

**DETERMINASI KADAR TOTAL POLIFENOL TERLARUT, HESPERETIN  
DAN QUERCETIN PADA DAUN, KULIT DAN ISI BUAH  
*Citrus aurantifolia* (Christm & Panzer) Swingle**

Siti Mahyuni

Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Pakuan Bogor

Email: [sitimahyuni@unpak.ac.id](mailto:sitimahyuni@unpak.ac.id)

**ABSTRAK**

Hesperitin dan quercetin adalah senyawa bioaktif golongan polifenol yang biasa terdapat tanaman genus *Citrus sp.* Hesperetin dan quercetin memiliki berbagai aktifitas farmakologis seperti antioksidan, antiinflamasi, antihipertensi dan mampu menurunkan kadar kolesterol dalam darah. Senyawa-senyawa tersebut tersebar pada berbagai bagian tanaman Citrus dengan kadar yang berbeda-beda, sehingga untuk proses ekstraksi yang optimal, perlu diketahui pola sebaran dan kadarnya pada bagian-bagian yang berbeda dari tanaman Citrus. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kadar total polifenol terlarut, hesperetin, dan quercetin pada daun, kulit buah, dan isi buah *Citrus aurantifolia*. Hasil pengukuran kadar total polifenol terlarut dengan standar i menunjukkan bahwa kadar total polifenol terlarut paling tinggi terdapat pada kulit buah (6,954 mg/g berat basah) kemudian daun (4,675 mg/g berat basah) dan isi buah (2,243 mg/g berat basah). Kadar hesperetin dan quercetin yang diukur menggunakan sistem *high performance liquid chromatography* (HPLC) menunjukkan pola sebaran yang berbeda. Kadar hesperetin tertinggi terdapat pada isi buah 58,43 ( $\mu\text{g/g}$  berat kering) kemudian kulit buah (32,49  $\mu\text{g/g}$  berat kering) namun tidak terdeteksi keberadaannya pada daun. Sebaran senyawa quercetin menunjukkan pola sebaliknya dimana kadar quercetin tertinggi terdapat pada kulit buah (112,47  $\mu\text{g/g}$  berat kering) dan terendah terdapat pada isi buah (89,4947  $\mu\text{g/g}$  berat kering) sementara pada daun buah terdapat quercetin dengan kadar (92,71  $\mu\text{g/g}$  berat kering). Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan hesperetin dan quercetin terakumulasi pada bagian yang berbeda dari tanaman *Citrus aurantifolia*.

**Kata kunci:** *Citrus aurantifolia*, hesperetin, quercetin, total polifenol terlarut

**DETERMINATION OF TOTAL SOLUBLE POLYPHENOL, HESPERETIN  
AND QUERCETIN CONTENT IN LEAVES, PEEL AND SAC OF *Citrus  
aurantifolia* (Christm & Panzer) Swingle**

**ABSTRACT**

Hesperetin and quercetin are the bioactive compounds commonly found on various part of *Citrus sp* plant. These compounds show many pharmacological activities i.e antioxidant, antihypertension, anti-inflammatory and reduce the level of cholesterol in blood circulation. Hesperetin and quercetin distributed and accumulated at different concentration in certain part of plant thus the distribution pattern of these compounds should be determined in order to optimize the extraction of the desired compound. This study was aimed to determine the content of total soluble polyphenol, hesperetin and quercetin in leaf, peel, and sac of *Citrus aurantifolia* using HPLC machine system. The results reveal that the highest total soluble polyphenol content was found in the peel of fruit (6.954 mg/g fresh weight) followed by the leaves (4.675 mg/g fresh weight) and the fruit sac (2.243 mg/g fresh weight) respectively. The highest hesperetin content was

detected in the fruit sac 58.43 ( $\mu\text{g/g}$  dry weight) followed by fruit peel (32.49  $\mu\text{g/g}$  dry weight) but was not traced in the leaves. A different pattern can be seen in the distribution of quercetin in which the highest content was detected in the fruit peel (112.47  $\mu\text{g/g}$  berat kering) and the lowest found in the fruit sac (89.4947  $\mu\text{g/g}$  dry weight). Quercetin also found in the leaves of *C. aurantifolia* (92.71  $\mu\text{g/g}$  dry weight). Overall, it can be concluded that hesperetin and quercetin compounds are accumulated at different levels in different parts of the *C. aurantifolia*.

