

Pengaruh Ekstrak Kulit Buah *Citrus aurantifolia* Swingle terhadap Kontraksi Trakea Marmot Terisolasi yang Diinduksi Histamin *in vitro* - penelitian pendahuluan

R. Irawan

Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan
Departemen Kesehatan RI, Jakarta

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian farmakodinamik terhadap ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle yang dipadukan dengan aspek fitokimia. Dalam uji farmakodinamik, untuk melihat salah satu efek penghambatan kontraksi trakea marmot terisolasi yang diinduksi histamin secara *in vitro*, maka reseptor-reseptor yang mempunyai aksi antagonis perlu diblok dengan propranolol 10^{-6} M dan simetidin 10^{-5} M. Senyawa aktif yang dapat menghambat, pada identifikasi dengan spektroskopi ultraviolet menggunakan pereaksi diagnostik, adalah flavanon.

PENDAHULUAN

Citrus aurantifolia Swingle atau yang dikenal masyarakat dengan nama jeruk nipis merupakan tumbuhan obat dari familia *Rutaceae*^(1,2,3). Dalam pengobatan tradisional digunakan antara lain sebagai peluruh dahak dan obat batuk⁽⁴⁾.

Telah dilakukan penelitian yang menunjukkan adanya senyawa flavanon di dalam kulit buah *Citrus sp*⁽⁵⁻⁸⁾. Peneliti Jepang, melaporkan bahwa *Citrus aurantifolia* Swingle memperlihatkan efek anti alergi⁽⁹⁾.

Dalam penelitian ini telah diisolasi dan diidentifikasi senyawa flavonoid golongan flavanon dengan cara KLT, KLT Bidimensional (dua dimensi) dan KLT Preparatif. Uji farmakodinamik terhadap isolat menggunakan trakea marmot terisolasi yang diinduksi histamin secara *in vitro* dan identifikasi komponen berkhasiat dengan cara spektroskopi-ultra-violet.

Tanaman *Citrus aurantifolia* Swingle mempunyai beberapa nama daerah dan nama Latin. Beberapa nama daerah tersebut, di antaranya : jeruk nipis (Sunda), jeruk pecel (jawa), liman kapus, liman nipis (Sumatera) dan lebih dikenal dengan nama jeruk nipis (Indonesia)^(3,16). Sementara, nama Latin yang sering dipergunakan, di antaranya : *Citrus medica* Linn; *Citrus*

acida Roxb., Brands.; *Citrus limonulus* Miq.; *Lemo tenuis* Rumph dan *Citrus aurantifolia* Swingle⁽²⁾. Adapun sistematikanya seperti berikut ini: Divisio : *Spermatophyta*, Subdivisio : *Angiospermae*, Classis : *Dicotyledonae*, Ordo : *Rutaceae*, Familia : *Citrus*, Genus: *Citrus medica* Linn; *Citrus acida* Roxb Brandis.; *Citrus tenuis* Rumph.; *Citrus aurantifolia* Swingle^(1,2).

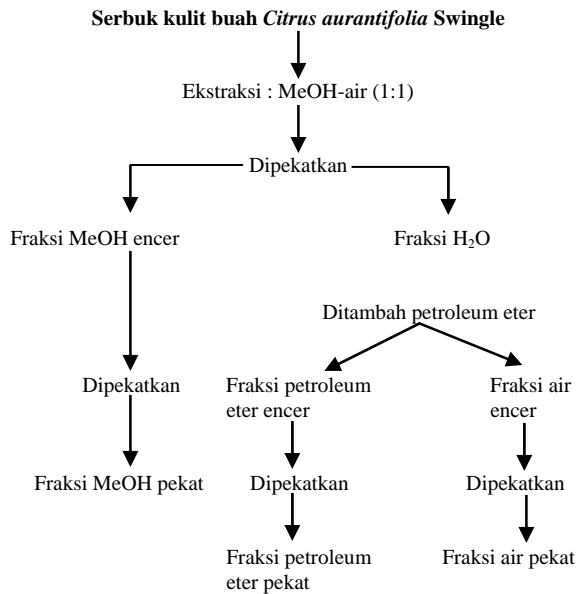
METODOLOGI

Penelitian ini mencakup aspek fitokimia yang dilanjutkan dengan aspek farmakodinamik terhadap *Citrus aurantifolia* Swingle.

1) Aspek Fitokimia

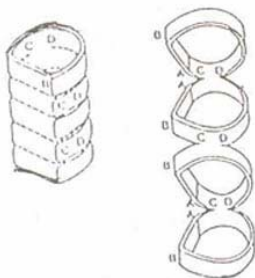
Kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle yang kering dihancurkan dan dihaluskan kemudian diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol-air (1:1). Ekstrak yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan penguap-putar bertekanan rendah sampai diperoleh fraksi metanol dan air. Dilanjutkan pengawaleman menggunakan petroleum eter (40° - 60° C), kemudian dilakukan penguapan kembali menggunakan penguap-putar (evaporator) bertekanan rendah agar

diperoleh fraksi petroleum eter dan air. Selanjutnya pada fraksi yang mengandung flavanoid dilakukan uji farmakodinamik pendahuluan. Terhadap isolat flavonoid yang dapat menghambat efek kontraksi trakea marmot terisolasi setelah diinduksi histamin *in vitro* dilakukan identifikasi dengan menggunakan spektroskopi-UV. Rangkaian keseluruhan dari proses tersebut secara skematis dapat dilihat pada bagan berikut :



2) Aspek Farmakodinamik

Pembuatan preparat trakea menggunakan metode Timmermann dan Scheffer⁽¹⁰⁾. Marmot dibunuh dengan cara memukul bagian belakang dekat kepala, kemudian trakea dikeluarkan dan difiksasi dalam cawan petri yang telah berisi larutan Krebs normal serta dialiri gas karbogen dengan suhu 37°C. Trakea dibersihkan dari jaringan-jaringan lain yang masih melekat di sekelilingnya, kemudian dipotong-potong melalui segmen-segmen tulang rawan dengan arah berlawanan sedemikian rupa sehingga membentuk rangkaian cincin trakea, (Gambar 1).



