

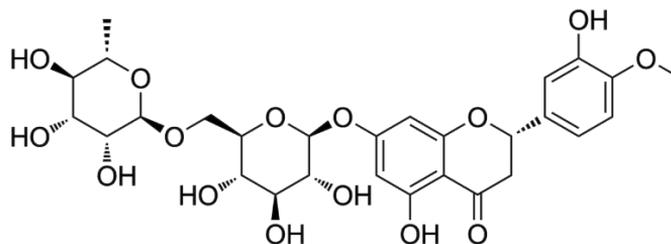
BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Indonesia menghasilkan 53.377.386 kg jeruk nipis pada tahun 2023. Sulawesi Selatan menjadi salah satu provinsi dengan produksi tertinggi yang mencapai 4.074.984 kg dengan daerah penghasil terbesar yaitu Kabupaten Maros sebesar 2.354.699 kg (BPS, 2024). Hingga saat ini, kulit jeruk yang berasal dari industri maupun rumah tangga menjadi salah satu limbah yang banyak ditemukan di lingkungan (Pratikto *et al.*, 2024).

Kulit jeruk mengambil bagian 50-55% dari total bobot buah (Suri, *et al.*, 2022). Dengan jumlah produksi yang cukup besar, kulit jeruk memiliki potensi yang dapat dimanfaatkan sebagai salah satu sumber senyawa bioaktif hesperidin. Hesperidin dapat ditemukan dalam jumlah banyak pada komponen buah jeruk (*Citrus* sp). Flavedo jeruk (lapisan luar kulit yang berwarna) dan albedo (bagian tengah lunak berwarna putih) mengandung hesperidin dalam jumlah lebih tinggi dibandingkan dengan bagian sari buah (Pyrzynska, 2022).

Hesperidin merupakan suatu glikosida flavanon yang terdiri dari aglikon hesperetin dan bagian gula yang dikenal sebagai rutinosa. Rutinosida adalah disakarida yang terdiri dari rhamnosa dan glukosa, dengan glukosa terikat pada C7 dari cincin hesperetin (Ji *et al.*, 2024). Senyawa ini memiliki berbagai efek farmakologis seperti antioksidan (Aalikhani *et al.*, 2021), antikanker (Dias *et al.*, 2021), antihipertensi (Homayouni *et al.*, 2018), antiinflamasi (Ganeshpurkar & Saluja, 2019), serta berpotensi dijadikan bahan dalam pembuatan *skincare* (Rodrigues & Pintado, 2024). Selain hesperidin, flavonoid utama yang juga dapat ditemukan dalam kulit buah jeruk adalah naringin, rutin, dan neohesperidin (Pyrzynska, 2022).



Gambar 1. Struktur senyawa hesperidin (Pyrzynska, 2022)

Ekstraksi merupakan langkah pertama untuk mendapatkan senyawa bioaktif



aksi modern seperti *Microwave Assisted Extraction* (MAE), *Extraction* (UAE) memiliki banyak keuntungan dibandingkan dengan metode tradisional seperti Soxhlet, infusa, dekokta, maserasi, dan refluks (Endarini, 2016). Pemilihan metode ekstraksi dapat didasarkan dari bahan baku serta zat aktif yang diinginkan (Endarini, 2016). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa metode ekstraksi yang digunakan berpengaruh terhadap kualitas senyawa yang dihasilkan (Chandra *et al.*, 2021; Ramayani *et al.*,

2021; Liu *et al.*, 2022). Namun, belum terdapat data yang menunjukkan perbandingan jumlah kadar hesperidin dari limbah kulit jeruk nipis dengan berbagai metode ekstraksi.