**Keywords:** *Citrus aurantifolia*, hesperetin, quercetin, total soluble polyphenol

## PENDAHULUAN

Jeruk nipis atau *Citrus aurantifolia* merupakan jenis buah yang mudah ditemukan disemua iklim, dimanfaatkan untuk beragam keperluan khususnya bahan pangan secara tradisional telah lama digunakan sebagai kosmetik dan bahan obat untuk mengobati berbagai jenis penyakit (Grabley dan Thiericke, 1999). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa *C. aurantifolia* memiliki aktifitas-aktifitas anti bakteri (Aibinu *et al.*, 2007) dan antioksidan yang tinggi (Anagnostopoulou *et al.*, 2005). *Citrus aurantifolia* diketahui memiliki senyawa-senyawa polifenol yang bersifat antioksidan termasuk senyawa-senyawa flavonoids spesifik seperti rutin, naringenin, hesperidin, hesperetin, rutin, quercetin, dan limonoids (Gattuso *et al.*, 2007).

Hesperetin dan quercetin adalah aglikon dari glikosida hesperidin dan quercitrin. Quercetin dapat ditemukan pada beragam sayuran dan buah-buahan dan telah lama dimanfaatkan dalam industri nutrasetikal dan farmasetikal sebagai suplemen kesehatan dan *food additives* karena aktifitas antioksidannya yang tinggi (Agnes *et al.*, 2008). Hasil-hasil penelitian melaporkan bahwa quercetin memiliki aktifitas-aktifitas anti inflamasi, anti hipertensif, vasodilator, anti obesitas, menurunkan kadar kolestrol dalam darah dan anti aterosklerotik (David *et al.*, 2016). Hesperetin diketahui memiliki sifat anti kanker dan anti bakteri (Aranganathan *et al.*, 2008), serta

antioksidan dan antiinflamasi (Yang *et al.*, 2012). Hesperetin juga memiliki aktifitas vasodilator sehingga berpotensi menurunkan tekanan darah pada kasus-kasus hipertensi. Saat ini senyawa hesperetin dan quercetin murni banyak dimanfaatkan oleh industri-industri farmasetikal dan nutrasetikal sebagai bahan aditif pada produk-produk suplemen kesehatan.

Senyawa golongan polifenol termasuk quercetin dan hesperetin tersebar pada berbagai bagian tanaman dengan konsentrasi yang berbeda-beda (Gözlekçi *et al.*, 2011). Pola sebaran ini perlu diteliti sehingga proses ekstraksi senyawa-senyawa yang diinginkan menjadi lebih efektif dan efisien. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui konsentrasi polifenol terlarut, hesperetin dan quercetin pada daun, kulit buah, dan isi buah *C. aurantifolia*

## METODE PENELITIAN

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah daun, kulit, dan isi buah *C. aurantifolia*, metanol 70%, bufer tris-HCl 0.35 M, *pyrogallol*, sodium diethyl-dithiocarbamate (Na-DEDTC), HCl, trifluoroacetic acid (TFA), senyawa standar quercetin dan hesperetin. Seluruh bahan kimia dan senyawa standar yang digunakan berkualitas pro analis (Sigma, USA).