Gambar 1. Diagram skema pemotongan trakea marmot.
A - B : Otot polos trakea
C - D : Bagian trakea yang tidak terpotong

Selanjutnya salah satu ujung rantai trakea difiksasi di dasar *organ-bath* volume 20 ml dan ujung yang lain dihubung-

kan dengan transduser. Kemudian dilakukan ekuilibrisasi selama 20 menit dan dilanjutkan dengan percobaan-percobaan sebagai berikut

1. Trakea diinduksi histamin dengan langkah $\frac{1}{2}$ log 10 mulai kadar 10^{-8} M sampai diperoleh efek maksimum.
2. Trakea diinduksi histamin dengan praperlakuan propranolol 10^{-6} M dan simetidin 10^{-5} M yang digunakan sebagai kurva baku.
3. Trakea diinduksi histamin dengan praperlakuan propranolol 10^{-6} M dan simetidin 10^{-5} M serta perlakuan ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle dengan berat x mg sebagai uji farmakodinamik pendahuluan.
4. Dilakukan percobaan seperti pada butir 3 di atas, tetapi berat ekstrak diperbesar menjadi 2x atau 3x berat semula.

Analisis data dilakukan secara farmakodinamis, yaitu hasil penghambatan efek kontraksi histamin dari trakea marmot terisolasi karena perlakuan ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle yang mengandung senyawa flavonoid dibandingkan dengan kurva baku histamin, sehingga diperoleh persen efek kontraksi dari ekstrak tersebut, dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Efek kontraksi} = \frac{a}{b} \times 100\%$$

a = kontraksi dari masing-masing kadar histamin

b = kontraksi maksimum untuk kurva baku histamin

Efek kontraksi trakea setelah penambahan histamin (H) yang tercatat pada recorder, terlihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Hasil rekaman kontraksi trakea setelah penambahan histamin (H)

Secara keseluruhan rangkaian proses tersebut dapat dilihat pada **skema 1**.

BAHAN DAN ALAT

1) Bahan

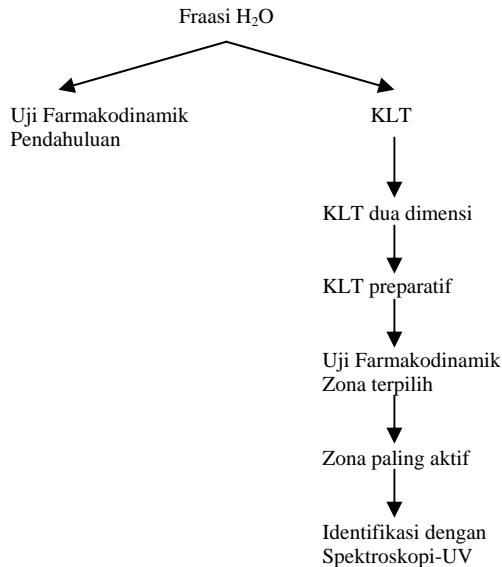
Hewan uji marmot dengan berat badan 400 - 600 g dan kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle.

Bahan uji farmakodinamik : DL-propranolol, simetidin (semua dari Sigma Chemical) dan gas karbogen (campuran antara 5% CO₂ dan 95 O₂) dari PT. Aneka Gas dan Industri, Semarang.

Larutan Krebs normal : natrium klorida, kalium klorida,

magnesium sulfat, kalsium klorida dihidrat, glukosa monohidrat, natrium hidrogen karbonat, natrium dihidrogen fosfat monohidrat, natrium hidrogen karbonat, natrium dihidrogen fosfat monohidrat (semua berkualitas “pro analisis” E. Merck).

Skema 1



Bahan ekstraksi : metanol, petroleum eter (keduanya berkualitas “pro analisis” (E. Merck), serta air kualitas ultrafiltrasi NANOpure-II dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Dasar, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.

Bahan KLT dan KLT Preparatif : fase diam selulosa dan fase gerak asam asetat 15% (semuanya berkualitas E. Merck).

Bahan KLT dua dimensi : fase diam selulosa, fase gerak I. t-butanol-asam asetat-air (3:1:1) serta fase gerak II. Asam asetat 15%.

Bahan pereaksi diagnostik spektroskopi-UV : natrium hidroksida 2,5% b/v dalam metanol, aluminium klorida 5% b/v dalam metanol, asam klorida 0,5 N, serta asam borat anhidrat, natrium asetat anhidrat, metanol p.a. (semua berkualitas E. Merck).

2) Alat

Satu set peralatan operasi (gunting, pinset, jarum fiksasi, skalpel, cawan petri, benang steril).

Alat uji farmakodinamik : “organ-bath” volume 20 ml, thermostat (GDR., Fed. Rep. of Germany), thermomik type (B. Brown, Fed. Rep. of Germany), isotonik lever transducer type 368 (HSE, Fed. Rep. of Germany), pemanas type M 22/1 (Framo-Gerato Technik, Fed. Rep. of Germany), vortex mixer (CAT. M. Zippear GmbH, Etszenbach, Fed. Rep. of Germany), dispenser pippete type 15415 (Gilson, France), recorder (Kipp & Zonen BD41, the Netherlands).

Alat ekstraksi dan KLT : evaporator (Buchi, Switzerland), bejana pengembang (Desaga, Japan), lampu-UV (Desaga, Japan), seperangkat perlatan KLT (Desaga, Japan).

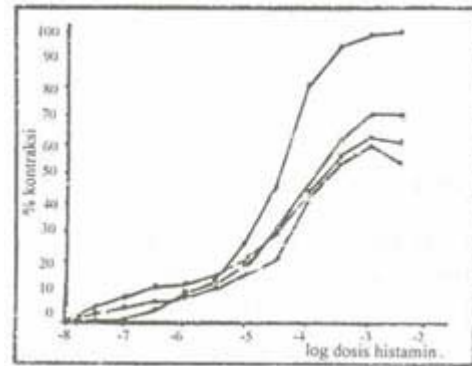
Alat identifikasi : Spektrofotometer UV/VIS type 150-20 Double-beam (Hitachi, Japan).