Metode HPTLC yang tervalidasi telah dikembangkan untuk menentukan kadar hesperidin dalam ekstrak dari kulit jeruk beberapa varietas. Metode ini memiliki tingkat akurasi 98,55% - 99,38% dengan nilai RSD 0,75 - 1,12 setelah penambahan hesperidin dengan berbagai konsentrasi standar. Kadar hesperidin dihitung dengan persamaan regresi linear dan diperoleh kadar hesperidin dari ekstrak kulit *Citrus paradisi* (11,15% ± 2,34), *Citrus limetta* (3,79% ± 2,56), *Citrus lemon* (1,72% ± 2,53), dan *Citrus sinensis* (1,29 ± 1,78) (Alam *et al.*, 2014).

Penetapan kadar pada ekstrak tanaman dapat dilakukan dengan metode KLT-densitometri. Densitometri cocok untuk analisis kuantitatif analit-analit dengan kadar yang sangat kecil yang perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu dengan KLT. Penetapan kadar dengan KLT-densitometri dapat dilakukan dengan waktu yang relatif singkat, fase gerak yang sedikit, dan dapat dilakukan penetapan kadar secara simultan (Ningrum *et al.*, 2024). Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh beberapa metode ekstraksi terhadap kadar hesperidin dari limbah kulit jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) dengan KLT-densitometri.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh beberapa metode ekstraksi terhadap kadar hesperidin dari ekstrak limbah kulit jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle).

1.3 Tinjauan Pustaka

1.3.1 Klasifikasi Tanaman

Menurut Ernawati *et al.* (2023), klasifikasi jeruk nipis sebagai berikut.

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Klas	: Dikotiledonae
Bangsa	: Rutales
Famili	: Rutaceae
Genus	: <i>Citrus</i>
Species	: <i>Citrus aurantiifolia</i> (Cristm.) Swingle



Iman

ologi jeruk nipis tanaman perdu yang memiliki banyak cabang nggi tanaman berkisar antara 3-5 m. Batangnya berkayu keras nipis berbentuk membulat, agak lebar, pangkalnya membulat . Tangkai daun bersayap sempit. Permukaan daun bagian atas kilap, sedangkan bagian bawah berwarna hijau muda.

Bunga jeruk nipis berbentuk bintang, dengan kelopak berwarna putih dan berbau harum (Ernawati *et al.*, 2023).



Gambar 2. Jeruk nipis

Buah jeruk nipis bulat berwarna hijau dengan diameter antara 4-5 cm dan akan berwarna kuning saat matang. Buah jeruk terdiri dari bagian daging buah dan kulit. Daging buah disebut endokarp yang terdiri dari kantung-kantung sari buah yang berkulit tipis atau lebih dikenal sebagai bulir buah jeruk. Kulit buah jeruk terdiri dari flavedo dan albedo. Flavedo merupakan bagian kulit luar yang terletak di bagian bawah lapisan epidermis dan mengandung kromoplas dan kantung minyak sedangkan albedo merupakan kulit bagian dalam yang memiliki lapisan jaringan busa. Buah jeruk nipis mengandung biji yang kecil-kecil berbentuk bulat telur sungsgang berwarna putih (Ernawati *et al.*, 2023).

I.3.3 Kandungan Kimia

A. Minyak atsiri

Minyak atsiri dari *C. aurantiifolia* dapat diekstraksi dengan metode destilasi air, destilasi uap, maserasi, Soxhlet, dan metode *cold pressing*. Komponen utama minyak atsiri yang terdapat pada *C. aurantiifolia* adalah d-limonen (35,98%), β -pinen (9,02%), α -terpineol (8,12%), dan citral (7,49%). Komponen lainnya yaitu linalool, linalyl asetat, geraniol, felandren, sesquiphellandren, citronellol, neryl asetat, fencon, farnesen, dan geranyl asetat (Puspita *et al.*, 2020; Spadaro *et al.*, 2012)