Alat yang digunakan adalah mesin pengering *freeze drier* (Edwards, Britain), millipore 0,45  $\mu\text{m}$  (Scheleiner & Schuell,

Jerman), mesin sentrifugal (Heraeus Sepatech, Jerman), mesin sistem High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Waters, Milford, USA). Penelitian dilakukan di laboratorium Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Science and Environmental Studies, Universiti Putra Malaysia. Alat dan bahan disediakan oleh institusi yang sama.

#### **Determinasi Total Polifenol Terlarut**

Total polifenol terlarut pada sampel dideterminasi berdasarkan metode Forest dan Bendal (1969).

#### **Penyiapan Larutan Stok**

Dibuat larutan stok sebagai berikut:

1. 0,1 M *potassium titanium oxalate* dalam akuades
2. 0,35 M tris-HCl pH 6,7 dalam *double deionized water*
3. Metanol 70%
4. Metanol 10%

#### **Penyiapan Larutan Uji**

Sebanyak masing-masing satu gram sampel segar (daun, kulit buah, isi buah *C. aurantifolia*) dicampur dengan 10 mL metanol 70% dan dihaluskan dengan mortar dan pastel yang sudah didinginkan. Larutan sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Ekstraksi diulang sebanyak 4 kali, supernatan yang dihasilkan selanjutnya digunakan untuk mendeterminasi kandungan polifenol terlarut pada sampel.

Sebanyak 2 mL larutan *potassium titanium oxalate* 0,1 M, 1 mL 0,35 M larutan bufer tris-HCl pH 6,7, 1,0 mL ekstrak sampel, 0,5 mL metanol 70% dan 5,5 mL akuades sehingga didapat total 10 mL larutan campuran. Larutan campuran ini diukur absorbansinya pada panjang gelombang 445 nm dengan blanko larutan campuran tanpa ekstrak. Total polifenol terlarut dideterminasi dengan membandingkan terhadap kurva standar. Kurva standar menggunakan larutan

*pyrogallol* pada konsentrasi 0 sampai 800 µg/mL.

#### **Determinasi Senyawa Hesperitin dan Quercetin**

##### **Ekstraksi dan Hidrolisis Sampel**

Prosedur ekstraksi dan hidrolisis sampel dilakukan berdasarkan metode Crozier *et al.*, 1997. Kulit, daun dan isi buah *C. aurantifolia* masing-masing dikeringkan dengan mesin pengering *freeze drier* selama 3 hari, kemudian dihaluskan sehingga diperoleh sampel serbuk kering. Sebanyak satu gram serbuk kering dimaserasi dengan metanol 60% yang mengandung 20 mM Na-DEDTC selama 24 jam. Ekstrak diambil sebanyak 20 mL, ditambah dengan 5 mL larutan HCl 6 M selanjutnya direfluks pada suhu 90<sup>0</sup> selama 2 jam. Sebanyak 500 µL ekstrak terhidrolisis diambil dan dicampur 500 µL dengan ekstrak tidak terhidrolisis, kemudian diambil sebanyak 250 dan diencerkan dengan 250 µL akuades. Larutan diatur pada pH 2,5 dengan penambahan beberapa tetes TFA selanjutnya disaring dengan millipore 0,45 µm.

##### **Penyiapan Larutan Standar**

Masing-masing 1 mg hesperetin dan quercetin dilarutkan dalam 2 mL metanol 100%. Dari larutan tersebut masing-masing diambil 1 mL. dan ditambahkan dengan 20 mL metanol 62.5% yang mengandung 20 mM Na-DEDTC. Pada larutan ini ditambahkan lagi 5 mL HCl 6 M kemudian diencerkan dengan 50 mL akuades.

