

Teknik pengekstrakan antioksidan daripada kulit limau purut

(Antioxidant extraction techniques from citrus *hystrix* peel)

Suhaila Fouzi

Pengenalan

Produk sitrus biasanya digunakan dalam makanan serta minuman dan mempunyai nilai perubatan. *Citrus hystrix* atau buah limau purut (Gambar 1) jarang dimakan begitu sahaja kerana rasanya yang kuat, tetapi buah ini telah digunakan secara meluas sebagai bahan untuk memasak makanan di Malaysia dan Thailand.

Namun, *Citrus hystrix* merupakan antara tumbuhan sitrus yang masih belum digunakan sepenuhnya. Ini kerana hanya daun atau jus sahaja yang biasa digunakan sebagai bahan di dalam makanan atau minuman. *Citrus hystrix* mengandungi banyak sebatian bioaktif seperti linalol, geraniol, sitronellol, limonen serta eugenol dan antara sifat-sifat fisiologi sebatian bioaktif ini ialah antioksidan, antiradang, antimikrob, antidiabetes, antiadipogenes dan juga neuroprotektif. Antioksidan yang mencukupi di dalam badan adalah penting untuk mencegah penyakit barah. Contoh sebatian yang mempunyai sifat antioksidan ialah asid galik dan asid askorbik. Dengan mengambil kira kepentingan antioksidan kepada kesihatan manusia, satu teknik pengekstrakan antioksidan daripada kulit limau purut telah dihasilkan menggunakan pelarut etanol dan aseton melalui kaedah rendaman.



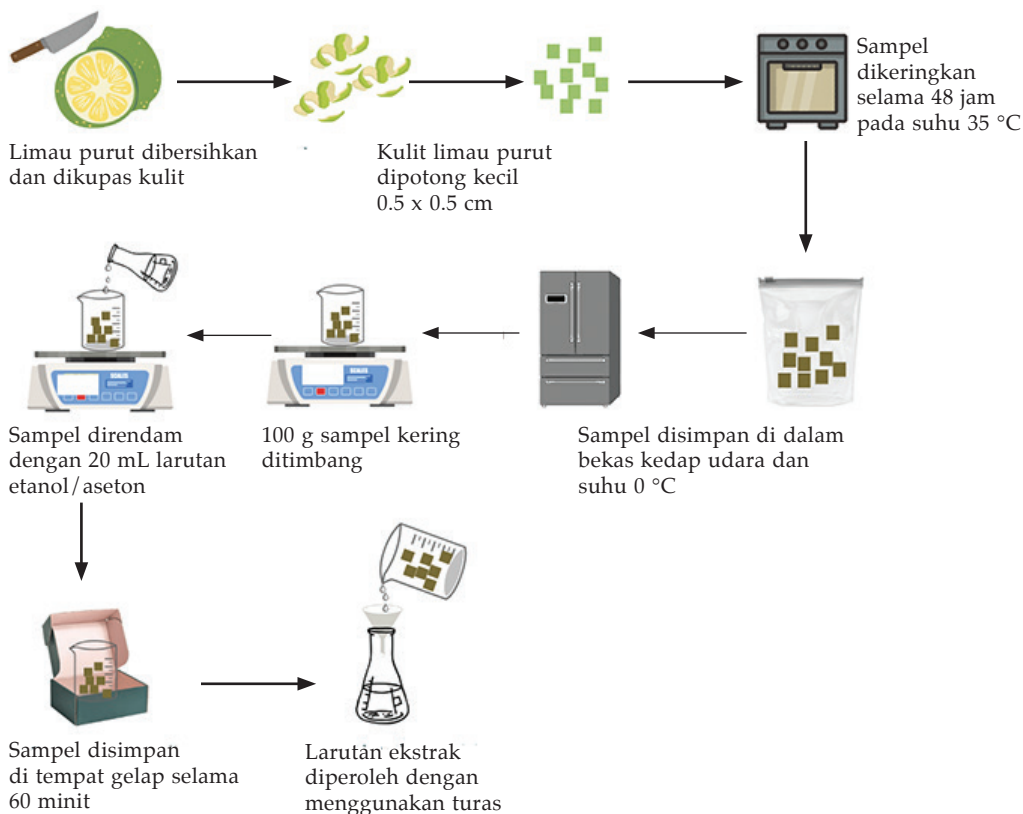
Gambar 1. Buah limau purut (*Citrus hystrix*)

Teknik pengekstrakan antioksidan menggunakan pelarut melalui kaedah rendaman

Teknik pengekstrakan antioksidan daripada kulit limau purut ini melibatkan dua langkah yang utama iaitu penyediaan sampel buah limau purut dan proses maserasi kulit limau purut (Carta alir 1). Pengekstrakan sebatian antioksidan pada kulit limau purut dilaksanakan menggunakan dua jenis pelarut iaitu etanol dan aseton.

