

# **FORTIFIKASI EKSTRAK KULIT JERUK BALI PADA SUSU TINGGI KALSIUM: TEROBOSAN BARU DALAM PENGATASAN OSTEOPOROSIS PADA WANITA MENOPAUSE, TERUJI IN VIVO DAN *MOLECULAR DOCKING***

**Ragil Setia Dianingati<sup>1)</sup>, Annisa Novarina<sup>2)</sup>, Amanita Khoiril Hana<sup>3)</sup>, Laeli Muntafi'ah<sup>4)</sup>**

<sup>1,2,3,4)</sup>Program studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

Email: <sup>1</sup>[dianingati.ragil@gmail.com](mailto:dianingati.ragil@gmail.com); <sup>2</sup>[nisanovarina@gmail.com](mailto:nisanovarina@gmail.com); <sup>3</sup>[amanita.hana@gmail.com](mailto:amanita.hana@gmail.com); <sup>4</sup>[laelimuntafiah@gmail.com](mailto:laelimuntafiah@gmail.com)

## ***Abstract***

*Osteoporosis has one of the cause is lack of estrogen hormone. Commonly prevention therapy is by consuming high calcium milk, but it is not effective. Bali orange's peel (Citrus maxima Merr.) is a waste material but contains phytoestrogen according to previous study. Considering of this result, fortification of high calcium milk and bali orange's peel is expected to be an effective solution for osteoporosis in menopause woman. This research began with extraction of bali orange's peel (BPE) in ethanol 70% by using maceration method. Ovariectomized Sprague dawley female rats are the model of post menopausal woman were treated by BPE for 28 days. The doses of BPE was given to rats 500 and 1000 mg/Kg BW combined with high calcium milk. Bone density was determined using digital microradiography, the profile showed the increase of bone density in group that treated with combination of BPE 1000 mg/Kg BW and high calcium milk compare to control and given only milk groups. Docking molecular showed that BPE active compound which are hesperidin and naringin could have interaction with estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . Overall, the result of this research showed that fortification of BPE with high calcium milk has good prospect to develop as effective therapy of osteoporosis.*

**Keywords:** *Citrus maxima, phytoestrogen, osteoporosis, high calcium milk, estrogen receptor*

## 1. PENDAHULUAN

Osteoporosis atau tulang keropos merupakan suatu keadaan yang ditandai dengan adanya pengurangan dalam massa jaringan tulang per unit volume, sehingga tulang menjadi tipis, lebih rapuh dan mengandung sedikit kalsium (Liliana, 2000). Di Asia seperti dilaporkan oleh WHO dalam Sankaran (2000), patah tulang yang disebabkan oleh osteoporosis akan mengalami peningkatan yaitu dari 84.000 orang pada tahun 1986 menjadi 6,26 juta orang pada tahun 2050, dan 71% patah tulang akan terjadi di negara berkembang. Satu dari delapan laki-laki dan satu dari dua wanita akan terkena osteoporosis dalam hidupnya, sehingga kejadian osteoporosis tertinggi terjadi pada wanita. Tingginya kejadian osteoporosis pada wanita menyebabkan kondisi ini menjadi masalah kesehatan masyarakat.

Risiko osteoporosis pada wanita meningkat pada masa menopause. Menopause merupakan proses alamiah yang akan dialami setiap wanita. Pada fase ini terjadi penurunan fungsi indung telur dalam memproduksi estrogen, yang mengakibatkan berbagai gangguan fungsi fisiologis seperti osteoporosis (Kenny *et al.*, 2000). Penurunan produksi hormon estrogen akan diikuti dengan meningkatnya kalsium yang terbuang dari tubuh seorang wanita (Perry and O'Hanlan, 2003). Hal ini secara berangsur akan menyebabkan penurunan kepadatan tulang sehingga tulang menjadi tipis, lebih rapuh, mengandung sedikit kalsium dan akhirnya menjadi keropos (Muirden, 1994).