##### **Penggunaan HPLC**

Senyawa hesperitin dan quercetin pada sampel diuji menggunakan mesin system HPLC yang terdiri dari *Maxima 210 chromatography manager*, *Water 501 HPLC pump*, dan *Waters 486 tunable absorbance detector*. Pemisahan senyawa dilakukan menggunakan kolom 100 x 8

mm i.d., 4  $\mu$ m C18 Nova-Pak Radial-pak (Waters, USA). Sebagai fase gerak digunakan larutan *acetonitrile* 27,5% dengan penambahan beberapa tetes TFA hingga mencapai pH 2,5. Larutan disaring dengan millipore 0,45  $\mu$ m dan dihilangkan gelembung udara yang terlarut menggunakan ultra sonicater (sonicor, USA) selama 25 menit. Untuk analisis hesperitin dan quercetin, kolom dielusi (dialiri) dengan fase gerak pada kecepatan 1 mL/menit. Sebanyak 20  $\mu$ L masing-masing standard dan sampel secara terpisah disuntikan kedalam mesin HPLC. Jejak senyawa standar dan seyawasenyawa yang duiji dalam sampel dimonitor pada absorbansi 370 nm. Kehadiran hesperitin dan quercetin pada sampel diketahui dan dihitung dengan membandingkan terhadap waktu retensi dan tinggi puncak yang diperoleh pada standar (Gambar 1, 2, dan 3).

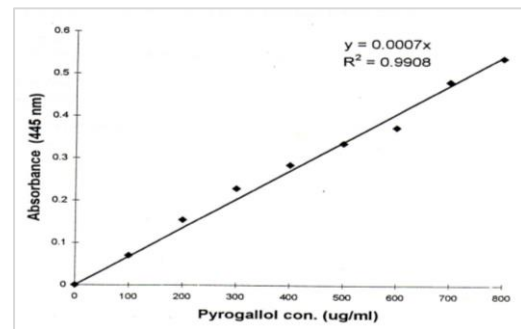
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kadar Total Polifenol Terlarut

Uji linearitas menggunakan senyawa standar *pyrogallol* pada panjang gelombang 485 nm menghasilkan kurva standar dengan persamaan  $Y=0.0007X$  dengan nilai  $R^2= 0,998$  (Gambar 1). Dari persamaan ini diperoleh kadar total polifenol terlarut pada sampel seperti terlihat pada Tabel 1.

Kandungan total polifenol paling tinggi yaitu 69,54 mg/g berat basah terdapat pada bagian kulit jeruk *C. aurantifolia* sedangkan paling rendah terdapat pada bagian isi buahnya. Rendahnya kandungan total polifenol terlarut pada isi buah dapat disebabkan

tingginya kadar air pada bagian isi buah karena kandungan total polifenol dihitung dari berat sampel segar. Namun secara keseluruhan kadar polifenol terlarut pada tanaman *C. aurantifolia* cukup tinggi dibandingkan beberapa jenis buah lainnya (Brat *et al.*, 2006).



**Gambar 1.** Kurva Standar Kadar Total Polifenol Terlarut

**Tabel 1.** Kandungan Total Polifenol Terlarut

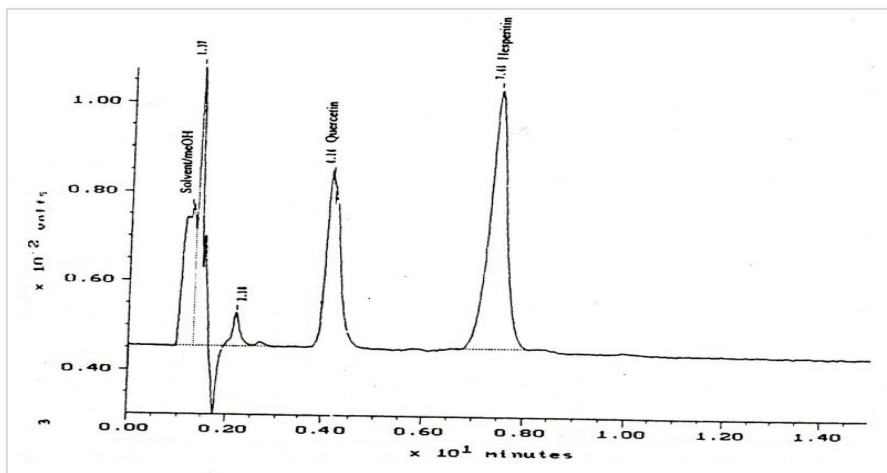
Sampel	Kadar Polifenol Terlarut (mg/g berat basah)
Daun	4,675
Kulit Buah	6,954
Isi Buah	2,243