Langkah pertama: Penyediaan sampel buah limau purut

Buah limau purut yang segar dicuci, dibuang kulit dan dipotong kecil mengikut saiz 0.5 cm × 0.5 cm. Buah seterusnya dikeringkan selama 48 jam pada suhu 35 °C dan disimpan di dalam beg plastik kedap udara (ziploc) pada suhu 0 °C sebelum pengekstrakan antioksidan dilaksanakan.



Carta alir 1. Penyediaan sampel secara kaedah maserasi

Langkah kedua: Teknik maserasi kulit limau purut

Bagi mengekstrak sebatian antioksidan pada buah limau purut, sekurang-kurangnya 100 g kulit kering limau purut diperlukan. Kulit kering limau purut diekstrak menggunakan 20 mL etanol/aseton pada nisbah 3:7 (v/v) di tempat yang gelap dan di dalam bekas bertutup pada suhu bilik selama 60 minit. Selesai pengekstrakan dalam tempoh tersebut, kulit limau purut kemudiannya diasingkan daripada ekstrak dengan kaedah penapisan menggunakan kertas turas.

Penentuan kandungan sebatian antioksidan dalam larutan ekstrak limau purut

Keberkesanan pengekstrakan sebatian antioksidan menggunakan pelarut etanol dan aseton melalui kaedah rendaman dinilai dengan menentukan kandungan sebatian antioksidan iaitu asid galik dan asid askorbik yang diperoleh dalam larutan ekstrak. Kandungan sebatian antioksidan dalam limau purut iaitu asid galik dan asid askorbik ditentukan masing-masing menggunakan alat kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) fasa terbalik (Shimadzu, Perkin Elmer Series 200 Pump with M720 UV detector) dan alat spektroskopi ultra lembayung UV-Vis (Perkin Elmer, Varian Cary 50 UV spectrometer).

Penentuan kandungan asik galik dalam larutan ekstrak limau purut menggunakan alat kromatografi cecair berprestasi tinggi fasa berbalik

Bagi menentukan kandungan asid galik, larutan ekstrak limau purut (0.5 mL) dicampurkan bersama campuran larutan etanol/aseton pada nisbah 3:7 (v/v) di dalam kelalang kon sehingga mencapai isi padu 100 mL. Campuran larutan kemudiannya dipanaskan dalam julat 80 °C sehingga 90 °C di dalam penangas air untuk menyingkirkan semua pelarut etanol dan aseton. Tambahan lagi, kaedah pemanasan campuran larutan di dalam air adalah untuk mengelakkan campuran larutan ekstrak daripada kering. Larutan ekstrak mentah ini seterusnya dilarutkan menggunakan asetonitril di dalam kelalang volumetrik bersaiz 100 mL.

Ketetapan parameter optimum bagi alat HPLC fasa terbalik bagi penentuan kandungan sebatian asid galik dalam larutan ekstrak limau purut adalah seperti dalam *Jadual 1*. Kandungan asid galik dalam larutan ekstrak limau purut ditentukan berdasarkan graf kalibrasi larutan piawai asid galik (kepekatan: 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm) dan perbandingan masa penahanan (*retention time*) larutan ekstrak limau purut dan larutan piawai asid galik. Kepekatan asid galik dalam kulit limau purut ditentukan melalui pengiraan faktor tindak balas (RF) menggunakan persamaan (F1 dan F2) seperti yang berikut:

RF

= larutan piawai kawasan puncak/kepekatan larutan piawai

.....

(F1)

Kepekatan asid galik

= analit kawasan puncak/RF

.....

