

Uji Aktivitas Penurunan Kadar Kolesterol Fraksi Etil Asetat Dan Senyawa Kuersetin Hasil KLTP Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) *In Vitro*

Nabila Ilmia Rizki, Aloysius Barry Anggoro^{*}, dan Etty Sulistyowati

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Yayasan Pharmasi Semarang

*email : edwardobarry11@gmail.com

Abstrak

Kolesterol merupakan unsur penting yang diperlukan tubuh, namun jika kadarnya tinggi dapat memicu penyakit hiperkolesterolemia, secara tradisional dapat diobati dengan kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle). Tujuan penelitian adalah untuk mengidentifikasi gugus fungsi kuersetin hasil KLTP, mengetahui konsentrasi optimal dan mengetahui perbedaan aktivitas penurunan kadar kolesterol dari fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis secara *in vitro*. Ekstraksi menggunakan remaserasi dengan pelarut etanol 70%. Ekstrak kental difraksinasi dengan etil asetat. Uji kualitatif meliputi skrining fitokimia dan uji KLT. Pemisahan senyawa kuersetin dengan metode Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP). Analisis gugus fungsi kuersetin hasil KLTP dengan spektrofotometer FTIR. Analisis kuantitatif aktivitas penurunan kadar kolesterol menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode *Zak*. Dibuat deret konsentrasi 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm dengan panjang gelombang 481,2 nm. Hasil analisis spektrum FTIR menunjukkan gugus fungsi O-H, C=O, C=C aromatik, C-O, C-O-C dan C-H aromatik yang sesuai dengan struktur kuersetin. Konsentrasi optimal fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP yaitu 300 ppm dengan menghasilkan rata-rata penurunan sebesar 53,70% dan 68,14%. Uji statistika memiliki nilai p 0,000 (<0,05) menunjukkan ada perbedaan aktivitas penurunan kadar kolesterol antara fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis secara *in vitro*.

Kata Kunci : fraksi etil asetat, KLTP, kuersetin, kulit jeruk nipis , *Zak*.

Abstract

Cholesterol is an important element that the body needs, but if high levels can trigger hypercholesterolemia, it can traditionally be treated with lime peel (Citrus aurantifolia Swingle). The purpose of this study was to identify the functional group of quercetin from KLTP results, to determine the optimal concentration, and to determine differences in cholesterol-lowering activity between the ethyl acetate fraction and quercetin compounds from lime peel KLTP in vitro. Extraction using remaceration with 70% ethanol solvent. The viscous extract was fractionated with ethyl acetate. Qualitative tests include phytochemical screening and TLC tests. Separation of quercetin compounds using the Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) method Analysis of quercetin functional groups from KLTP results using an FTIR spectrophotometer Quantitative analysis of cholesterol-lowering activity using a UV-Vis spectrophotometer with the Zak method A concentration series of 100, 150, 200, 250, 300, 350, and 400 ppm were made with a wavelength of 481.2 nm. The results of the FTIR spectrum analysis showed that the functional groups O-H, C=O, C=C aromatic, C-O, C-O-C, and C-H aromatic were in accordance with the structure of quercetin. The optimal concentration of the ethyl acetate fraction and quercetin compound produced by KLTP was 300 ppm with an average decrease of 53.70% and 68.14%, respectively. The statistical test has a sign value. 0.000 (<0.05) indicates that there is a difference in cholesterol level reduction activity between the ethyl acetate fraction and the quercetin compound from lime peel KLTP in vitro.

Keywords : ethyl acetate fraction, lime peel, PTLC, quercetin, *Zak*

1. PENDAHULUAN

Semakin modernnya kehidupan terutama di perkotaan menyebabkan perubahan gaya hidup, contohnya adalah perubahan pada pola makan. Dewasa ini, masyarakat lebih gemar mengonsumsi makanan cepat saji yang banyak mengandung kolesterol, kalori, dan lemak (Sudargo, dkk., 2018). Kolesterol merupakan bahan pembangun yang esensial bagi tubuh untuk mensintesis zat-zat penting. Kadar kolesterol normal pada tubuh manusia adalah <200 mg/dL (Katzung, 2018). Namun, apabila dikonsumsi dalam jumlah yang melebihi batas tersebut dapat menyebabkan penyakit hiperkolesterolemia (Iman, 2004).