### Kandungan Hesperitin dan Quercetin

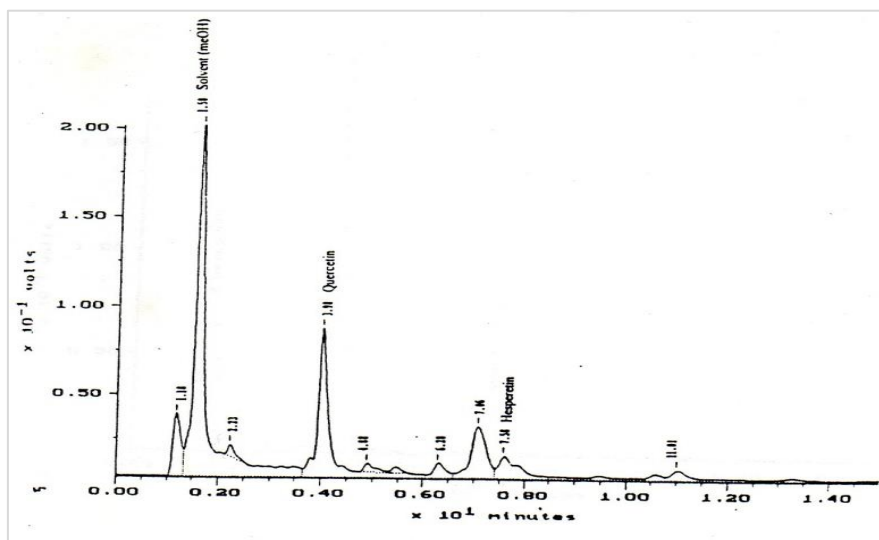
Dari kromatogram yang dihasilkan (Gambar 2-5) diketahui bahwa senyawa quercetin paling banyak terdapat pada isi buah, dan senyawa hesperetin paling banyak terdapat pada kulit buah. Kandungan hesperitin dan quercetin pada daun, kulit, dan isi buah *C. aurantifolia* dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Kadar Senyawa Hesperetin dan Quercetin pada Daun, Kulit Buah, dan Isi Buah *C. aurantifolia*

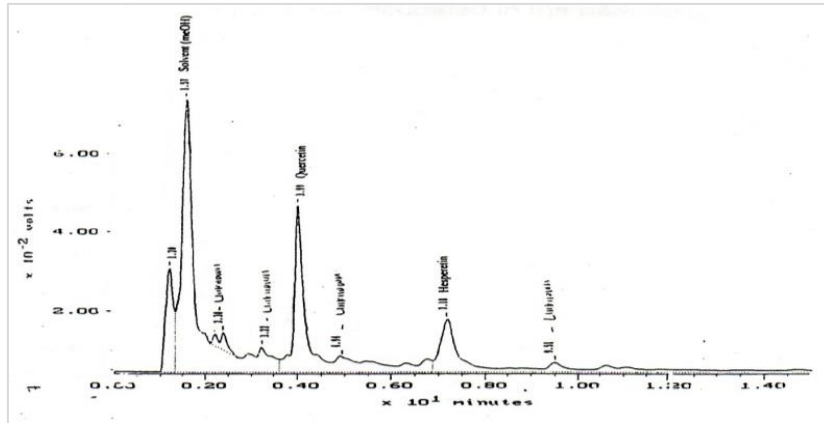
Sampel	Hesperitin ( $\mu\text{g/g}$ berat kering)	Quercetin ( $\mu\text{g/g}$ berat kering)
Daun	-	92,71
Kulit Buah	32,49	112,47
Isi Buah	58,43	89,49