HASIL

Hasil uji ,farmakodinamik pendahuluan ternyata menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle dapat menghambat efek kontraksi trakea marmot terisolasi yang diinduksi histamin secara *in vitro*. Hal ini terlihat dari adanya pengurangan efek kontraksi maksimum, berturut-turut 28,61%, 37,60%, 43,99% (Tabel 1, Gambar 3).

Tabel 1. Pengurangan kontraksi maksimum dan pergeseran kurva akibat induksi histamin setelah penambahan ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle.

Jumlah ekstrak yang ditambahkan (mg)	Pergeseran kurva ke kanan	Pengurangan efek kontraksi maksimum (%)
0,90	0,18	28,61
4,50	0,02	37,60
9,00	0,23	43,99



- = kurva baku histamin (n = 4)
- o = 0,90 mg ekstrak (n = 4)
- x = 0,90 mg ekstrak (n = 4)
- ◆ = 9,00 mg ekstrak (n = 4)

Gambar 3. Kurva hubungan antara log dosis (histamin) vs % efek (kontraksi) dengan perlakuan ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle.

Berdasarkan hasil uji farmakodinamik pendahuluan tersebut, maka dilakukan sokletasi terhadap serbuk kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle dengan menggunakan pelarut metanol-air (1:1) serta dilakukan pengawaleman dengan menggunakan petroleum eter. Dari pemeriksaan terhadap fraksi air, petroleum eter dan fraksi metanol, ternyata pada fraksi air lebih cenderung memberi indikasi adanya senyawa metanol, ternyata pada fraksi air lebih cenderung memberi indikasi adanya senyawa flavonoid, sedang pada fraksi petroleum eter dan metanol tidak demikian.

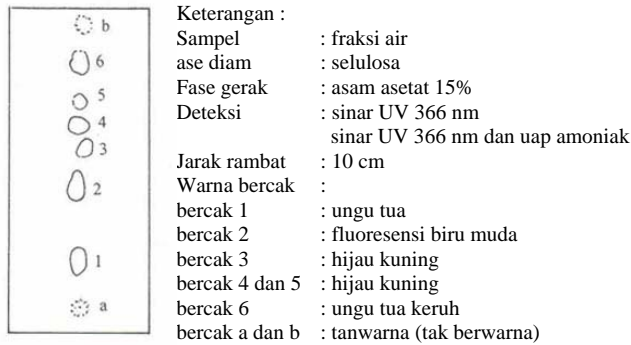
Pada deteksi dengan menggunakan sinar UV 366 nm fraksi petroleum eter dan air berupa cairan taanwarna (tak berwarna atau jernih), demikian juga pada deteksinya dengan sinar UV 366 nm yang diberi uap amoniak. Sedang pada fraksi air pada deteksi sinar UV 366 nm memberi warna kuning kecoklatan dan pada deteksi menggunakan sinar UV 366 nm yang disertai uap amoniak memberi warna coklat tua.

Dalam keadaan demikian berarti senyawa yang terdapat

di dalam fraksi air berupa glikosida.

Selanjutnya pada fraksi air dilakukan pemisahan melalui KLT yang ternyata pada uji Ease diam dan Ease gerak yang terpilih adalah selulosa dan asam asetat 15% dengan memberikan enam bercak yang mempunyai warna-warna jelas dan dua bercak yang tanwarna. Keenam bercak berwarna tersebut terpisah secara baik dan jelas pada deteksi menggunakan sinar UV 366 nm yang diberi uap amoniak (**Gambar 4**).

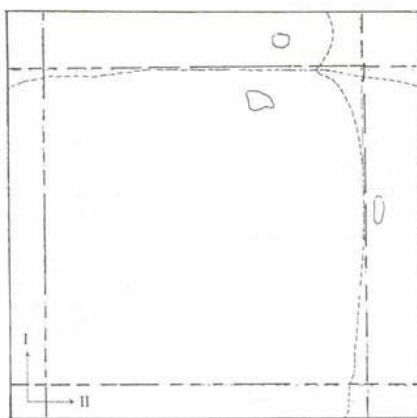
Hasil kromatografi lapis tipis fraksi air.



Gambar 4. Kromatografi lapis tipis fraksi air.

Pengujian selanjutnya menggunakan KLT dua dimensi dengan fase diam selulosa, fase gerak I TBA (t-butanol-asam asetat-air 3:1:1 v/v) dan fase gerak II asam asetat 15% dengan pembanding rutin. Hasil menunjukkan bahwa pada fraksi air diidentifikasi adanya senyawa flavonoid. Pada deteksi dengan sinar UV 366 nm maupun sinar UV/nm dengan diberi uap amoniak berwarna fluoresensi ungu terang serta harga Rf 0,81 (TBA) dan 0,61 (HOAc 15%) (**Gambar 5**).

Hasil kromatografi lapis tipis dua dimensi fraksi air.



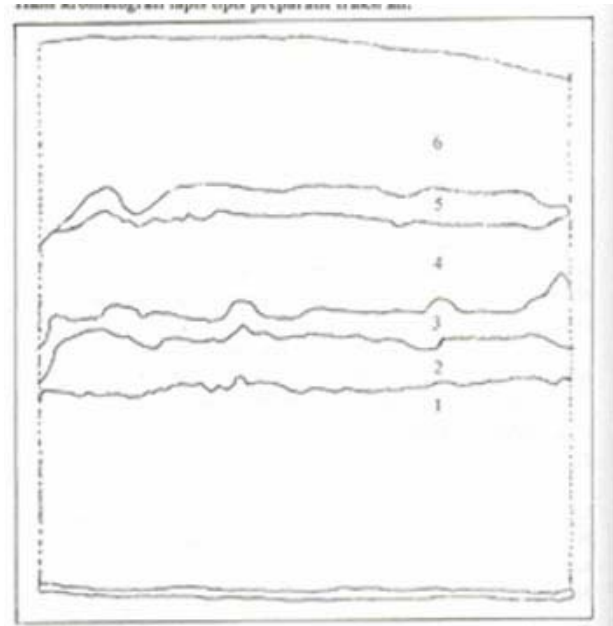
Gambar 5. Kromatogram lapis tipis dua dimensi air dengan fase diam selulosa dan fase gerak I. TBAA, fase gerak II. HOAc 15%.

