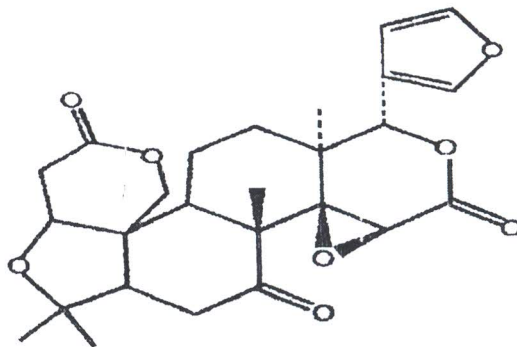


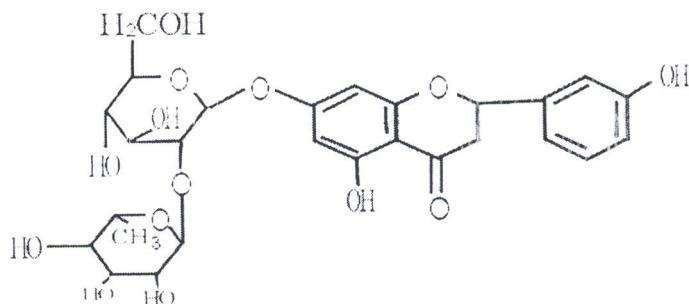
Senyawa prekursor yaitu *limonoic acid A-ring lacton* banyak ditemukan di dalam jaringan buah dan biji, senyawa yang mempunyai rasa tidak pahit ini susah untuk diisolasi karena mudah terlaktonisasi membentuk limonin. Limonin mempunyai kemampuan oksidasi yang kuat dan sifat inilah yang menyebabkan senyawa tersebut mempunyai kemampuan melawan sel tumor dan kanker. Aktivitas limonoid sebagai antikanker dicirikan dengan kemampuan senyawa ini dalam menghambat pertumbuhan estrogen reseptor negatif dan positif.



Gambar 1. Struktur kimia limonin

Naringin

Naringin (4,5,7-trihydroxyflavone-7-rhamnoglucoside) terdapat pada semua bagian buah jeruk, namun yang jumlahnya paling banyak terdapat pada bagian albedo yaitu di bawah permukaan kulit buah jeruk (Kimball, 1991) *dalam* (Kasigit, 2006). Kelarutan naringin dalam air meningkat sejalan dengan meningkatnya temperatur, dari 500 mg/l pada 20°C meningkat menjadi 1000 mg/l pada 75°C. Molekul naringin juga stabil pada temperatur yang tinggi. Karena kelarutannya, keberadaan naringin selama proses ekstraksi, selama pasteurisasi atau penyimpanan, dapat meningkatkan kepahitan pada sari buah. Kandungan naringin pada bahan baku sari buah menurun pada buah jeruk yang matang. Ambang batas sensorik untuk mendeteksi kepahitan yang disebabkan oleh naringin dalam air dilaporkan sekitar 20 mg/l (Braddock, 1981). Struktur bangun naringin seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur bangun naringin.

Naringin murni mempunyai berat molekul 580,59 Dalton, titik lebur 171°C, tidak dapat larut dalam air tapi larut dalam aseton, alkohol dan asam asetat. Naringin tergolong flavonoid, flavonoid lainnya adalah hesperidin, namun hesperidin tidak menimbulkan rasa pahit (Kimball, 1991) *dalam* (Kasigit, 2006).

Kepahitan naringin pada konsentrasi tertentu merupakan suatu karakter yang khas. Sebagai contoh, pada sari buah jeruk *grapefruit* (*Citrus paradisi*) yang mengandung 300-500 ppm naringin kepahitan pada sari buah ini disukai karena merupakan karakter sari buah yang khas dari jeruk *grapefruit*. Sari buah jeruk dengan kadar naringin di bawah 300 ppm memiliki rasa yang datar dan tidak disukai oleh konsumen karena dianggap tidak mempunyai kekhasan dari jeruk *grapefruit*. Sementara itu, sari buah jeruk *grapefruit* yang mempunyai kadar naringin di atas 700 ppm dianggap terlalu pahit oleh peminum sari buah tersebut pada umumnya (Rouseff, 1990) *dalam* (Kasigit, 2006).