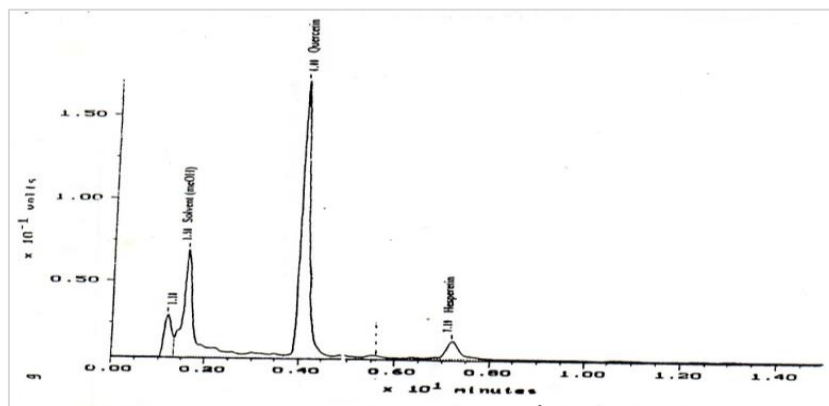
**Gambar 2.** Kromatogram standar Hesperetin dan Quercetin



**Gambar 3.** Kromatogram sampel ekstrak daun *C. aurantifolia*



**Gambar 4.** Kromatogram sampel ekstrak kulit buah *C. aurantifolia*



**Gambar 5.** Kromatogram sampel ekstrak isi buah *C. aurantifolia*

Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa kandungan quercetin tertinggi (112,47 µg/g berat kering) terdapat pada sampel kulit buah dan kandungan quercetin terendah ada pada isi buah (89,49 µg/g berat kering). Tingginya kandungan quercetin pada kulit buah sejalan dengan hasil pengukuran kandungan total polifenol terlarut dimana nilai tertinggi didapat dari pengukuran terhadap ekstrak kulit buah. Beberapa penelitian terhadap beberapa species *Citrus* lainnya juga menunjukkan bahwa kadar quercetin paling tinggi terdapat pada bagian kulit buah (Manthey dan Grohmann, 1996) sehingga limbah kulit buah jeruk memiliki nilai ekonomis tinggi sebagai bahan baku yang dapat diolah menjadi produk nutrasetikal yang aman dikonsumsi (Garg *et al.*, 2001).

Pengukuran terhadap kandungan hesperitin menunjukkan hasil yang berbeda dimana nilai tertinggi (58,43 µg/g berat kering) didapatkan dari pengukuran terhadap isi buah *C. aurantifolia*. Beberapa referensi secara umum menunjukkan kadar hesperetin yang cukup tinggi terdapat pada jus buah berbagai varietas jeruk. Tingginya kadar hesperitin pada isi buah jeruk ini dapat dikaitkan dengan tingginya aktifitas antioksidan, anti inflamasi dan hepatoprotektif sari buah jeruk (Tomar *et al.*, 2012).

## SIMPULAN

Dari data-data yang dihasilkan pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa setiap bagian tanaman *C. aurantifolia* mengandung senyawa-senyawa golongan polifenol, hesperitin dan quercetin dengan kadar yang berbeda-beda. Dengan demikian, ekstraksi senyawa yang diinginkan dapat lebih difokuskan pada satu bagian tanaman saja sehingga proses ekstraksi menjadi lebih optimal. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa limbah kulit jeruk *C. aurantifolia* berpotensi menjadi sumber

