

Senyawa Limonin dari Biji Jeruk *Citrus nobilis* var. *Microcarpa* (Jeruk Siam) dan Potensi Aktivasinya sebagai Penghambat Tumbuh Larva Instar ke-empat Nyamuk *Aedes Aegypti*

Jamaludin Al Anshori, Euis Julaeha, Tri Mayanti, Unang Supratman¹
Hideo Hayashi²

¹ Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Padjadjaran, Indonesia

² Division of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, Osaka Prefecture University, Jepang

ABSTRAK

Telah diisolasi suatu senyawa limonin dari biji jeruk *Citrus nobilis* var. *microcarpa* dengan metode kromatografi kolom. Senyawa tersebut berbentuk kristal putih dengan titik leleh 271-272°C, spektrum IR(KBr) menunjukkan adanya regang C-H metil (2970 cm⁻¹), regang C-H metilen (2920 cm⁻¹), regang C-H metin (2890 cm⁻¹), regang C=O (1760 dan 1720 cm⁻¹), lentur C-H metilen (1460 cm⁻¹), lentur C-H metil (1370 cm⁻¹). Serapan spektrofotometer UV terlihat pada panjang gelombang maksimum 224 nm. Analisis spektrometer massa menunjukkan *m/z* 470, dilengkapi dengan interpretasi spektrum ¹H- dan ¹³C-NMR menunjukkan rumus molekul C₂₆H₃₀O₈. Berdasarkan data spektroskopi tersebut yang dibandingkan terhadap literatur, disimpulkan bahwa senyawa tersebut adalah limonin. Uji pendahuluan isolat dengan konsentrasi 100 ppm dapat menghambat pertumbuhan larva nyamuk *Aedes aegypti* instar ke-empat 100% pada hari ke-tiga dibandingkan terhadap kontrol

Kata kunci: Limonin, limonoida, *Citrus nobilis*, Jeruk siam, *Aedes aegypti*.

PENDAHULUAN

Jeruk siam (*Citrus nobilis*) termasuk varietas yang paling banyak diusahakan dan paling luas penyebarannya. Diperkirakan pangsa pasar jeruk siam saat ini sekitar 60% dari semua jenis jeruk. Jeruk ini paling banyak digemari karena rasanya manis, tidak perlu diperas, dapat dimakan begitu saja.

Dari penelitian sebelumnya (Puri, 2001), telah diketahui bahwa ketiga ekstrak fraksi volatil dan nonvolatil dari kulit *Citrus nobilis* yaitu ekstrak heksana, diklorometana dan etil asetat, aktif terhadap nyamuk *Aedes aegypti*.

Senyawa limonoida ini sangat dominan sekali di dalam kulit dan biji jeruk, terutama senyawa limonin yang merupakan penyebab utama rasa pahit pada jeruk, kandungannya sangat dominan dan mudah didapat. Senyawa limonoida ini merupakan turunan triterpenoida, maka penelusurannya bisa menggunakan metode penapisan fitokimia, baik dengan pereaksi biasa maupun dengan pereaksi semprot. Kemudahan di dalam mendapatkan senyawa ini dibuktikan oleh peneliti sebelumnya (Jayaprakasha, *et al.*, 1997), yang memperoleh senyawa limonin ketika proses partisi, dengan bentuk kristal yang bisa dimurnikan langsung dengan rekristalisasi.

Bertolak dari hal di atas maka dalam penelitian ini akan dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa yang banyak memberikan keaktifan tersebut di atas, dimana secara kemitoksonomi senyawa tersebut akan terdapat juga pada seluruh genus *Citrus*, salah satunya berasal dari biji jeruk siam (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*). Disamping itu dilakukan uji hayati pendahuluan dengan menggunakan bioindikator larva nyamuk *Aedes aegypti*.

LANGKAH KERJA

Sampel dan Bahan Kimia

Jenis biji jeruk yang digunakan adalah biji jeruk siam (*Citrus nobilis* LOUR var. *microcarpa* Hassk) yang sudah dikeringkan pada suhu kamar dan dihaluskan.