Keterangan :

- Deteksi : sinar UV 366 nm
- : sinar UV 366 nm dengan uap NH3
- Warna : fluoresensi ungu terang
- Harga Rf : 0,81 (TBA); 0,61 (HOAc 15%)
- Pembanding : rutin
- Ukuran lempeng : 20 x 20 cm²
- Tebal fase diam : 0,25 mm

Pemisahan dan pengujian selanjutnya dengan melalui KLT preparatif; sebagai fase diam selulosa dan fase gerak asam asetat 15% yang merupakan fase-fase terpilih pada penelitian ini. Hasil menunjukkan adanya enam zone (daerah) yang terpisah dan berwarna ungu tua pada zone 2 berwarna fluoresensi biru muda, zone 3 berwarna ungu fluoresensi, zone 4 dan 5 berwarna hijau kuning dan zone 6 berwarna ungu tua yang keruh, seperti yang terlihat pada **Gambar 6**.

Hasil kromatografi lapis tipis preparatif fraksi air.



Gambar 6. Kromatogram lapis tipis preparatif fraksi air dengan fase diam selulosa dan fase gerak I. TBA, fase gerak II. HOAc 15%.

Keterangan :

- Deteksi : sinar UV 366 nm
- : sinar UV 366 nm dengan uap NH3
- Warna zona :
- Zona 1 : ungu tua
- Zona 2 : fluoresensi biru muda
- Zona 3 : ungu fluoresensi
- Zona 4 dan 5 : hijau kuning
- Zona 6 : ungu tua keruh

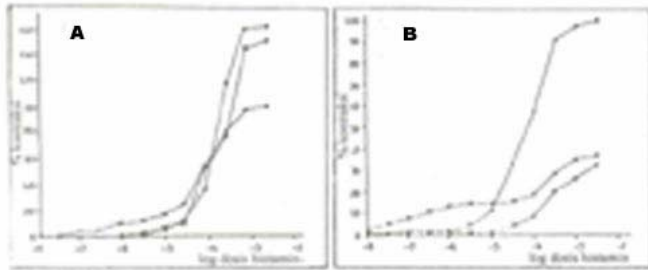
Untuk mengetahui zona-zona yang aktif dalam menghambat efek kontraksi trakea karena diinduksi histamin, maka dilakukan uji farmakodinamik lanjutan. Hasil seperti terlihat pada **Tabel 2** dan **Gambar 7a, 7b** dan **7c**.

Dari data dapat dibaca bahwa pada zona 2, 3, 4, 5 dan zona 6 kesemuanya dapat menghambat efek kontraksi marmot terisolir setelah diinduksi histamin, sedang untuk zona 1 memberi efek potensiasi (memperkuat kontraksi).

Analisis selanjutnya yang lebih diutamakan adalah zona 2 dan zona 3 karena keduanya mempunyai kemampuan untuk mengurangi efek kontraksi (dalam %) yang cukup besar apabila dibandingkan dengan zona lainnya (**Tabel 2**). Hasil uji farmakodinamik lanjut untuk zona 2 berturut-turut adalah 34,15%, 36,68% dan 39,24% sedang untuk zona 3 berturut-turut adalah 67,51%, 70,21% dan 74,68% seperti terlihat pada **Tabel 3**.

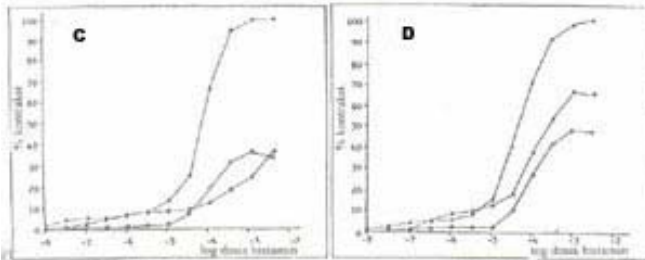
Tabel 2. Pengurangan kontraksi maksimum dan pergeseran kurva akibat induksi histamin setelah penambahan tiap-tiap zona hasil KLT preparatif.

Jumlah zona yang ditambahkan (mg) (n = 4)	Pergeseran kurva ke kanan	Pengurangan efek kontraksi maksimum (%)
Zona 1 : 9,49	0,22	-61,34
18,98	0,57	-50,18
Zona 2 : 6,09	-0,23	62,34
12,19	0,42	66,34
Zona 3 : 36,30	0,70	64,09
72,60	0,77	65,66
Zona 4 : 0,81	0,17	34,23
8,06	0,19	52,49
Zona 5 : 3,87	0,40	36,85
7,74	0,43	36,92
Zona 6 : 56,82	-0,27	47,07
113,65	3,38	57,34



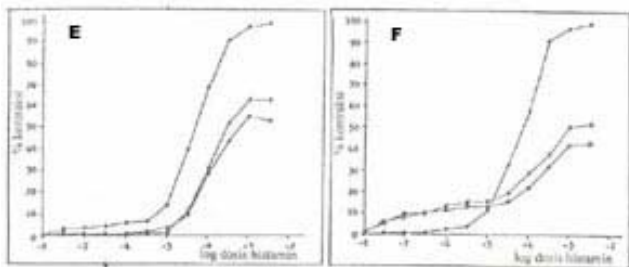
- = kurva baku histamin (n=4)
- = 9,49 mg zona 1 (n=4)
- x = 18,98 mg zona 1 (n=4)
- = kurva baku histamin (n=4)
- x = 6,09 mg zona 2 (n=4)
- = 12,19 mg zona 2 (n=4)

Gambar 7a. Kurva hubungan antara log dosis (histamin) vs % efek (kontraksi) dengan Perlakuan : (A) Zona 1; (B) Zona 2.