(F2)

Jadual 1. Parameter optimum alat kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) fasa terbalik untuk penentuan asid galik dalam larutan ekstrak limau purut

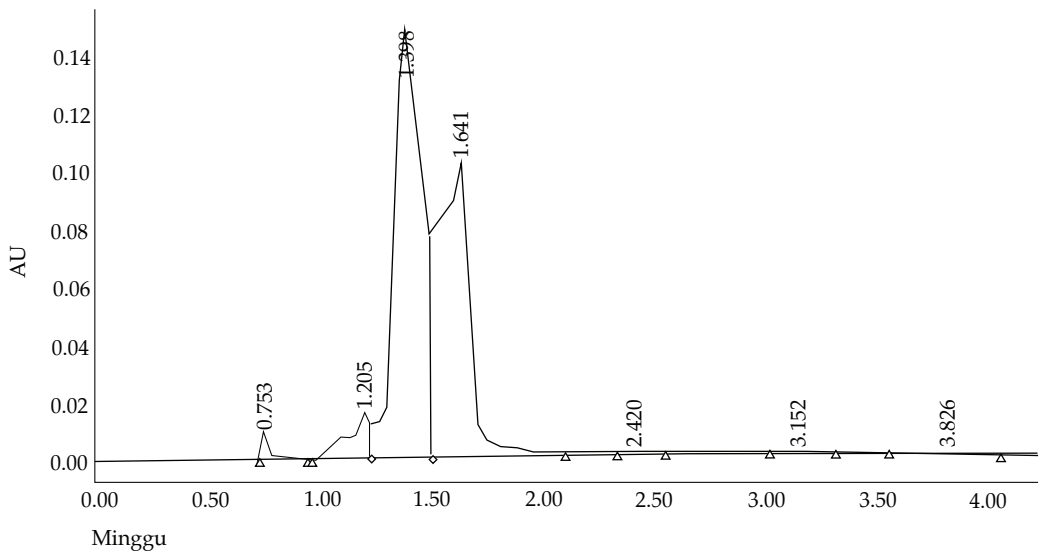
Parameter	Tetapan
Lajur	C18
Fasa mudah alih	air isokratic: acetonitrile (80:20% v/v)
Kadar alir	1.0 mL/min
Lajur suhu	35 °C
Isi padu suntikan	20 mL
Pengesanan UV	278 nm

Penentuan kandungan asik askorbik dalam larutan ekstrak limau purut menggunakan alat spektroskopi UV-vis

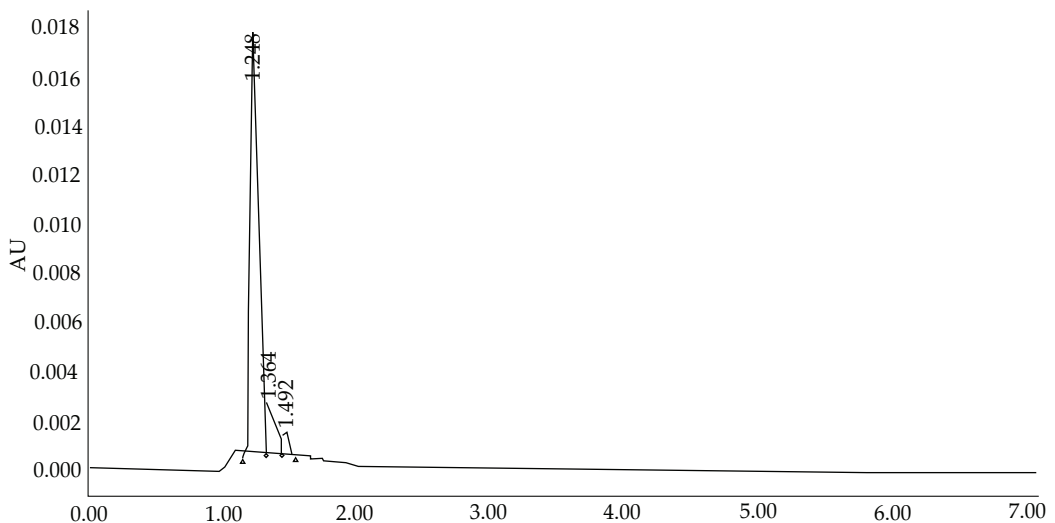
Bagi menentukan kandungan asid askorbik, sebanyak 80 mL larutan ekstrak limau purut diperlukan. Larutan ini dipanaskan selama 1 minit dalam julat 80 – 90 °C di dalam penangas air untuk menyingkirkan semua pelarut etanol dan aseton. Larutan kemudiannya dibiarkan sejuk pada suhu bilik dan dibahagikan kepada tiga bahagian berat iaitu 1.5 g (sampel 1), 2.0 g (sampel 2) dan 2.5 g (sampel 3). Ketiga-tiga bahagian larutan ekstrak limau purut ini kemudiannya dilarutkan menggunakan air suling di dalam kelalang volumetrik 5 mL dan kepekatan asid askorbik dalam limau purut ditentukan menggunakan alat spektroskopi UV-Vis.

