1(5): 221- 225.
- Razak, A., Djamal, A., Revilla, G. 2013. Artikel Penelitian Uji Daya Hambat Air Perasan Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* s.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus* Secara In Vitro, *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2(1): 58.
- Shaw- Reagan, S., Nihal, M., Ahmad, N. 2007. Dose Translation from Animal to Human Studies Revisited. *The FASEB Journal*. 22: 659-661.
- Setyo, P. D. H. 2012. Pengaruh Fraksi Etil Asetat Buah Labu Siam (*Sechium edule* (Jacq.) SW.) Terhadap Regenerasi Sel β Pankreas pada Tikus Diabetes yang Diinduksi Aloksan. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Yayasan Pharmasi Semarang .STIFAR. Semarang
- Winarsi. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Wiradnyani, N. K., Wartini, N. M., Harsojuono, B. A. 2014. Komposisi Senyawa Antioksidan Minuman Sinom (*Curcuma domestica* Val - *Tamarindus Indica* L.), *Scientific Journal of Food Technology*, 1(1):10-23.
- Wiradnyani, N. K., 2018. Kapasitas Antioksidan Minuman Sinom. *Proceeding Sintesa Undhira*, 1(6): 381-389.