Penanganan osteoporosis yang dialami wanita menopause selama ini dengan mengkonsumsi susu tinggi kalsium dan suplemen kalsium. Pada wanita menopause yang mengkonsumsi suplemen kalsium, kekurangan kalsium menurun tetapi tetap saja osteoporosis terjadi (Nordin, 2009). Data dari survei gizi menunjukkan bahwa 30-40% perempuan usia menopause di Indonesia meminum susu, tetapi dari penelitian yang lain ternyata masih dijumpai tingginya prevalensi osteoporosis pada perempuan usia menopause (Arifin, 2010). Hal ini diperkirakan karena penyebab osteoporosis pada wanita menopause belum teratasi dengan baik.

Osteoporosis bukan hanya disebabkan karena kurangnya konsumsi kalsium tapi juga karena adanya penurunan produksi estrogen. Salah satu terapi yang dilakukan untuk mencegah defisiensi estrogen adalah dengan substitusi estrogen endogenik senyawa alam yang relatif lebih aman dalam bentuk fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan senyawa kimia non steroid pada tumbuhan yang memiliki aktivitas estrogenik (Yildiz, 2005). Kulit buah jeruk bali (*Citrus maxima*), yang selama ini tidak dimanfaatkan, mengandung senyawa flavonoid yaitu naringin dan hesperidin yang telah terbukti sebagai fitoestrogen (Choi *et al.*, 2007). Ekstrak kulit jeruk bali (EJB) memiliki efek estrogenik dalam meningkatkan densitas tulang, memodulasi kolesterol darah, meningkatkan proliferasi sel payudara dan meningkatkan bobot uterus (CCRC *unpublished data*, 2011). Produk susu tinggi kalsium telah lazim dikonsumsi untuk mengatasi osteoporosis. Oleh karena itu ekstrak kulit jeruk bali difortifikasikan pada susu tinggi kalsium. Fortifikasi adalah penambahan zat gizi yang diperoleh atau sengaja ditambahkan dari luar dan bukan berasal dari bahan pangan asli tersebut dengan kriteria untuk masing-masing penambahan zat gizi tertentu yang berbeda (BPOM, 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui interaksi antara fitoestrogen yang terkandung dalam kulit jeruk bali dengan reseptor estrogen menggunakan metode *molecular docking* yang kemudian menjadi dasar untuk pengujian *in vivo* untuk mengetahui efek yang ditimbulkan oleh kombinasi susu tinggi kalsium dengan ekstrak kulit jeruk bali terhadap tikus *Sprague Dawley* betina terovariektomi. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar dalam memformulasikan susu tinggi kalsium dengan ekstrak kulit jeruk bali, dan dapat menyelesaikan masalah osteoporosis pada wanita menopause.

## 2. METODE PENELITIAN

**Tempat dan waktu pelaksanaan.** Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Cancer Chemoprevention Research Center, Laboratorium Teknologi dan Formulasi, serta Laboratorium Bagian Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada pada bulan Februari hingga Juni 2013.

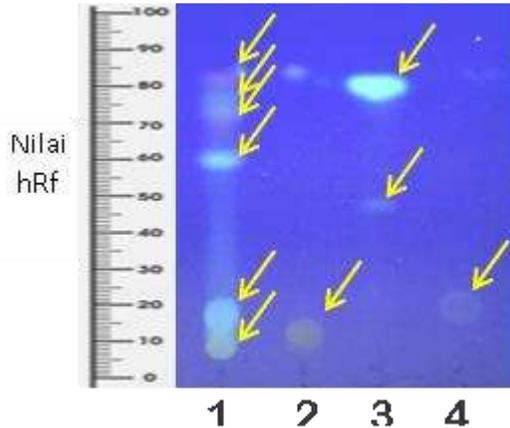




Dari profil bercak dapat diketahui jenis kepolaran dan golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Dari data Retention factor (Rf) dapat diketahui kepolaran dari senyawa yang terkandung dalam EJB.

Selain itu, dapat diketahui golongan senyawa yang terkandung melalui perubahan warna setelah dilakukan reaksi semprot menggunakan  $\text{AlCl}_3$ .