Kandungan sebatian asid galik dan asid askorbik dalam limau purut

Hasil pengekstrakan sebatian antioksidan pada limau purut menggunakan pelarut etanol dan aseton melalui kaedah rendam menunjukkan kepekatan kandungan asid galik dan asid askorbik yang tinggi. Ekstrak limau purut yang diperoleh ini berwarna hijau cair. Perbandingan kromatogram antara asid galik daripada kulit limau purut dan larutan piawai asid galik masing-masing adalah seperti dalam *Rajah 1* dan *Rajah 2*. Berdasarkan kepada hasil analisis HPLC, keputusan kromatogram kulit limau purut



Rajah 1. Kromatogram HPLC bagi kulit limau purut



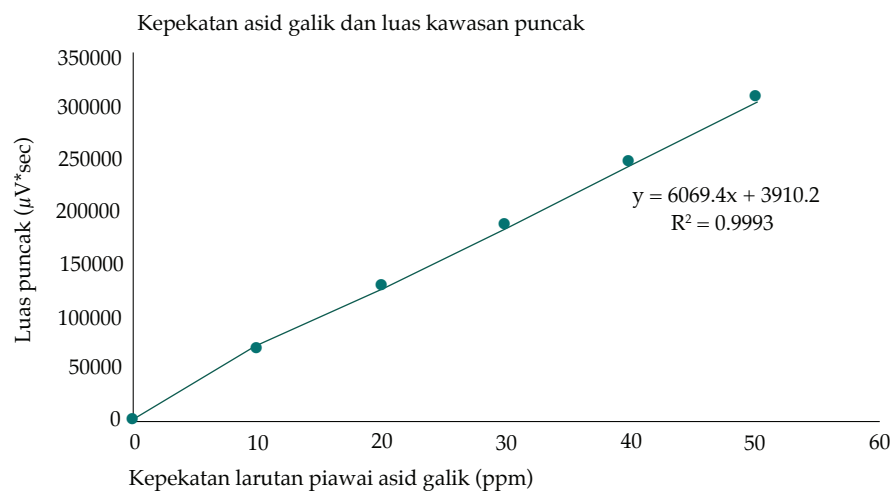
Rajah 2. Kromatogram HPLC bagi larutan piawai asid galik dengan kepekatan 10 ppm

menunjukkan terdapat banyak puncak yang terbentuk hasil daripada pengekstrakan pelarut alkohol menggunakan kaedah rendaman. Justeru, teknik pengekstrakan antioksidan pada limau purut menggunakan kaedah rendaman ini ditambah baik dengan menggunakan teknik penulenan secara pengekstrakan sokset pada suhu 70 °C selama 15 jam untuk mendapatkan puncak kromatogram yang lebih tepat.

Jadual 2 menunjukkan perbandingan luas kawasan puncak bagi kromatogram HPLC untuk larutan piawai asid galik dan ekstrak kulit limau purut manakala *Rajah 3* menunjukkan graf lengkung kalibrasi antara kepekatan larutan piawai asid galik dan luas puncak yang digunakan untuk menentukan kandungan kepekatan asid galik pada kulit limau purut. Berdasarkan graf kalibrasi ini, teknik pengekstrakan menggunakan pelarut etanol dan aseton menunjukkan nilai kepekatan asid galik pada kulit limau purut ialah 16.64 ppm.