Bahan kimia yang digunakan diantaranya adalah: Petroleum eter 60-80, metanol, etanol, diklorometana, kloroform, heksana, etil asetat, aseton, dan CDCl₃. Adsorben untuk kromatografi kolom gravitasi : silika Gel G 60 (60–70 mesh) dan (70–230 mesh), adsorben untuk kromatografi lapis tipis : silika Gel GF 254 dan penampak noda : H₂SO₄ 10% dalam etanol.

Bioindikator yang digunakan adalah larva nyamuk *Aedes aegypti* instar ke-empat, yang merupakan vektor penyakit demam berdarah.

Preparasi Sampel

Serbuk biji buah jeruk *Citrus nobilis* disokletasi dengan menggunakan pelarut petroleum eter 60-80. Residunya dimaserasi beberapa kali menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol pekat dipartisi beberapa kali dengan menggunakan pelarut diklorometana sehingga didapatkan ekstrak pekat diklorometana.

Pemisahan dengan kromatografi kolom gravitasi

Ekstrak pekat diklorometana dipisahkan dengan kromatografi kolom silika gel G 60 (60–70 mesh) dalam 50 g silika gel yang diseimbangkan dengan pengembang yang sesuai, dalam kolom kaca (100 cm x 2,5 cm), dielusi secara gradien. Fraksi target dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom gravitasi, menggunakan adsorben silika gel G 60(70–230 mesh) dan eluen yang cocok hasil uji coba KLT.

Pemurnian dengan kristalisasi

Eluat yang menunjukkan satu noda pada KLT, dikristalisasi dengan pelarut yang cocok, kristal yang muncul disaring dan dikeringkan di dalam oven dengan suhu sekitar 30-40°C.

Identifikasi dengan uji titik leleh, spektrometer ultralembayung, inframerah, massa, resonansi magnetik inti ^1H dan ^{13}C

Kristal hasil rekristalisasi diuji titik leleh, spektrometer ultralembayung, inframerah, massa, resonansi magnetik inti proton dan karbon.

Uji hayati

Pengembangan *Aedes aegypti*

Telur *Aedes aegypti* yang didapat berupa telur yang menempel pada kertas HVS, dimasukkan ke dalam tempat yang telah berisi air bersih berupa beaker gelas sampai telur menempel pada tempat yang terendam air. Diamati selama beberapa hari sampai telur menetas menjadi larva. Larva kemudian diberi makanan berupa pellet ikan atau tepung roti.

Uji hayati penghambat tumbuh

Sampel yang akan diuji dibuat stok konsentrasi 1000 ppm, kemudian dari stok konsentrasi tersebut dibuat konsentrasi 100 ppm dengan pengenceran untuk volume 50 mL di dalam beaker gelas. Konsentrasi contoh yang diujikan ditambah aseton 200 μL , kemudian dimasukkan ke dalamnya 10 ekor larva nyamuk pada *instar* ke-empat. Selanjutnya diamati tingkat hambatan pertumbuhan serta mortalitas larva nyamuk tersebut dalam jangka waktu tertentu dibandingkan terhadap kontrol.

HASIL

Hasil isolasi dari biji jeruk siam bebas lemak sebanyak 280,72 g diperoleh 48,47 g ekstrak pekat metanol. Hasil partisi 35,60 g ekstrak pekat metanol diperoleh 7,43 g ekstrak pekat diklorometan, dan dipisahkan dengan kolom kromatografi dengan elusi gradien sebanyak 5,00 g sehingga diperoleh 11 fraksi kolom. Hasil rekristalisasi fraksi VIII hasil kromatografi kolom diperoleh fraksi VIII.a berupa kristal murni dan karakteristik sebanyak 74,60 mg. Titik leleh fraksi VIII.a terukur pada 271-272°C, serapan spektrometri UV sebesar 3,67 terlihat pada λ_{maks} 224 nm, yang diperkirakan transisi $\pi - \pi^*$.