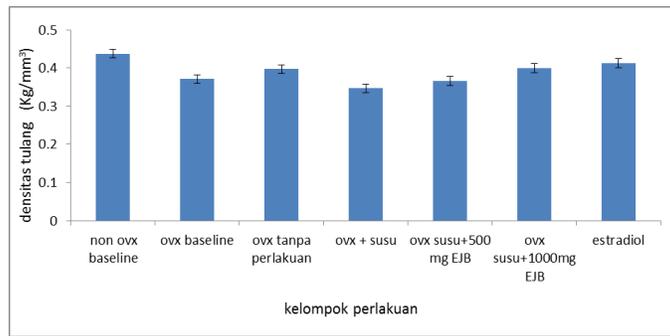
**Gambar 1.** Desain Perlakuan



**Gambar 2. Profil KLT Ekstrak etanolik kulit jeruk bali.** Menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak etil asetat:metanol:asam formiat (95:5:0,5% v/v/v). (1) EJB; (2) Rutin; (3) Naringenin; (4) Hesperidin. Diketahui terdapat bercak pada hasil elusi EJB yang memiliki Rf yang sama dengan ketiga senyawa pembanding namun dengan intensitas yang berbeda. Senyawa dominan yang terkandung dalam EJB yaitu hesperidin. Setelah dilakukan reaksi semprot menggunakan  $\text{AlCl}_3$  dan diamati pada UV 366 nm terlihat beberapa bercak yang berfluoresensi hijau kuning yang menandakan senyawa flavonoid.

Menurut Wagner et al. (1984) karakter senyawa golongan flavonoid ditandai dengan adanya fluoresen hijau kuning di bawah UV 366 nm. Sehingga dapat diketahui bahwa senyawa yang terkandung dalam EJB merupakan golongan flavonoid. Berdasarkan profil KLT yang didapat dapat disimpulkan bahwa senyawa flavonoid yang telah teridentifikasi dalam EJB yaitu rutin, naringin, dan hesperidin. Hal ini dapat dilihat melalui kesamaan jarak Rf masing – masing bercak dan warna fluoresen yang mirip setelah diamati di bawah UV 366 nm.

**Efektivitas Penambahan EJB pada Susu Tinggi Kalsium terhadap Peningkatan Densitas Tulang Tikus Terovarietomi.** Hewan uji diovariectomi dengan tujuan agar hewan uji mengalami defisiensi estrogen dan tidak menerima asupan estrogen selain dari EJB maupun estradiol. Hal tersebut dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui efek estrogenik EJB dalam meningkatkan kepadatan tulang. Profil densitas tulang masing-masing kelompok dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3. Profil densitas tulang vemur tikus pada tiap kelompok perlakuan.** Nilai menunjukkan rata-rata+SD. Profil densitas tulang kelompok perlakuan tidak berbeda signifikan ( $P < 0.05$ ) berdasarkan uji ANOVA dilanjutkan dengan *Uji Tuckey*. Namun demikian, ada kecenderungan kenaikan densitas tulang pada perlakuan susu dan EJB dosis 1000 mg/kg BB jika dibandingkan dengan kontrol tanpa perlakuan dan kelompok yang diberi susu saja.

Densitas tulang pada kelompok baseline OVX menurun dibanding baseline Non OVX hal ini menunjukkan bahwa operasi ovariektomi telah berjalan dengan baik. Berdasarkan uji statistik yang dilakukan diketahui bahwa profil densitas tulang kelompok perlakuan tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol, baik perlakuan estradiol maupun perlakuan EJB. Namun ada kecenderungan peningkatan densitas tulang dari kelompok yang diberi perlakuan kombinasi susu dengan EJB dosis tinggi jika dibandingkan dengan kontrol susu. Hal ini menunjukkan bahwa EJB berpotensi meningkatkan efektivitas susu dalam meningkatkan densitas tulang.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kombinasi susu tinggi kalsium dengan EJB secara umum berpotensi meningkatkan densitas tulang tikus terovariektomi. Pada keadaan defisiensi estrogen, kalsium yang ada dalam tubuh tidak dapat secara optimal memperbaiki kepadatan tulang. Hal ini diakibatkan tidak seimbangannya kerja sel pembentuk dan perombak tulang. Kekurangan estrogen menyebabkan aktivitas perombakan tulang lebih tinggi. Dengan penambahan EJB yang bersifat estrogenik dapat mengoptimalkan dalam

menjaga kepadatan tulang. Mekanisme ini diperantarai oleh penghambatan aktivitas osteoklas melalui osteoprotegerin (OPG).