B. Flavonoid

Flavonoid yang terdapat pada *C. aurantiifolia* adalah flavanon dan flavonol dengan flavanon terbesar yaitu hesperidin (58,66%), didimin (3,46%), dan hesperetin (1,87%), sedangkan flavonol yang terdapat yaitu rutin (36,67%) dari total flavonoid (Patil *et al.*, 2009). Flavonoid lain yang terdapat dalam ekstrak *C. aurantiifolia* adalah apigenin, kaempferol, kuersetin, dan nobiletin (Loizzo *et al.*, 2012). Kadar hesperidin tertinggi ditemukan pada bagian isi buah dan kulitnya. Kulit jeruk nipis mengandung dibandingkan dengan biji, sari buah, dan buah (Kasim *et al.*,



erpenoid dalam ekstrak etanol kulit batang *C. aurantiifolia* yaitu 20,15% d-limonen. Senyawa ini memiliki beberapa aktivitas antibakteri, antiseptik, dan antikanker. Terpen yang terdapat

pada *C. aurantiifolia* dapat dikelompokkan menjadi monoterpen, terpen alkohol, terpen aldehid, terpen keton, dan terpen ester. Terpenoid dapat berperan sebagai antibakteri dengan memecah membran karena memiliki sifat lipofilik. Selain itu, terpenoid dapat menjadikan membran sitoplasma sebagai target utamanya karena sifatnya yang hidrofobik (Mirnawati *et al.*, 2021).

D. Fenolik

Senyawa fenolik memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tanaman terhadap berbagai penyakit yang disebabkan oleh jamur, virus, dan bakteri. Kadar senyawa fenolik dari buah *C. aurantifolia* dapat dipengaruhi oleh tingkat kematangan buah, kandungan tertinggi diperoleh pada buah yang belum matang (Ogundele *et al.*, 2021). Daging buah *C. aurantifolia* memiliki empat asam fenolik berupa asam galat (26,85 g/g) yang merupakan komponen terbesar, asam tanat (14,27 g/g), serta asam ferulat dan kumarat (Singh *et al.*, 2014). Al Namani *et al.* (2018) memperoleh total kandungan fenolik ekstrak daun *C. aurantifolia* yang ditetapkan dengan menggunakan Folin Ciocalteu Reagent (FCR) berkisar antara 96,55-322,57 µg GAE/mg. Bagian kulit *C. aurantiifolia* mengandung fenolik yang lebih tinggi yaitu 6,954 mg/g dibandingkan bagian daun (4,675 mg/gram), buah (2,243 mg/g), dan biji (0,19 mg/g).

E. Alkaloid

Alkaloid utama yang terdapat pada genus *Citrus* adalah sinefrin, tiramin, dan oktopamin. Total alkaloid pada kulit buah Citrus lebih tinggi jika dibandingkan dengan daging buah *Citrus* (He *et al.*, 2011). Buah *C. aurantifolia* kering dilaporkan mengandung alkaloid sebesar $0,33 \pm 0,11$ mg/100 g. Alkaloid dan glikosida pada jeruk memiliki aktivitas biologi seperti antikanker dan dapat digunakan dalam suplemen (Okwu, 2008).

1.3.4 Aktivitas Farmakologi

A. Antibakteri

Ekstrak *C. aurantiifolia* berpotensi digunakan sebagai agen tunggal maupun kombinasi untuk mengobati infeksi. Mekanisme aktivitas antibakteri *C. aurantifolia* disebabkan oleh senyawa fenolik dan turunannya melalui proses denaturasi protein sel bakteri (Jirna, 2016). Aktivitas antibakteri *C. aurantifolia* lebih baik terhadap bakteri gram negatif daripada beberapa bakteri gram positif (Galovičová *et al.*, 2022). Naringin yang terdapat pada jeruk merupakan agen antibiofilm potensial yang dapat digunakan dalam kombinasi dengan antibiotik untuk mengembangkan obat untuk pengobatan infeksi terkait biofilm. Naringin telah terbukti meningkatkan efek antibakteri ciprofloxacin dan tetrasiklin terhadap biofilm *Pseudomonas aeruginosa*