Salah satu tanaman obat yang dapat digunakan untuk menurunkan kadar kolesterol adalah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle (Silalahi, 2020). Bagian jeruk nipis yang dapat dimanfaatkan untuk menurunkan kadar kolesterol yaitu kulitnya, karena mengandung senyawa flavonoid (Hindun *et al.*, 2017). Kulit jeruk nipis memiliki kandungan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan bagian lainnya seperti biji, buah, dan air perasan sari jeruk nipis (Ulya, Orienty, dan Hayati, 2019). Kadar flavonoid kuersetin pada kulit jeruk nipis kuantitasnya lebih tinggi dibandingkan pada bagian daun dan isi buahnya (Mahyuni, 2016).

Identifikasi gugus fungsi dilakukan menggunakan spektrofotometer *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR). Prinsip penggunaannya yaitu dengan menunjukkan adanya gugus-gugus fungsional molekul suatu senyawa (Sjahfirdi *et al.*, 2015). Metode *Zak* digunakan untuk mengetahui penurunan kadar kolesterol dikarenakan metode ini spesifik untuk mengukur senyawa golongan steroid (Maidin, Natsir, dan Dali, 2017).

Berdasarkan uraian tersebut, dilakukannya penelitian ini untuk mengidentifikasi gugus fungsi senyawa

kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis menggunakan spektrofotometer FTIR serta untuk mengetahui konsentrasi optimal dan perbedaan penurunan kadar kolesterol pada fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis secara *in vitro* dengan metode *Zak* menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

2. METODE

Obyek Penelitian

Obyek yang diteliti adalah analisis spektrum IR senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis menggunakan spektrofotometer FTIR serta aktivitas penurunan kadar kolesterol pada fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis dengan metode *Zak*.

Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis sebesar 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas penurunan kadar kolesterol oleh fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis yang dinyatakan dalam persentase. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah bagian yang digunakan kulit buah, metode ekstraksi remaserasi, pelarut ekstraksi etanol 70%, cara pengujian aktivitas penurunan kadar kolesterol dengan metode *Zak* menggunakan spektrofotometer UV-Vis, *operating time* selama 15 menit dan panjang gelombang maksimal yang digunakan 481,2 nm berdasarkan pengukuran.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan diantaranya *beaker glass* (Herma), toples kaca, neraca analitik, oven, cawan porselen, pipet tetes, labu takar (*Phyrex*), gelas ukur (Herma), pipet volume, *filler*, batang pengaduk, corong kaca, klem dan statif, pipa kapiler, corong pisah (Herma), *waterbath*,

chamber, kaca penutup *chamber*, lempeng silika gel GF₂₅₄, lampu UV 254 nm, erlenmeyer asah, *vial*, *vortex* (Health®), kuvet (Hellma Analytics), blender, *sentrifuge*, tabung reaksi (Phyrex), rak tabung, spektrofotometer FTIR (Agilent Technologies Cary 630), spektrofotometer UV-Vis (UV-1700 Shimadzu).

Bahan yang digunakan diantaranya simplisia kulit jeruk nipis, etanol 70% (Technical grade), *n*-heksana (Technical grade), etil asetat (Technical grade), etanol 40%, HCl_(p), serbuk Mg, amil alkohol, silika gel GF₂₅₄, toluen *p.a*, etil asetat *p.a*, asam formiat *p.a*, kloroform *p.a*, metanol *p.a*, penampak bercak uap amonia, baku pembanding kuersetin (Sigma Aldrich®), FeCl₃ dalam asam asetat glasial, H₂SO_{4(p)}, dan baku kontrol kolesterol murni (Sigma®).

Preparasi Sampel dan Ekstraksi

Determinasi tanaman jeruk nipis dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Yayasan Pharmasi Semarang. Kemudian diekstraksi dengan metode remaserasi menggunakan pelarut etanol 70% selama 3 hari. Sari kemudian dipekatkan dengan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental.

Fraksinasi

Ekstrak kental kulit jeruk nipis ditimbang seksama 5 gram kemudian dilarutkan dalam 150 mL etanol 40% lalu dimasukkan dalam corong pisah, kemudian ditambahkan 50 mL *n*-heksana. Fraksinasi diulang sebanyak tiga kali. Kemudian fraksi etanol 40% difraksinasi kembali dengan etil asetat 50 mL sebanyak tiga kali hingga diperoleh fraksi cair etil asetat dan etanol 40%. Fraksi etil asetat dipekatkan dengan *waterbath* hingga diperoleh fraksi kental. Kemudian fraksi kental dilakukan skrining fitokimia dan uji KLT.