**Interaksi Reseptor Estrogen  $\alpha$  dan  $\beta$  terhadap Kandungan Flavonoid Ekstrak Kulit Jeruk Bali melalui Molecular Docking.** Docking dilakukan untuk memprediksi kemampuan senyawa aktif (ligan) untuk berinteraksi dengan reseptor estrogen ( $ER\alpha$  dan  $ER\beta$ ). Estrogen merupakan reseptor intraseluler yang merupakan salah satu regulator pada metabolisme kalsium. Estrogen jika diaktivasi oleh ligan akan mempengaruhi diferensiasi osteoklas melalui pembentukan osteoprotegerin (OPG).

Ligan asli yang digunakan adalah  $17\beta$ -estradiol untuk membandingkan kemampuan ikatan atau afinitas naringenin dan hesperidin dengan reseptor estrogen. Parameter yang digunakan adalah *score docking* yang merepresentasikan energi yang dibutuhkan untuk berikatan. Semakin rendah *score docking* yang diperoleh semakin kuat ikatan senyawa dengan ligannya. *Score docking* senyawa ligan pada estrogen reseptor dapat dilihat pada tabel 1.

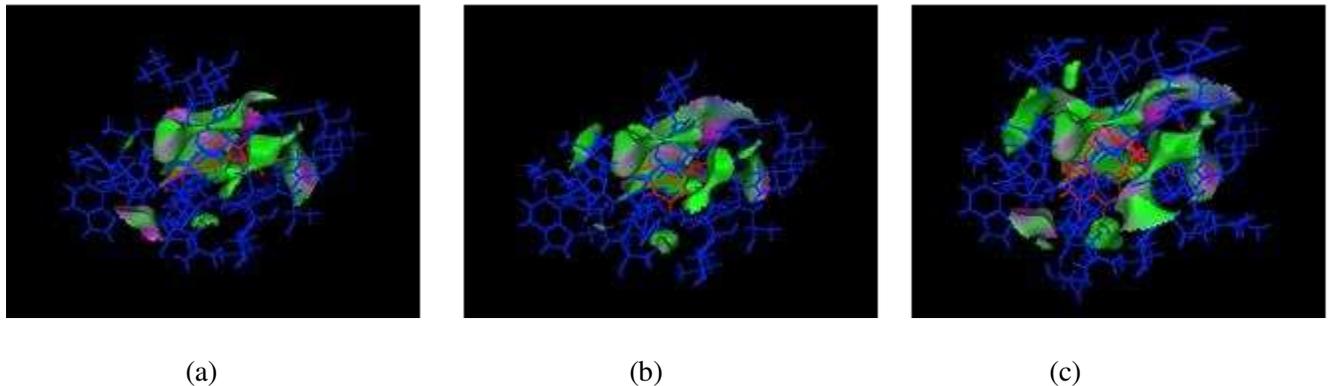
**Tabel 1.** *Score docking* pada  $ER\alpha$  dan  $ER\beta$

Ligan	Score	
	$ER\alpha$	$ER\beta$
Estrogen ( $17\beta$ -estradiol)	-20,00	-20,00

Naringenin	-19,97	-18,99
Hesperidin	-19,98	+49,12

Hasil docking menunjukkan bahwa naringenin dan hesperidin mempunyai afinitas yang hampir sama dengan  $17\beta$ -estradiol terhadap  $Er\alpha$ . Hal ini dikarenakan *score docking* naringenin dan hesperidin hampir sama dengan  $17\beta$ -estradiol. Namun hasil *docking* pada  $Er\beta$  menunjukkan bahwa hanya naringenin yang mempunyai *score docking* yang hampir sama dengan  $17\beta$ -estradiol, sedangkan hesperidin mempunyai *score docking* yang jauh lebih besar. Dengan demikian, hanya naringenin yang

mempunyai afinitas dengan  $Er\beta$ , sedangkan hesperidin tidak. Perbedaan *score docking* pada senyawa hesperidin menunjukkan selektivitas dalam aktivasi reseptor estrogen. Hal ini menjadikan hesperidin potensial sebagai zat estrogenik yang minim efek samping. Aktivasi reseptor estrogen  $\beta$  secara kuat akan memicu meningkatnya resiko kanker rahim pada wanita. Hasil docking ini menguatkan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa senyawa flavonoid tersebut bersifat estrogenik.