Jadual 2. Perbandingan luas kawasan puncak (kromotogram HPLC) bagi larutan piawai asid galik dan ekstrak limau purut

Larutan	Luas kawasan puncak (μV*sec)
Larutan piawai asid galik 10 ppm	69066
Larutan piawai asid galik 20 ppm	127224
Larutan piawai asid galik 30 ppm	184405
Larutan piawai asid galik 40 ppm	245783
Larutan piawai asid galik 50 ppm	307390
Ekstrak kulit limau purut	104885



Rajah 3. Graf lengkung kalibrasi antara kepekatan larutan piawai asid galik dan luas kawasan puncak

Kepekatan asid galik dalam kulit limau purut juga dapat ditentukan dengan menggunakan pengiraan faktor respons (R_f) menggunakan persamaan (F3 dan F4) seperti berikut:

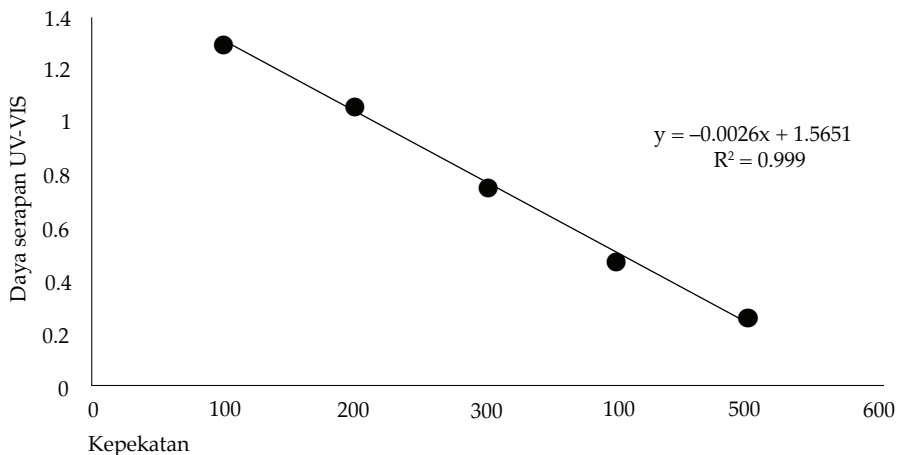
$$R_f \text{ (m}^2\text{/ppm)} = \text{luas kawasan puncak bagi larutan piawai (m}^2\text{)/kepekatan larutan piawai (ppm)} \dots\dots\dots (F3)$$

$$\text{Kepekatan asid galik (ppm)} = \text{luas kawasan puncak kulit limau purut (m}^2\text{)/faktor respons (}R_f\text{)} \dots\dots\dots (F4)$$

Pengiraan kepekatan asid galik menggunakan R_f (persamaan F3 dan F4) mendapati jumlah asid galik pada kulit limau purut ialah 3.295 mg bagi setiap 1 g kulit limau purut yang telah dikeringkan. Secara amnya, jumlah asid galik pada kulit lemon ialah 87.77 mg bagi setiap 1 g kulit lemon. Justeru, keputusan kajian ini menunjukkan bahawa kandungan asid galik pada kulit limau purut yang diekstrak menggunakan pelarut alkohol adalah lebih rendah berbanding dengan kulit lemon.

Bagi penentuan kandungan asid askorbik pada kulit limau purut menggunakan alat spektroskopi UV-Vis, keputusan kajian menunjukkan bahawa peningkatan kepekatan asid askorbik akan menurunkan nilai daya serap UV-Vis berdasarkan keluk kalibrasi larutan piawai asid askorbik (*Rajah 4*). Penggunaan keluk kalibrasi ini bagi menentukan kandungan asid askorbik pada kulit limau purut yang diekstrak menggunakan pelarut alkohol menunjukkan bahawa kepekatan asid tersebut bagi setiap 1 g kulit limau purut dalam ketiga-tiga sampel 1, 2 dan 3 masing-masing ialah 418.75 ppm, 301.92 ppm dan 191.29 ppm (*Jadual 3*).

Kepekatan standard asid askorbik dan daya serap



Rajah 4. Graf lengkuk kalibrasi antara kepekatan larutan piawai asid askorbik dan daya serap UV-Vis

Jadual 3. Jumlah kandungan asid askorbik bagi setiap 1 g kulit limau purut

Sampel	1	2	3
Berat sampel (g)	1.5008	2.0101	2.5013
Jumlah kandungan asid askorbik (mg)/1 g kulit limau purut	0.8371	0.7510	0.6373

Kesimpulan

Kaedah pengekstrakan asid galik dan asid askorbik daripada kulit limau purut (*Citrus hystrix*) menggunakan larutan alkohol etanol/aseton pada nisbah (3:7 v/v) adalah kaedah pengekstrakan yang sesuai untuk limau purut. Jumlah kepekatan asid galik dan asid askorbik pada kulit limau purut yang diekstrak menggunakan larutan alkohol dan ditentukan menggunakan alat kromatografi HPLC dan spektroskopi UV-Vis masing-masing ialah 3.295 mg dan 0.8371 mg untuk setiap 1 g kulit limau purut.