KANDUNGAN NARINGIN DAN LIMONIN PADA BEBERAPA VARIETAS JERUK

Kandungan naringin dan limonin pada berbagai varietas jeruk berbeda-beda. Hal ini berkaitan erat dengan rasa palit yang dihasilkan pada produk olahannya. Sebagai gambaran beberapa hasil analisa kadar limonin dan naringin dari beberapa varietas buah jeruk antara lain pada Jeruk Nipis, Sunkist, Argentina, Siam Pontianak, Lokam Mandarin dan Medan yang dianalisa dengan menggunakan spektrofotometer dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil analisa menunjukkan bahwa Jeruk Siam Pontianak mempunyai kadar limonin sebesar 13,7 µg/L dan naringin sebesar 233,66 mg/L. Kadar limoninnya tergolong tinggi bila dibandingkan dengan jenis jeruk yang lain seperti Jeruk Medan, Jeruk Argentina dan Jeruk Sunkist yang menurut hasil pengukuran tidak terdeteksi. Demikian juga untuk kadar naringin, masih lebih tinggi dari Jeruk Lokam Mandarin, Medan, Nipis dan hampir sama dengan Jeruk Sunkist. Menurut Chandler *et al.* (1966), sari buah jeruk dengan kandungan limonin kurang dari 6 ppm dapat dikatakan tidak pahit, 9 ppm berasa pahit dan 24-30 ppm memiliki rasa sangat pahit. Jeruk Nipis mempunyai kadar limonin yang paling tinggi yakni mencapai 16,25 µg/L, hal ini wajar saja karena Jeruk Nipis mempunyai rasa yang pahit.

Tabel 1. Kadar limonin dan naringin pada beberapa varietas buah jeruk

Varietas Jeruk	Kadar naringin (mg/L.)	Kadar limonin (µg/L.)
Nipis	124,04	16,25
Sunkist	237,79	-
Argentina	Tidak dianalisa	3,13
Siam Pontianak	233,66	13,70
Medan	165,40	4,30
Lokam Mandarin	90,94	Tidak dianalisa

Keterangan: - limonin tidak terdeteksi

SUMBER DAN SINTESA SENYAWA NARINGIN DAN LIMONIN

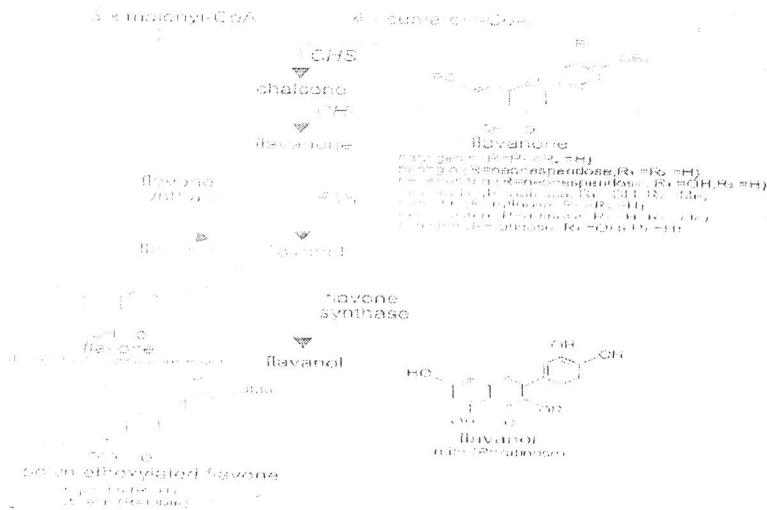
Limonoid telah dapat diisolasi dari berbagai tanaman dari famili Rutales, Meliaceae dan Rutaceae. Salah satu tanaman yang termasuk dalam famili Rutaceae adalah jeruk. Sumber limonin dapat diperoleh dari berbagai jenis jeruk, diantaranya dari *Citrus reticulata*, *Citrus sudachi*, dan *Citrus unshiu*. Kebanyakan limonoid terdapat pada bagian biji. Buah jeruk mengandung 36 senyawa limonoid aglicon dan 17 limonoid glikosidik (Roy dan Saraf, 2005).