**Gambar 4. Visualisasi docking menggunakan aplikasi Moe.** Menggambarkan interaksi ligan dengan  $ER\beta$ . Ligan (a) merupakan estrogen; (b) naringenin; (c) hesperidin pada gambar berwarna merah yang masing2 berikatan pada sisi aktif reseptor yang sama. Dilaporkan bahwa ikatan yang terjadi antara ligan dan reseptor yaitu ikatan hidrogen yang disimbolkan dengan warna merah muda dan ikatan hidrofobik melalui warna hijau.

## KESIMPULAN

Kombinasi ekstrak kulit jeruk bali dan susu tinggi kalsium berpotensi meningkatkan densitas tulang tikus betina terovariektomi karena adanya fitoestrogen yang mampu berikatan dengan *Estrogen Response Element* (ERE) yang dibuktikan dengan *molecular docking*.

## REFERENSI

- Arifin Z., Hestiantoro A., and Baziad A., 2010, Pemberian susu yang difortifikasi kalsium kadar tinggi dan vitamin D dalam memperbaiki turnover tulang perempuan pascamenopause, Laporan Penelitian. Jakarta: Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo.
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan, 2003, *Pedoman Penilaian Label Pangan*. Jakarta: BPOM.
- Benassayag, C, Perrot-Applanat, M, and Ferre, F, 2002, Phytoestrogen as Modulators of Steroid Action in Target Cells, *J. Chromatogr. B*, **777**:233-248.
- CCRC. 2011, *Efek Estrogenik Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Bali (Citrus maxima Merr.): Tinjauan Terhadap Bobot Uterus, Perkembangan Kelenjar Payudara, dan Ekspresi c-Myc pada Tikus Sprague Dawley Betina Terovariektomi*, Unpublished data.
- Choi, SY, Ko, HC, Ko, SY, Hwang, JH, Park, JG, Kang, SH, Han, SH, Yun, SH, and Kim, SJ, 2007, Correlation between Flavonoid Content and the NO Production Inhibitory Activity of Peel Extracts from Various Citrus Fruits, *Biol. Pharm. Bul*, **30**:772-778.
- Cornwell, T, Cohick, W, and Raskin, I, 2004, Dietary Phytoestrogens and Health, *Phytochemistry*, **65**:95-1016.
- Ikawati, Z, 2008, *Pengantar Farmakologi Molekuler*, Gama Press, Yogyakarta.
- Kenny, AM, Prestwood, KM, Pilbeam CC, and Raisz, LG, 2000, The short term effects of tamoxifen on bone turnover in older women, *J Clin Endocrinol Metab*, **80**:3287-91.
- Liliana, 2000, *Metabolisme Kalsium dan Pencegahan Osteoporosis di dalam eber*

- Papyrus*, Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanegara 6(1):33-42.
- Muirden KD, 1994, *Osteoporosis Kumpulan Naskah WHO-COPCORD-IRA Post Graduate Course*, Jakarta: WHO-COPCORD-IRA.: 1 – 3.
- Nadendla, RR, 2004, Molecular Modeling: A Powerful Tool for Drug Design and Molecular Docking, *Resonance*, **9**:51-60.
- Nordin BE, 2009, The effect of calcium supplementation on bone loss in 32 controlled trials in postmenopausal women, *Osteoporosis Int.* 20(12):2135-43.
- Pacifici, R, 2006, Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis, *J Bone Miner Res*, **8**:1043-51.
- Perry S., O'Hanlan KA., 2003, *Natural Menopause*, New York: Addison-Wesley Publishing Company.
- Sankaran B, 2000, *Osteoporosis: Clinical, Radiological, Histological, Assesment and an Experimental Study*: 176 - 211.
- Wagner, H., Bladt S., & Zgainski, E.M., 1984, Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas, 170-173, 188-189,