Pemisahan Senyawa Kuersetin dengan KLTP

Sampel fraksi etil asetat kental kulit jeruk nipis dilarutkan dengan etil asetat

kemudian ditotolkan pada lempeng kaca yang sudah diaktifkan silikanya dengan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (4:3:0,4). Hasil pemisahan dengan pita yang sama dengan baku pembanding kuersetin dikerok. Serbuk hasil kerokan dilarutkan dalam etil asetat *p.a* dan disentrifugasi selama 10 menit. Kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas *whatman* no.1 dengan bantuan KVC. KLTP kering diuji kemurniannya dengan KLT dua dimensi menggunakan dua fase gerak yang berbeda yaitu toluen : etil asetat : asam formiat (4:3:0,4) dan kloroform : metanol (9:1) kemudian dilanjutkan dengan identifikasi gugus fungsi menggunakan spektrofotometer FTIR.

Penentuan Kadar Kolesterol Pada Sampel

Fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis dibuat konsentrasi sampel 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm dalam pelarut etanol. Kemudian masing-masing larutan diambil 0,4 mL dimasukkan dalam tabung reaksi; ditambahkan 2,0 mL baku kolesterol-etanol 500 ppm; 2,0 mL reagen H₂SO_{4(p)}; dan 3,0 mL FeCl₃ lalu divortex. Lapisan luar tabung ditutup dengan alumunium *foil* kemudian didiamkan 15 menit sesuai *operating time* dan diukur pada panjang gelombang maksimal 481,2 nm.

Analisis Data

Analisis data dilakukan uji kualitatif meliputi skrining fitokimia dan uji KLT. Spektrum IR yang diperoleh dari identifikasi gugus fungsi dengan FTIR dilakukan analisis deskriptif. Bilangan gelombang yang diperoleh diterjemahkan untuk mendapatkan gugus fungsi yang identik dengan gugus fungsi pada baku pembanding kuersetin.

Analisis data dilakukan uji kuantitatif dengan mengukur absorbansi kadar kolesterol fraksi etil asetat, senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis, dan

kontrol kemudian dihitung sebagai persentase penurunan kadar kolesterol.

Hasil persentase penurunan kadar kolesterol fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis kemudian dilakukan uji normalitas, uji homogenitas, uji anava, dan uji pasca anava dengan menggunakan program SPSS versi 23. Persentase penurunan kadar kolesterol ditentukan dengan rumus :

Persentase penurunan kadar kolesterol :

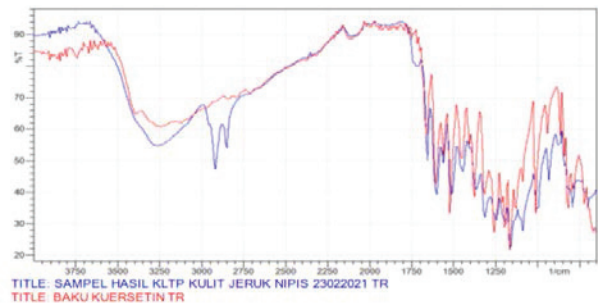
$$\frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100\%$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses ekstraksi untuk penarikan senyawa aktif dalam kulit jeruk nipis menggunakan metode remaserasi dengan pelarut etanol 70% karena pada ekstrak tersebut menghasilkan kandungan flavonoid total yang tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol 96% dan 50% (Riwanti, Izazih, dan Amaliyah, 2020). Rendemen ekstrak kental yang diperoleh sebesar 22,02%. Pada ekstrak masih terdapat senyawa yang kompleks sehingga perlu dipisahkan berdasarkan tingkat kepolaran dengan metode fraksinasi menggunakan corong pisah. Rendemen fraksi kental etil asetat yang diperoleh sebesar 10,37%. Fraksi etil asetat dilakukan skrining fitokimia dan uji KLT. Hasil yang diperoleh bahwa fraksi etil asetat kulit jeruk nipis positif mengandung senyawa flavonoid.

Pemisahan senyawa kuersetin menggunakan metode KLTP dengan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (4:3:0,4) menghasilkan pita sampel yang mendekati baku pembanding kuersetin. Hasil tersebut dikerok dan dilakukan proses purifikasi agar mendapatkan senyawa yang karakteristiknya mendekati kuersetin. Hasil KLTP diuji kemurniannya dengan KLT dua dimensi menggunakan dua fase gerak yaitu toluen : etil asetat :

asam formiat (4:3:0,4) dan kloroform : metanol (9:1). Hasil uji KLT dua dimensi menunjukkan terdapat noda tunggal yang menandakan mendekati kemurnian. Hasil KLTP kemudian diidentifikasi gugus fungsinya menggunakan spektrofotometer FTIR. *Overlay* bentuk pita serapan hasil KLTP kulit jeruk nipis dengan baku pembanding kuersetin ditampilkan pada gambar 1 dan hasil analisis gugus fungsi ditampilkan pada tabel 1.