- = kurva baku histamin (n=4)
- x = 36,30 mg zona 3 (n=4)
- = 72,60 mg zona 3 (n=4)
- = kurva baku histamin (n=4)
- x = 0,81 mg zona 4 (n=4)
- = 8,06 mg zona 4 (n=4)

Gambar 7b. Kurva hubungan antara log dosis (histamin) vs. % efek (kontraksi) dengan Perlakuan : (C) Zona 3; (D) Zona 4.



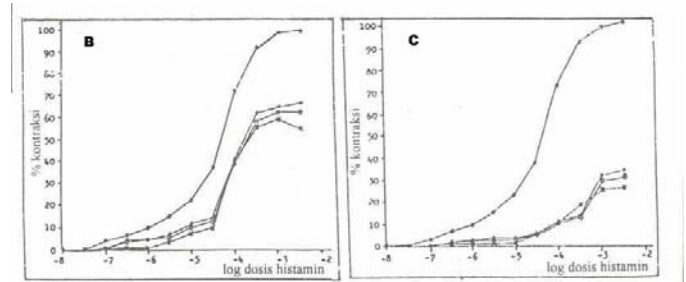
- = kurva baku histamin (n=4)
- x = 3,87 mg zona 5 (n=4)
- = 7,74 mg zona 5 (n=4)
- = kurva baku histamin (n=4)
- x = 56,82 mg zona 6 (n=4)
- = 113,65 mg zona 6 (n=4)

Gambar 7c. Kurva hubungan antara log dosis (histamin) vs % efek (kontraksi) dengan Perlakuan : (E) Zona 5; (F) Zona 6.

Tabel 3. Pengurangan kontraksi maksimum dan pergeseran kurva akibat induksi histamin setelah penambahan zona 2 dan 3 hasil KLT preparatif.

Jumlah zona yang ditambahkan (mg) (n 4)	Pergeseran kurva ke kanan	Pengurangan efek kontraksi maksimum (%)
Zona 2 : 0,61	0,12	34,15
1,23	0,15	36,68
2,46	0,19	39,24
Zona 3 : 3,63	0,90	67,51
7,26	0,93	70,21
14,52	0,98	74,68

Ternyata pada zona 3 mengandung komponen yang lebih aktif dalam menghambat kontraksi trakea marmot terisolasi apabila dibandingkan dengan zona 2, seperti terlihat pada **Tabel 3** dan **Gambar 8**. Atas dasar ini maka dilakukan analisis kandungan aktif yang terkandung dalam zona 3 dengan menggunakan spektroskopi-UV. Hasil analisis seperti pada **Tabel 4** dan **Gambar 9**.



- = kurva baku histamin (n=4)
- ◆ = 0,61 mg zona 2 (n=4)
- = 1,23 mg zona 2 (n=4)
- x = 2,46 mg zona 2 (n=4)
- = kurva baku histamin (n=4)
- ◆ = 3,63 mg zona 3 (n=4)
- = 7,26 mg zona 3 (n=4)
- x = 14,52 mg zona 3 (n=4)

Gambar 8. Kurva hubungan antara log dosis (histamin) vs % efek (kontraksi) dengan perlakuan : (B) Zona 2; (C) Zona 3.

Tabel 4. Panjang gelombang (λ) zona 3 yang diperoleh dari hasil KLT preparatif fraksi air.

Pereaksi diagnostik	Panjang gelombang maksimum (nm) pita		Selisih Panjang gelombang (nm) pita		Petunjuk penafsiran
	I	II	I	II	
MeOH	275	-	-	-	Flavon atau dihidroflavonol
NaOH	275	-	-	0	Tanpa OH bebas pada cincin A, flavanon atau dihidroflavonol tanpa 5,7-OH atau mungkin tanpa 7-OH, flavanon dengan 5-OH
AlCl ₃	275	-	-	0	Tanpa 5-OH pada cincin A
AlCl ₃ /HCl	275	-	-	0	Tanpa o-diOH pada cincin B dan tanpa o-diOH pada cincin A (6,7 atau 7,8)
NaOAc	275 324 ^{sh}	-	0	-	Tanpa o-diOH 3'4' pada cincin B
NaOAc/H ₃ BO ₃	275 324 ^{sh}	-	-	0	Tanpa o-diOH pada cincin A (6,7 atau 7,8)

Keterangan :
sh = 'shoulder' = bahu = infleksi
zona 3 = isolat flavonoid

DISKUSI

Pada preparat trakea marmot terdapat reseptor-reseptor yang apabila dirangsang aksinya saling antagonis, reseptor-reseptor tersebut secara garis besar dibagi menjadi dua golongan, yaitu yang dapat merelaksasi dan mengkontraksi trakea. Reseptor yang dapat mengkontraksi adalah reseptor histaminik H_1 , adrenergik alfa dan kolinergik, sedang yang dapat merelaksasi trakea adalah reseptor adrenergik β_1 , β_2 , histaminik- H_2 , dan prostaglandin E (prostaglandin seri E)⁽¹¹⁾. Untuk dapat melihat salah satu efek penghambatan dari ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle terhadap kontraksi trakea yang disebabkan oleh reseptor histaminik- H_1 , maka reseptor adrenergik β_1 , dan β_2 perlu dihambat dengan propranolol 10^{-6} M sedang reseptor histaminik- H_2 perlu dihambat dengan simetidin 10^{-5} M; dengan demikian diharapkan kerja ekstrak tersebut terhadap penghambatan kontraksi trakea akan melalui reseptor histaminik- H_1 .