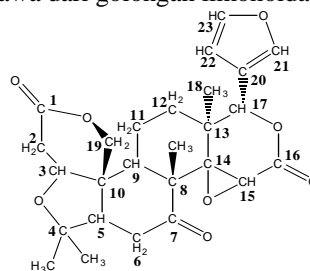
Interpretasi spektrum IR(KBr) menunjukkan adanya regang C-H metil (2970 cm^{-1}), regang C-H metilen (2920 cm^{-1}), regang C-H metin (2890 cm^{-1}), regang C=O (1760 dan 1720 cm^{-1}), lentur C-H metilen (1460 cm^{-1}), lentur C-H metil (1370 cm^{-1}). Spektrum massa menunjukkan berat molekul fraksi VIII.a pada m/z 470.

Interpretasi $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan ada dua α -proton furan [δ_{H} 7,41 (2H, d)], satu β -proton furan [δ_{H} 6,34 (1H, m)], empat proton metoksi [δ_{H} 5,47 (1H, s), 4,04 (2H, s), 2,68 (1H, m), dan 2,24 (1H, m)], dua α -proton karbonil [δ_{H} 2,92 (2H, m), dan 2,51 (2H, m)]. Menurut spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ ada satu C karbonil (δ_{C}

206,11), dua C karbonil ester lakton (δ_{C} 169,10, dan 166,62), dua α -C furan (δ_{C} 143,21, dan 141,10), dua β -C furan (δ_{C} 119,94, dan 109,65), enam C metoksi (δ_{C} 80,30, 79,12, 77,78, 65,65, 65,32, dan 60,50).

Hasil uji hayati pendahuluan senyawa fraksi VIII.a dengan konsentrasi 100 ppm terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti instar* ke-empat menunjukkan aktivitas penghambat tumbuh 100% pada hari ke-tiga setelah dibandingkan terhadap kontrol.

Berdasarkan data spektroskopi tersebut yang dibandingkan terhadap literatur sebelumnya, maka disimpulkan bahwa senyawa fraksi VIII.a adalah salah satu senyawa dari golongan limonoida yaitu limonin.



Limonin

Daftar Pustaka

1. Bennet, R.D., Hasegawa, S. 1981. Limonoids of *calamondin* seeds. *Tetrahedron*. 37. 17 – 24.
2. Bennet, R.D., Miyake, M., Dzaki, Y., and Hasegawa, S. 1991. Limonoid glukocides in *Citrus aurantium*. *Phytochemistry*. 30, 11, 3803 - 3805.
3. Dreyer, D. L. 1965. Citrus bitter principles-II: Application of NMR to structural and stereochemical problems. *Tetrahedron*. 21. 75 – 87.
4. Dreyer, D. L., Bennett, R. D. and Basa, S. C. 1976. Limonoids from *Atalantia monophylla* isolation and structure. *Tetrahedron*. 32. 2367 – 2373.
5. Friebolin, H. 1993. *Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy*. Translated by Becconsall, J., K. Second, enlarged edition. USA and Canada: VCH publishers.
6. Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Pereira, J., Sakariah, K.K. 1997. Limonoids from *Citrus reticulata* and their moult inhibiting activity in mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae. *Phytochemistry*, 44, 843-846.
7. Julaha, E. 1996. Penelusuran komponen aktif insektisidal kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) SWINGLE dengan bioindikator kutu beras (*Calandra oryzae*). *Publikasi Berkala Penelitian Pascasarjana Unpad*. Bandung : Unpad.
8. Ohta, H., Berhow, M., Bennet, R.D. and Hasegawa, S. 1992. Limonoids in seed of *Citrus hanaju*. *Phytochemistry*. 30, 11, 3905 - 3907.
9. Puri A. Agustinar. 2001. Skripsi : Penelusuran senyawa aktif insektisidal dari fraksi nonvolatil ekstrak etil asetat kulit buah *Citrus nobilis var. microcarpa* (jeruk siam) dengan bioindikator nyamuk *Aedes aegypti*. Jatinangor : Jurusan Kimia FMIPA Unpad.
10. Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C. 1991. *Spectrometric identification of organic compounds*. Fifth edition. New york : John Wiley & Sons, Inc.