terpenoid pada jeruk memiliki sifat antioksidan karena mampu melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya, atom tersebut berikatan dengan radikal bebas sehingga menjadi netral. Kehilangan atom hydrogen akan mengalami resonansi dan

radikal bebas yang telah stabil menjadi berhenti bereaksi sehingga tidak merusak lipid, protein atau DNA. Berdasarkan uji DPPH, terlihat bahwa laju inhibisi ekstrak jeruk nipis dapat berada pada kisaran 11,79-56,89% (Al Namani *et al.*, 2018). Sedangkan, berdasarkan uji FRAP yang dilakukan oleh Oikeh *et al.* (2015), jus jeruk nipis terbukti memiliki aktivitas antioksidan, meskipun tingkat efektivitasnya masih di bawah asam askorbat.

C. Antikanker

Beberapa senyawa yang diduga memiliki aktivitas antikanker ditemukan dalam jeruk yaitu limonoid, flavonoid, minyak atsiri, kumarin, vitamin, dan asam lemak. Senyawa kuersetin yang banyak terdapat pada kulit buah *C. aurantifolia* juga berpotensi sebagai agen antikanker. Ekstrak sari buah *C. aurantifolia* dapat menghambat pertumbuhan sel kanker Panc-28. Mekanisme penghambatan sel kanker pankreas disebabkan oleh aktivitas senyawa limonin, asam limoneksat, asam isolemonesat, limonin glukosida, dan sitosterol glukosida (Patil *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2009). Senyawa kariofilen juga memiliki sifat antibakteri dan antikanker. Senyawa ini memiliki mekanisme sitotoksik selektif terhadap sel kanker kolorektal. Senyawa ini juga dapat menekan motilitas tumor, agregasi tumor, dan invasi sel (Asmah *et al.*, 2020).

D. Insektisida

Citral pada daun *C. aurantifolia* diuji aktivitas ovisidal dan larvasida terhadap *Aedes aegypti* menunjukkan aktivitas ovisidal tertinggi diikuti oleh aktivitas larvasida (Sarma *et al.*, 2019). Studi lain menunjukkan bahwa ekstrak daun *C. aurantifolia* menyebabkan efek mematikan, pencegah fagositosis, dan penghambatan pertumbuhan pada larva *P. xylostella*. *C. aurantifolia* dapat menjadi pengganti yang sangat baik untuk pestisida sintetis dengan mengurangi bahaya yang terkait dengan pestisida sintetis spinosad dan pestisida lainnya (Arani *et al.*, 2021).

E. Antiinflamasi

Minyak atsiri dari kulit *C. aurantifolia* juga memiliki sifat antiinflamasi karena adanya senyawa geraniol, limonen, dan α -terpinen. Mekanisme antiinflamasi minyak atsiri dapat melalui pengurangan yang signifikan dalam migrasi sel, produksi sitokin, dan ekstrasvasi protein yang disebabkan oleh karagenan. Minyak atsiri *C. aurantifolia* juga dapat menyebabkan mielotoksitas pada tikus karena kandungan citralnya yang tinggi (Amorim *et al.*, 2016). Naringenin, nobiletin, dan hesperetin memberikan efek antiinflamasi pada sel RAW264.7 yang diinduksi LPS (He *et al.*, 2018). Senyawa lain yaitu naringin juga diketahui dapat secara signifikan mengurangi inflamasi yang diinduksi TNF- α pada sel NP manusia (Chen *et al.*, 2022).



semak dan mekanisme potensial flavonoid kulit jeruk telah abetes yang diinduksi aloksan. Pengobatan dengan flavonoid ifikan mengurangi kadar gula darah puasa pada tikus diabetes an aktivitas enzim antioksidan SOD, menurunkan kadar produk A, dan meningkatkan fungsi limpa dan timus. Total flavonoid

pada kulit jeruk secara signifikan menurunkan kadar TC, TG, dan LDL-C sekaligus meningkatkan kadar HDL-C sehingga memperbaiki gangguan metabolisme lipid pada tikus diabetes. Namun, efek hipoglikemik flavonoid jeruk relatif lemah dan tidak dapat digunakan sendiri sebagai obat antidiabetik utama (Xiao *et al.*, 2013).