bahan baku penghasil senyawa murni quercetin karena dalam kulit jeruk mengandung kadar quercetin yang cukup tinggi.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencari metoda ekstraksi yang lebih efisien dalam mengekstrak senyawa murni hesperetin dan quercetin dari tanaman *C. aurantifolia*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aghel, N., Z. Ramezani, dan S. 2008. Beiranvand Hesperidin from *Citrus sinensis* cultivated in Dezful, Iran. *Pak J Biol Sci.* 11(20): 2451-2453.
- Aibinu, I., T. Adenipekun, T. Adelowotan, T. Ogunsanya dan T. Odugbemi T. 2007. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (lime fruit) as used locally. *African Journal of Traditional Complement and Alternative Medicine.* 4(2): 185-90.
- Anagnostopoulou, M.A., P. Kefalas, E. Kokkalou, A.N. Assimopoulou dan V.P. Papageorgiou. 2005. Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC–diode array detection–electrospray ionization mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 19:138-148.
- Aranganathan S., dan N. Nalini. 2013. Antiproliferative efficacy of hesperetin (*Citrus* flavonoid) in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Phytother Res.* 27: 999-1005.
- Aranganathan, S., J.P. Selvam dan N. Nalini. 2008. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on bacterial enzymes and carcinogen-induced aberrant crypt foci in colon cancer rats: a dose-dependent study. *J Pharm Pharmacol.* 60(10): 1385-1392.

- Boots, W.A. dan R.M. Guido. 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*. 585 (2-3): 325-337.
- Brat, P., S. George, A. Bellamy, L. Du Chaffaut, A. Scalbert, L. Mennen, N. Arnault dan M. J. Amiot. 2016. Daily Polyphenol Intake in France from Fruit and Vegetables. *The Journal of Nutrition*. 6: 2368-2374.
- Crozier, A., E. Jensen, M.E.C. Lean dan M.S. McDonald. 1997. Qualitative analysis of flavonoids by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 761: 315-321.
- Forest, G.I., dan D.S. Bendall. 1969. The distribution of polyphenol in the tea plant (*Camelia sinensis* L.). *Biochemistry Journal*. 113(5): 741-755.
- Garg A., S. Garg, L.J.D. Zaneveld dan A.K. Singla. 2001. Chemistry and Pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*. 15: 655-669.
- Gattuso, G., D. Barreca, C. Gargiulli, U. Leuzzi dan C. Carist. 2007. Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules*. 12(8): 1641-1673.
- Gözlekçi, S., O. Saraçoğlu, E. Onursal dan M. Özgen. 2011. Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacogn Mag*. 7(26): 161-164.
- Grabley, S. dan R. Thiericke. 1999. *Drug Discovery from Nature*. Springer. London. Springer. Hal. 5-7.
- Kawaii, S., Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa K, dan Yano M. 1999. Quantitation of flavonoid constituents in *Citrus* fruits. *J Agric Food Chem*. 47: 3565-3571.
- Manthey, J.A. dan K. Grohmann. 1996. Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts citrus and subtropical products laboratory. *J. Agric. Food Chem*. 44 (3): 811-814.
- Takumi, H., H. Nakamura, T. Simizu, R. Harada, T. Kometani T. Nadamoto dan R. Mukai. 2012. Bioavailability of orally administered water-dispersible hesperetin and its effect on peripheral vasodilatation in human subjects: Implication of endothelial functions of plasma conjugated metabolites. *J. Food Funct*. 3(4): 389-398.
- Tomar, A., M. Mall M dan P. Rai. 2013. Pharmacological Importance of Citrus Fruits. *Int J Pharm Sci Res*. 4(1): 156-160.
- Victor, A., A. David, R. Arulmoli R. dan S. Parasuraman. 2016. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn Rev*. 10(20): 84-89.
- Wu, T., Y. Guan dan J. Ye. 2007. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chem*. 100: 1573-1579.
- Yang, H.L., S.C. Chen, K. J. S. Kumar, K.N. Yu, S.Y. Tsai, Y.C. Hou dan Y.C. Hseu. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: An ex vivo approach. *J. Agric. Food Chem*. 60 (1): 522-532.