Bibliografi

- Devi, P.B., Vijayabharathi, R., Sathyabama, S., Malleshi, N.G. dan Priyadarisini, V.B. (2014). Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana* L.) polyphenols and dietary fibre: a review. *J. Food Sci. Technol.* 51: 1,021 – 1,040
- Irawaty, W., Soetaredjo, F.E., Ayucitra, A., Sianto, M.E., Jonathan, K., Cynthia, D. dan Tanda, S. (2014). *Antioxidant and Antidiabetic Activities of Ethanolic Citrus hystrix Peel Extract: Optimization of Extraction Conditions* 8(14): 85 – 89
- Kumari, S., Sarmah, N. dan Handique, A.K. (2013). Antioxidant activities of the unripen and ripen Citrus aurantifolia of Assam. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* 2(9): 4,811 – 4,816
- Nor, O.M. (1999). Volatile aroma compounds in *Citrus hystrix* oil. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* 27(2): 225 – 229
- Oniszcuk, A., Szewczyk, K. dan Wianowska, D. (2007). *Effect of sample-preparation methods on the HPLC quantification of some phenolic acids in plant materials* (19): 227 – 237
- Sahelian, R. (2009). Stroke prevention and treatment with vitamins, herbs, supplements, natural remedies to prevent. Diperoleh dari <http://www.raysahelian.com/stroke.html>

Ringkasan

Produk sitrus biasanya digunakan dalam makanan dan minuman yang mempunyai nilai perubatan. Beberapa manfaat kesihatan buah sitrus adalah untuk mengelakkan obesiti, mengurangkan risiko mendapat strok dan boleh menurunkan tahap tekanan. Limau purut (*Citrus hystrix*) adalah antara tumbuhan sitrus yang masih belum digunakan sepenuhnya kerana hanya daun atau jus sahaja yang biasa digunakan sebagai bahan makanan dan minuman. Limau purut tidak boleh dimakan sama ada sudah masak atau masih muda, tetapi buah limau purut mempunyai kegunaan yang meluas sebagai bahan masakan terutamanya di Malaysia dan Thailand. *Citrus hystrix* mengandungi banyak sebatian bioaktif seperti linalool, geraniol, sitronellol,

limonen dan eugenol. Sebatian polifenol yang mengandungi banyak sebatian aktif menunjukkan beberapa sifat fisiologi seperti antiradang, antimikrob, kardioprotektif, antidiabetes, antiadipogeneses dan neuroprotektif. Penentuan asid galik di dalam kulit limau purut yang telah dijalankan menggunakan HPLC fasa terbalik mendapati kepekatan asid galik adalah sebanyak 3.295 mg bagi setiap 1 g kulit limau purut yang telah dikeringkan. Kaedah spektroskopi UV-Vis yang digunakan untuk menentukan jumlah kepekatan asid askorbik di dalam kulit limau purut mendapati jumlah asid askorbik tertinggi adalah sebanyak 0.8371 mg bagi setiap 1 g kulit limau purut yang telah dikeringkan.

Summary

Citrus products are commonly used in food and drinks, but they also have medicinal value. Some health benefits of citrus fruits include obesity prevention and lowering the risk of stroke and stress levels. *Citrus hystrix* or kaffir lime fruits are inedible even when ripe and unripe, but this fruit has been used widely as ingredients for cooking in Malaysia and Thailand. At present, *Citrus hystrix* is one of the citrus plants that is not fully utilised because only their leaves or juices are used as ingredients in foods and drinks. *Citrus hystrix* contains many active compounds such as linalool, geraniol, citronellol, limonene and eugenol. Polyphenol compounds which contain many active compounds demonstrate several physiological properties such as anti-inflammatory, anti-microbial, cardioprotective, anti-diabetes, anti-adipogeneses and neuroprotective. Determination of gallic and ascorbic acids on kaffir lime peel using reverse phase HPLC and UV-Vis spectrophotometer indicated that kaffir lime contained 3.295 mg of gallic acid and 0.8371 mg of ascorbic acid for every 1 g of dried kaffir lime peel.

Pengarang

Suhaila Fouzi

Pusat Penyelidikan Sains Tanah, Air dan Baja, Ibu Pejabat MARDI

Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: suhailafauzi@mardi.gov.my