G. Aktivitas neuroprotektif

Efek dari nobiletin yang diekstrak dari kulit jeruk telah dipelajari pada penyakit Alzheimer dan Parkinson. Nobiletin dapat memperbaiki lesi neurodegeneratif melalui berbagai mekanisme. Pada model parkinson, nobiletin memulihkan sinyal dopamin, mengurangi kehilangan neuron, dan memperbaiki disfungsi motorik (Nakajima dan Ohizumi, 2019). Penelitian oleh Kim *et al.*, (2016), menunjukkan naringin secara signifikan mengurangi neurotoksisitas yang disebabkan oleh 6-hidroksidopamin.

H. Antihipertensi

Jus buah jeruk dapat menghambat aktivitas ACE secara *in vitro* yang menunjukkan potensi aktivitas antihipertensi. ACE memecah dua residu asam amino dari angiotensin-1 menjadi angiotensin-2, suatu vasokonstriktor kuat yang telah diketahui sebagai faktor utama dalam hipertensi. Penghambatan aktivitas ACE dapat dikaitkan dengan kandungan flavonoid pada jeruk. Efek penghambatan enzim dari jus dapat terjadi sebagai akibat dari tindakan sinergis dari berbagai senyawa yang ada di dalamnya (Ogoh *et al.*, 2015)



BAB II METODE KERJA

II.1 Alat dan bahan

II.1.1 Alat

Alat alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex[®]), alat ekstraksi maserasi, refluks, Soxhlet, blender (Phillips[®]), *chamber* (Camag[®]), *hotplate* (Dlab[®]), instrumen KLT densitometer (Camag[®]), lampu UV 254 nm dan UV 366 nm, lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄, mikropipet (Biohit[®]), *microtube*, *microwave* (Panasonic[®]), oven (Mettler[®]), pipa kapiler, *rotary evaporator* (Heidolph[®]), timbangan analitik (Denver[®]), vial, dan *waterbath* (Mettler[®]).

II.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *aquadest*, asam asetat, etanol 70%, etil asetat, limbah kulit jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle), n-heksan, pembanding hesperidin, dan pereaksi AlCl₃.

II.2 Cara kerja

II.2.1 Pengambilan dan Penyiapan Sampel

Sampel limbah kulit jeruk diambil kemudian dicuci bersih dan dilakukan sortasi basah, setelah itu dirajang hingga menjadi potongan kecil dan dikeringkan selama 48 jam dengan *plant dehydrator*. Setelah pengeringan, dilakukan sortasi kering lalu sampel dihaluskan menggunakan blender.

II.2.2 Ekstraksi

II.2.2.1 Maserasi

Simplisia limbah kulit jeruk nipis ditimbang sebanyak 20 gram dan dilakukan penarikan senyawa nonpolar dengan pelarut n-heksan. Simplisia diangin-anginkan kemudian ditambahkan dengan etanol 70% di dalam wadah kaca selama 3 x 24 jam dengan sesekali dilakukan pengadukan.

II.2.2.1 Soxhlet

Simplisia limbah kulit jeruk nipis ditimbang sebanyak 20 gram dan dilakukan penarikan senyawa nonpolar dengan pelarut n-heksan. Simplisia diangin-anginkan lalu dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam selongsong. Dirangkai alat Soxhlet dan ditambahkan dengan 200 mL etanol 70% ditunggu hingga tetesan siklus menjadi bening.