Gambar 1. Overlay baku pembanding kuersetin dengan hasil KLTP kulit jeruk nipis

Berdasarkan hasil uji konfirmasi data FTIR menunjukkan bahwa hasil KLTP kulit jeruk nipis terdapat gugus fungsional O-H, C=O, C=C aromatik, C-O, C-O-C, dan C-H aromatik. Hal tersebut memperkuat dugaan bahwa senyawa yang terkandung adalah senyawa flavonoid golongan flavonol yaitu kuersetin.

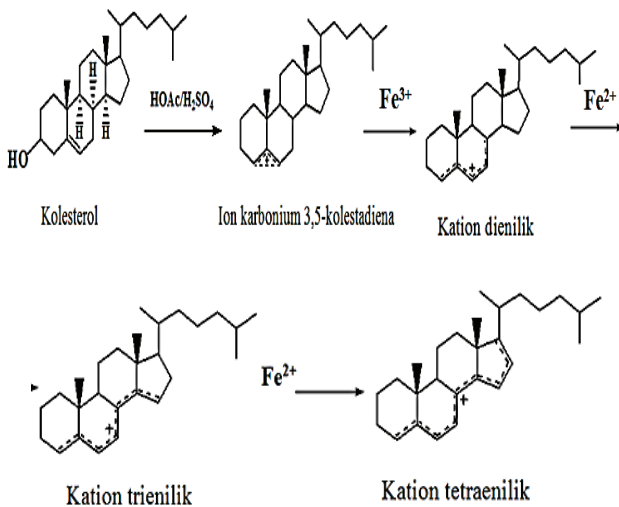
Tabel 1. Hasil analisis FTIR baku pembanding kuersetin dan hasil KLTP kulit jeruk nipis

Gugus fungsi	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)			Bentuk pita	Intensitas
	Pustaka	Baku pembanding kuersetin	Sampel		
O-H	3500 – 3200	3273	3269	Lebar	Sedang
C=O	1670 – 1640	1662	1655	Tajam	Kuat
C=C Aromatik	1600 – 1475	1558	1599	Tajam	Kuat
C-O	1300 – 1000	1256	1245	Tajam	Kuat
C-O-C	1140 – 1050	1129	1107	Tajam	Kuat
C-H Aromatik	900 – 690	865	880	Tajam	Kuat

(Sumber Pustaka : Stuart 2005)

Fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP dilanjutkan

pengukurannya dengan uji aktivitas penurunan kadar kolesterol secara *in vitro* menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode *Zak*. Prinsip metode tersebut didasarkan pada kemampuan mengikat kolesterol-etanol setelah penambahan sampel uji. Reaksi antara kolesterol dengan pereaksi *Zak* yaitu terjadinya protonasi gugus -OH dalam kolesterol selanjutnya terjadi reaksi dehidrasi yang kemudian menghasilkan ion karbonium 3,5-kolestadiena kemudian penambahan Fe^{3+} untuk mendapatkan senyawa berwarna yang selanjutnya akan terbentuk larutan kation tetraenilik yang berwarna jingga kemerahan. Diperlukan $H_2SO_4(p)$ sebagai katalisator dan reaksi pewarna $FeCl_3$ dalam asam asetat glasial sehingga terbentuk senyawa berwarna (Maidin, Natsir, dan Dali, 2017). Reaksi kolesterol dengan pereaksi *Zak* dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Reaksi kolesterol dengan metode *Zak* (Burke *et al.*, 1974)

Pengukuran sampel fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis dilakukan pada konsentrasi 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm. Masing-masing konsentrasi tersebut diambil 0,4 mL larutan sampel dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 2,0 mL larutan kolesterol-etanol 500 ppm kemudian direaksikan

dengan 2,0 mL $H_2SO_4(p)$ dan 3,0 mL $FeCl_3$ lalu divortex. Larutan uji ditutup aluminium foil selama 15 menit kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang 481,2 nm. Persen rata-rata penurunan kadar kolesterol pada fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis ditampilkan pada tabel 2.