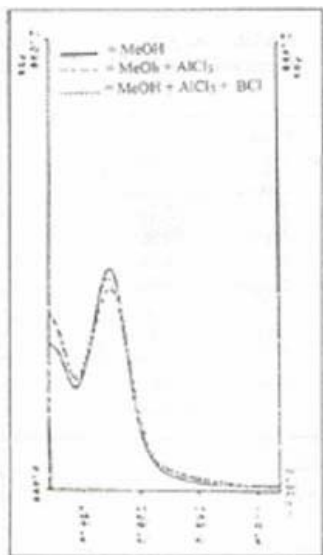
Untuk mengetahui komponen aktif dari zona 3 yang mampu menghambat kontraksi trakea marmot terisolasi setelah diinduksi histamin secara *in vitro* maka dilakukan analisis dengan menggunakan spektroskopi-UV yang hasilnya dapat dijelaskan sebagai berikut.

Bentuk spektra isolat (zona 3) dalam MeOH, ternyata pada pita II mempunyai rentang serapan maksimum di antara 250-300 nm yang puncak serapan maksimumnya adalah 275 nm, sedang pada pita I tidak menunjukkan adanya puncak serapan maksimum sama sekali. Bentuk spektra yang demikian dimiliki oleh senyawa flavonoid golongan isoflavan, dihidroflavonol dan flavanon. Hal ini karena ketiganya

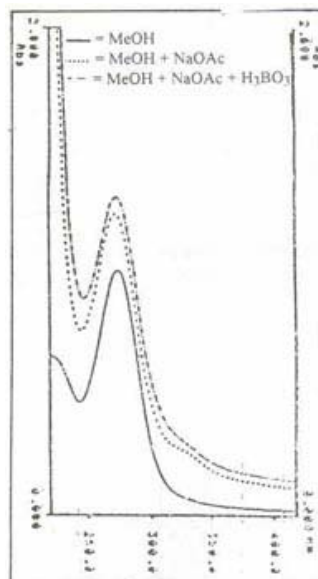
Hasil analisis spektroskopi zona 3 (isolat) yang diperoleh dari kromatografi lapis tipis preparatif fraksi air



Gb.16a. Spektrum UV dalam MeOH dan MeOH+ NaOH



Gb. 16b. Spektrum UV dalam MeOH dalam MeOH + AlCl₃ dan MeOH + AlCl₃ + BCl



Gb. 16c. Spektra UV dalam MeOH dalam MeOH + NaOAc dan MeOH + NaOAc + HgBO₃

Gambar 9. Hasil analisis spektrum ultraviolet isolat (zona 3) hasil KLT preparatif fraksi air.

mempunyai bentuk spektrum yang serupa, yaitu pada pita II mempunyai bentuk spektrum dengan intensitas serapan yang sangat kuat, sedang pada pita I mempunyai intensitas serapan yang lemah atau hanya berupa *shoulder* saja⁽¹²⁾. Selanjutnya, rentang serapan maksimum isolat terletak di antara 245-270 nm, sedang rentang serapan maksimum dihidroflavonol dan flavanon terletak di antara 270-290 nm pada pita II dan tidak mempunyai serapan sama sekali pada pita I⁽¹²⁾. Hal ini karena, baik pada dihidroflavonol maupun flavanon keduanya tidak mempunyai ikatan rangkap di antara atom C₂ dan C₃, sedang perbedaannya terletak pada atom C₃, yaitu pada flavanon atom C₃ mengikat kedua atom H sedang pada dihidroflavonol atom C₃ mengikat satu atom H dan satu gugus OH. Adanya perbedaan pada atom C₃ ini menyebabkan adanya perbedaan yang relatif kecil terhadap bentuk spektrumnya. Atas dasar ini maka dapat diasumsikan bahwa isolat flavonoid tersebut mengandung dihidroflavonol serta flavanon, dan bukan isoflavanon.

Pada penambahan NaOH yang merupakan basa kuat, ternyata pada isolat flavonoid tidak mengalami perubahan bentuk spektra baik pada pita II maupun pita I. Selanjutnya, pita II dalam MeOH (275 nm) dan pita II dalam NaOH (275 nm), ternyata tidak mengalami pergeseran sama sekali. Atas dasar ini maka dapat diasumsikan bahwa pada isolat tidak mempunyai gugus OH pada cincin A dan mungkin pula merupakan senyawa flavonoid golongan dihidroflavonol atau flavanon yang tanpa 5,7-OH atau mungkin tanpa 7-OH dan mungkin juga merupakan flavanon dengan gugus 5-OH. Dengan tidak terjadinya perubahan bentuk spektrum pada pita I maka dapat diasumsikan bahwa pada isolat flavonoid tidak mempunyai gugus o-diOH pada posisi 3',4' dari cincin B.

Penambahan AlCl₃, ternyata juga tidak mengubah per-

geseran pada pita II, sehingga dapat diasumsikan bahwa pada isolat flavonoid tidak mempunyai gugus 5-OH pada cincin A.

Penambahan HCl ke dalam isolat flavonoid yang telah berisi $AlCl_3$, ternyata juga tidak menyebabkan pergeseran sama sekali. Atas dasar ini maka pada isolat flavonoid dapat diasumsikan tidak mempunyai gugus o-diOH pada cincin A ($C_{6,7}$ atau $C_{7,8}$) dari pita II.

Pengaruh NaOAc ternyata dengan membandingkan bentuk spektrum pada pita II dalam MeOH dengan pita II NaOAc yang keduanya mempunyai puncak serapan maksimum yang sama yaitu 275 nm. Hal ini berarti juga tidak mengalami pergeseran sama sekali dan hanya menunjukkan adanya *shoulder* yang lemah sekali dengan panjang gelombang 334^{sh} nm pada pita I. Atas dasar ini maka dapat diasumsikan bahwa isolat flavonoid tidak mempunyai gugus 7-OH bebas pada cincin A.

Penambahan H_3BO_3 ke dalam isolat flavonoid yang telah berisi NaOAc, ternyata juga tidak menyebabkan adanya pergeseran sama sekali dan hanya menunjukkan adanya *shoulder* yang lemah sekali dengan panjang gelombang 334^{sh} nm pada pita I. Selanjutnya, dengan membandingkan pita I dalam MeOH (275 nm) dengan pita I dalam NaOAc/ H_3BO_3 (275 nm) ternyata juga tidak mengalami pergeseran sama sekali. Atas dasar ini maka isolat flavonoid tersebut dapat diasumsikan tidak mempunyai gugus o-diOH pada cincin A ($C_{6,7}$ atau $C_{7,8}$).