II.2.2.3 *Microwave Assisted Extraction* (MAE)

Simplisia limbah kulit jeruk nipis ditimbang sebanyak 20 gram dan dilakukan penarikan senyawa nonpolar dengan pelarut n-heksan. Simplisia diangin-anginkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan 200 mL etanol 70%, *microwave* dan diekstraksi selama 3 menit dengan daya p50.



II.2.2.4 *Ultrasound Assisted Extraction (UAE)*

Simplisia limbah kulit jeruk nipis ditimbang sebanyak 20 gram dan dilakukan penarikan senyawa nonpolar dengan pelarut n-heksan. Simplisia diangin-anginkan dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 200 mL etanol 70% lalu dinyalakan alat sonikator selama 30 menit.

II.2.3 Penentuan bobot ekstrak dan persen rendemen

Ekstrak kental yang diperoleh dari proses penguapan ekstrak kemudian ditimbang dan dicatat bobot ekstrak yang didapatkan, lalu dihitung persen rendemen yang didapatkan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{bobot akhir ekstrak (g)}}{\text{bobot awal simplisia (g)}} \times 100\%$$

II.2.4 Uji kualitatif senyawa hesperidin

Ekstrak hasil maserasi, Soxhlet, UAE, dan MAE serta pembanding hesperidin dilarutkan menggunakan etanol 70% kemudian ditotolkan pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄ dengan batas bawah 1,5 cm dan batas atas 0,5 cm. Selanjutnya dilakukan elusi dengan fase gerak etil asetat: asam asetat: *aquadest* (16: 3,5: 1) yang telah jenuh. Setelah itu dilakukan pengamatan di bawah lampu UV 254 nm dan UV 366 nm. Plat KLT disemprot dengan pereaksi AlCl₃ kemudian diamati pada UV 366 nm menunjukkan noda berwarna kuning (Paokuma *et al.*, 2023). Selanjutnya dihitung nilai R_f dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh noda}}{\text{Jarah yang ditempuh eluen}}$$

II.2.5 Uji kuantitatif senyawa hesperidin

II.2.5.1 Pembuatan larutan uji

Ekstrak limbah kulit jeruk nipis dengan metode maserasi, Soxhlet, MAE dan UAE masing-masing ditimbang sebanyak 40 mg kemudian dicukupkan dengan etanol 70% hingga 1 mL ke dalam *microtube* sehingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 40.000 ppm.

II.2.5.2 Pembuatan larutan stok

Larutan stok dibuat dengan menimbang 1 mg pembanding hesperidin dan dicukupkan dengan etanol 70% hingga 1 mL pada *microtube* sehingga diperoleh larutan stok 1.000 ppm. Larutan stok 1000 ppm kemudian dicuplik 400 µL dan dicukupkan dengan etanol 70% hingga 1 mL sehingga diperoleh larutan 400 ppm.

II.2.5.3 Analisis dengan KLT densitometer

Larutan baku hesperidin 400 ppm kemudian ditotolkan sebanyak 2 µL, 4 µL, 6 µL, dan 8 µL pada lempeng berukuran 6 x 10 cm dan larutan uji 40.000 ppm ditotolkan pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄ ukuran 14 x 10 cm yang telah jenuh dengan batas bawah 1,5 cm dan batas atas 0,5 cm yang kemudian dielusi dengan fase gerak etil asetat : asam asetat : *aquadest* dengan perbandingan 16 : 3,5 : 1, yang telah jenuh. Setelah itu dilakukan pengamatan di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Plat yang telah dielusi dengan KLT-densitometri pada panjang gelombang 286 nm.



II.2.5.4 Pengumpulan dan analisis data

Data hasil pengukuran yang didapatkan kemudian ditabulasi dan dihitung nilai kadar hesperidin dengan memasukkan nilai luas area yang diperoleh ke dalam persamaan linear $Y = ax + b$ lalu dianalisis secara statistik menggunakan GraphPad dan setelahnya dilakukan pembahasan dan ditarik kesimpulan.