Tabel 2. Data rata-rata persentase (%) penurunan kadar kolesterol

Konsentrasi (ppm)	Penurunan kolesterol (%)	
	Fraksi etil asetat	Senyawa kuersetin hasil KLTP
100	41,02	46,28
150	43,58	50,93
200	46,24	55,25
250	48,98	61,59
300	53,70	68,14
350	52,70	65,09
400	51,57	63,11

Berdasarkan hasil rata-rata persen penurunan kadar kolesterol diperoleh konsentrasi optimal yaitu pada 300 ppm dengan rata-rata penurunan kadar kolesterol fraksi etil asetat sebesar 53,70% dan hasil KLTP sebesar 68,14%. Analisis data hasil penelitian ini dianalisis secara statistik menggunakan SPSS versi 23. Data yang diperoleh adalah data yang normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji anava dua jalan. Hasil uji statistik menunjukkan nilai signifikansi ($0,000 < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan masing-masing kelompok fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis terdapat perbedaan yang signifikan dalam menurunkan kadar kolesterol secara *in vitro*.

4. SIMPULAN

Spektrum IR senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis menunjukkan adanya gugus fungsional kuersetin yaitu gugus O-H, C=O, C=C aromatik, C-O, C-O-C, dan C-H aromatik. Konsentrasi fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis menghasilkan aktivitas penurunan kadar kolesterol secara

optimal pada konsentrasi 300 ppm dengan rata-rata penurunan kadar kolesterol sebesar 53,70% dan 68,14%. Terdapat perbedaan aktivitas penurunan kadar kolesterol antara fraksi etil asetat dan senyawa kuersetin hasil KLTP kulit jeruk nipis secara *in vitro*.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Burke, R. W., B. I. Diamondstone, R. A. Velapoldi, and O. Menis. 1974. "Mechanisms of the Liebermann Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol." *Clinical Chemistry* 20 (7): 794–801. <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.7.794>.
- Hindun, Siti, Taofik Rusdiana, Marline Abdasah, and Reti Hindritiani. 2017. "Potency of Lemon Peel (Citrus Auronfolia) Waste as Tirosinase Inhibitor." *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 4 (2): 64.
- Iman, S. 2004. *Serangan Jantung Dan Stroke Hubungannya Dengan Lemak & Kolestrol*. 2nd ed. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Katzung, B.G. 2018. *Basic and Clinical Pharmacology*. Edited by PhD Bertram G. Katzung, MD. 14th ed. Mc.Graw Hill Education.
- Mahyuni, Siti. 2016. "Determinasi Kadar Total Polifenol Terlarut, Hesperitin Dan Quercetin Pada Daun, Kulit Dan Isi Buah Citrus Aurantifolia (Christm & Panzer) Swingle." *Jurnal Ilmiah Farmasi* 6 (1): 1–8. <https://doi.org/10.33751/jf.v6i1.749>.
- Maidin, Alfian Nasir, Hasnah Natsir, and Seniwati Dali. 2017. "Enzymatic Production of Chitosan from Waste of Rajungan Crab Shell and It's Application in Cholesterol Reduction by in Vitro Test." *Indonesia Chimica Acta* 10 (1): 25–34.
- Riwanti, Pramudita, Farizah Izazih, and Amaliyah. 2020. "Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Etanol Pada Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 50,70 Dan 96%." *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika* 2 (2): 82–95.
- Silalahi, Marina. 2020. "Pemanfaatan Citrus Aurantifolia (Christm. et Panz.) Sebagai Bahan Pangan Dan Obat Serta Bioaktivitas." *Sainmatika: Jurnal Ilmiah Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam* 17 (1): 80. <https://doi.org/10.31851/sainmatika.v17i1.3637>.
- Sjahfirdi, Luthfirda, Nikki Aldi, Hera Maheshwari, and Pudji Astuti. 2015. "Aplikasi Fourier Transform Infrared (FTIR) Dan Pengamatan Pembengkakan Genital Pada Spesies Primata, Lutung Jawa (Trachypithecus Auratus) Untuk Mendeteksi Masa Subur." *Jurnal Kedokteran Hewan - Indonesian Journal of Veterinary Sciences* 9 (2). <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v9i2.2837>.
- Stuart, Barbara H. 2005. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Vol. 8. <https://doi.org/10.1002/0470011149>.
- Sudargo, T., Freitag, H., Kusmayanti, N. A., & Rosiyani, F. 2018. *Pola Makan Dan Obesitas*. Edited by Hakimi; and Sugeng Eko Irianto. 1st ed. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Ulya, Miftha, Fauzia Nilam Orienty, and Maulida Hayati. 2019. "Efek Uji Daya Bunuh Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis (Citrus Auranti Folia) Terhadap Bakteri Streptococcus Mutans." *B-Dent, Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah* 5 (1): 30–37. <https://doi.org/10.33854/jbdjbd.135>.