Atas dasar serangkaian analisis spektrum ultraviolet terhadap komponen aktif yang terkandung di dalam isolat flavonoid untuk selanjutnya lebih menjurus ke arah adanya senyawa flavonoid ini golongan flavanon. Kecenderungan tersebut tidak didasari atas alasan-alasan berikut di bawah ini.

Alasan pertama, dengan memperhatikan data spektrum ultraviolet tersebut telah diperoleh kenyataan yang menunjukkan adanya puncak serapan maksimum 175 nm pada pita II sementara tidak menunjukkan puncak serapan maksimum sama sekali atau hanya berupa *shoulder* dengan intensitas serapan yang sangat lemah pada pita I (**Gambar 9**), sehingga pada asumsinya lebih mengarah pada adanya flavanon. Hal ini sesuai dengan pernyataan Mabry *et al.*⁽¹²⁾ bahwa rentang serapan maksimum dari flavanon terletak di antara 270-295 nm pada pita II. Bahkan menurut Harbone⁽¹³⁾ panjang gelombang maksimum utama flavanon mempunyai rentang serapan maksimum pada 275-278 nm pada pita II, sedang pada pita I berupa *shoulder* atau merupakan puncak serapan yang sangat lemah sekali intensitasnya pada panjang gelombang di atas 300 nm.

Alasan kedua, pada umumnya senyawa flavonoid banyak tersebar pada tanaman, akan tetapi untuk flavanon tidak demikian⁽¹⁴⁾. Karena merupakan golongan '*flavonoid minor*' yang berarti flavonoid dengan pola penyebaran terbatas. Namun demikian, meskipun terdapat dalam jumlah terbatas ternyata flavanon lebih banyak tertumpuk di dalam kulit buah *Citrus sp.*^(5,8) dan merupakan senyawa pahit yang mudah larut di dalam air berupa glikosida dan sedikit sekali yang berupa aglikon⁽¹³⁾.

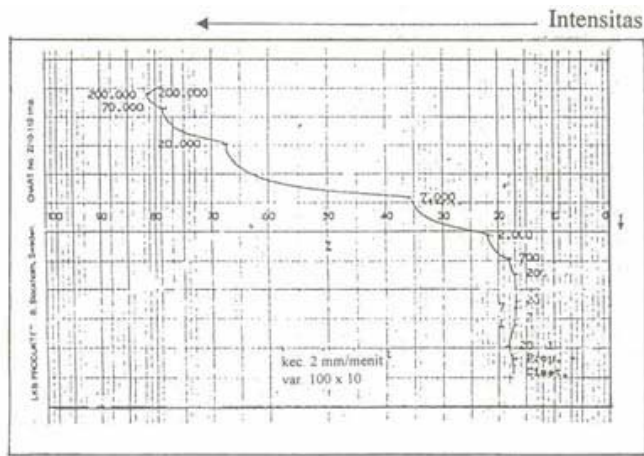
Alasan ketiga, pada penyebaran senyawa flavonoid secara taksonomi dalam tanaman menunjukkan adanya kecenderungan yang kuat dan berhubungan sangat erat⁽¹⁵⁾. Artinya, dalam

dunia tumbuhan yang secara taksonomi mempunyai hubungan erat maka akan menghasilkan senyawa flavonoid pada tumbuhan lain yang sistematikanya sama. Sistematika untuk tumbuhan *Citrus aurantifolia* Swingle akan sama dengan sistematika tumbuhan *Citrus sp.* pada umumnya, yang kesemuanya termasuk divisio *Spermatophyta*, subdivisio *Angiospermae*, familia *Rutaceae* serta genus *Citrus*^(1,2,8,12,13,15,17). Hal ini serupa dengan pernyataan dari Geissman⁽¹⁸⁾, senyawa flavanon golongan flavanon selain terdapat di dalam kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle maka terdapat juga di dalam kulit buah *Citrus nobilis*, penelitian yang sama telah menemukan pula adanya senyawa flavonoid golongan flavanon pada kulit buah *Citrus sp* yang lain^(7,8,9).

Mekanisme ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle yang dapat menghambat efek kontraksi trakea marmot terisolasi yang diinduksi histamin secara *in vitro* dapat melalui beberapa kemungkinan, yang antara lain seperti dijelaskan berikut ini.

Kemungkinan pertama, antagonis yang terkandung di dalam kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle dan agonis (histamin) berikatan dengan reseptor yang sama, sehingga terjadi antagonisme kompetitif, untuk dapat menimbulkan efek yang sama maka agonis berikatan dengan reseptor yang sama. Selanjutnya untuk menimbulkan efek maka agonis harus berinteraksi dengan reseptornya dan efek maksimum diperoleh apabila semua reseptornya diduduki agonis. Dengan adanya antagonis maka agonis untuk dapat memperoleh efek yang sama memerlukan dosis yang lebih besar sehingga kurva bergeser ke kanan (**Gambar 7a** dan **8**), akan tetapi dalam kurva tersebut ditunjukkan juga bahwa dengan memperbesar dosis antagonis maka akan memperkecil efek agonis. Hal ini ditunjukkan dengan terjadinya pengurangan efek kontraksi maksimum dan pengurangan efek ini tidak bisa diatasi dengan memperbesar dosis agonis (histamin), keadaan yang demikian mencirikan terjadinya antagonis non-kompetitif. Atas dasar ini maka kerja dari antagonis yang terkandung di dalam kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle dan agonis (histamin) melalui perpaduan antara antagonisme kompetitif dan non-kompetitif.

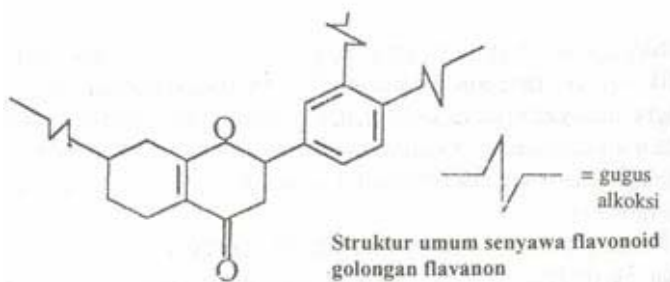
Kemungkinan kedua, oleh karena di dalam trakea marmot reseptor prostaglandin E yang mempunyai aksi meningkatkan kadar siklik-adenosin mono fosfat (c-AMP) sehingga menyebabkan relaksasi yang dalam kerjanya berhubungan dengan reseptor adrenergik beta, maka dengan naiknya kadar siklik-AMP akan dapat menghambat produksi histamin lebih lanjut^(18,19,20). Produksi dan pelepasan histamin terjadi karena adanya degranulasi mastosit (*mast-cells*)⁽²⁰⁾. Aksi dari reseptor prostaglandin E yang demikian ini terlihat pada waktu trakea terisolasi tersebut sebelum diinduksi dengan histamin terlebih dahulu diberi ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle sehingga terjadi relaksasi (**Gambar 10**). Namun demikian perlu diketahui bahwa prostaglandin E mempunyai waktu paruh yang pendek⁽²¹⁾, sehingga kemungkinan terjadi interaksi antara prostaglandin E dengan reseptornya sangat kecil sekali. Jadi dapat diperkirakan bahwa efek pengurangan kontraksi trakea melalui prostaglandin E tersebut relatif kecil sekali sehingga dapat diabaikan.



Gambar 10. Hasil rekaman relaksasi trakea terisolasi yang disebabkan oleh reseptor prostaglandin E setelah penambahan ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle.

KESIMPULAN

- 1) Kontraksi trakea marmot terisolasi yang diinduksi histamin dapat dihambat oleh ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle secara *in vitro*.
- 2) Kontraksi trakea marmot terisolasi yang diinduksi histamin dapat dihambat oleh fraksi air dari ekstrak kulit buah *Citrus aurantifolia* Swingle.
- 3) Hasil KLT preparatif fraksi air dengan menggunakan fase diam selulosa dan fase gerak HOAc 15% menunjukkan enam buah zona.
- 4) Dari keenam zona tersebut, ternyata zona 3 paling aktif dalam menghambat kontraksi trakea marmot terisolasi yang diinduksi histamin secara *in vitro*.
- 5) Senyawa yang terkandung di dalam zona 3 (isolat) merupakan senyawa flavonoid golongan flavanon atau turunannya dengan struktur umum sebagai berikut :



SARAN

- 1) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme efek penghambatan kontraksi trakea marmot, terisolasi yang diinduksi histamin secara *in vitro* dengan adanya senyawa aktif yang terkandung di dalam zona 3 hasil KLT fraksi air.
- 2) Perlu dilakukan elusidasi struktur lebih lanjut terhadap zona 3.

KEPUSTAKAAN

1. Pulle A.A. Compendium van der Terminologie Nomenclatuur en Systematiek der Zaadplanten, N.V.A. Oosthoek's Uitg. Mij., Utrecht, 1952.
2. Sastroamidjojo S. Obat Asli Indonesia, Dian Rakjat, Djakarta, 1952.
3. Anonim, Indeks Tumbuh-tumbuhan di Indonesia, P.T. Eisal, Jakarta, 1986.
4. Anonim, Tanaman Obat Indonesia, Jilid I, Dep. Kes. R.I., Jakarta, 1985.
5. Harborne J.B. Phytochemical Methods, Chapman and Hall, London, 1973; p. 52-9.
6. Trease Evans, Pharmacognosy, Bailliere Tindall, 11th ed., London 1978; p. 409.
7. Amell M. Inhibitor of Mast-cell Histamine Release by Flavonoids and Biflavonoids, *Planta Medica* 1985; 16-9.
8. Middleton E. The Flavonoids, *Trends in Pharmacological Sciences* 1984; (August.): 335-8.
9. Sankawa U. Antiallergic Substances from Chinese Medical Plants, *Internati Symp on Chinese Medical Materials Research*, Hongkong, 1984; p. 29.
10. Timmerman H, Sceffer N.G. A New Tracheal Strip Preparation for the Evaluation of Beta-adrenergic Activity, *Pharm J.*, 1968; 20 : 78-9.
11. Soepono S. Aspek Neurofisiologik Asma Bronkial, *Simposium RSUP DR. Sardjito*, Yogyakarta, 1985.
12. Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Verlag, Berlin, New York, 1970; p. 165-74.
13. Harborne J.B. *Metode Fitokimia*, Edisi II. ITB, Bandung, 1987.
14. Horowitz W. *Official Methods of Analysis of The Association of Official Agricultural Chemists*, AOAC, Washington DC. 1865; p. 341.
15. Markham K.R. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, (Terjemahan), ITB, Bandung 1988, hal. 1-53.
16. Sugeng. *Tanaman Apotik Hidup (Jamu-jamu Tradisional)*, C.V Aneka Ilmu, Semarang, 1984, hal. 89-90.
17. Geissman. *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, Dept. of Chemistry, University of California, Los Angeles, The Macmillan Company, New York.
18. Kuzemko J.A. *Asthma pada Anak*, Yayasan Essentia Medica, Jakarta, 1972, p. 11-3.
19. Frick O.L. Fundenberg, Stites D.P. Cadwell J.L. Well eds. *Immediate Hypersensitivity, Basic and Clinical Immunology*, 3rd ed., Los Altos, California; Lange Medi p. 274-95.
20. Crofton S.J. Douglas A. *Respiratory Disease*, 3rd ed., Blacwell Scient Publ, Osney, Mead, Oxford, 1983; p. 278-508.
21. Burgen A.S.V. Mitchell J.R. *Gaddum's Pharmacology*, Oxford University Oxford, 3rd ed., 1983.

Everything is as you take it