Kandungan flavonoid seperti flavonone glycosida, hesperidin, nomilin dan flavonoid lainnya dalam buah jeruk cukup besar konsentrasinya. Dalam buah jeruk yang masak, keberadaan flavonoid tersebar ke semua bagian buah (albedo, 30-50% dari total; biji, inti dan pulp, 20-50%; flavedo, 10-20%) (Braddock, 1981).

Biosintesis Flavonoid

Biosintesis flavonoid dalam tanaman melibatkan enzim *chalcone synthase* (CHS) sebagai enzim pertama. *Naringenin chalcone* yang merupakan produk dari reaksi CHS kemudian dikonversi menjadi bentuk flavanon oleh reaksi intra molekular dimana cincin C ditutup oleh enzim *chalcone isomerase* (CHI). Dua bentuk naringenin ini, yaitu bentuk *chalcone* dan bentuk flavanon menjadi prekursor untuk semua komponen yang diproduksi oleh tanaman dengan struktur yang berhubungan (Gambar 3) Selanjutnya oleh 3 β -hydroxylation, 3 β -hidroksilase flavanon mengkatalisasi konversi (2S)-flavanon menjadi (2R,3R)-dihidroflavonol yang merupakan intermediat dalam biosintesis flavonol, anthosianidin, katekin dan proantosianidin. Di dalam jeruk terkandung sejumlah besar flavonoid, terutama glikosida flavanon. Flavanon dimodifikasi menjadi berbagai macam turunannya melalui reaksi hidroksilasi, metilasi, glukosilasi, dan kemudian ramosilasi. Kelompok glikosidik yang umum terdapat dalam jeruk adalah diglikosida rhamosa-glukosa yang ditampilkan dalam dua bentuk isomer yaitu neohesperidosa dan rutinosa. Neohesperidosa flavanon yang banyak terdapat dalam jeruk adalah naringin, poncirin, neoeriositrin dan neohesperidin. Komponen-komponen inilah yang memberi rasa pahit pada jeruk.

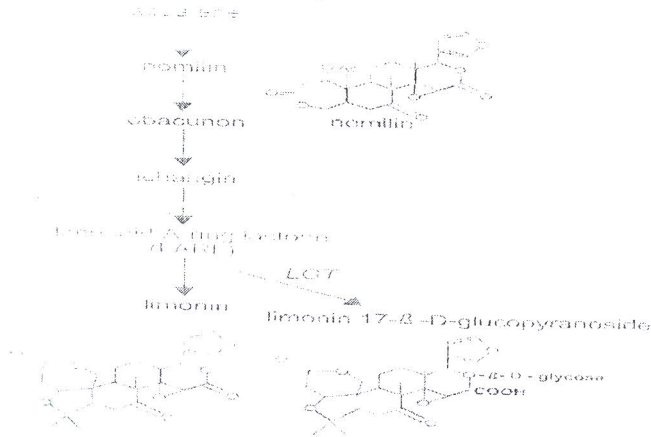
Berdasarkan hasil beberapa penelitian biokimia, pada jeruk jenis *grapefruit* (*C. paradisi* Macf, cv 'Duncan') diketahui bahwa sejumlah besar naringin terakumulasi dalam jaringan yang sangat muda, dan sedikit sekali yang ditemukan dalam jaringan yang lebih tua. Penelitian lain menggunakan label radioaktif untuk akhirnya mengetahui bahwa naringin terdapat lebih banyak dalam *grapefruit* yang belum matang dibandingkan dalam keadaan matang. Penelitian serupa, menunjukkan bahwa naringin disintesis dalam daun-daun muda yang kemudian ditransportasikan ke bagian lain tanaman, tetapi tidak disintesis dalam batang maupun akar. Secara umum, hasil-hasil penelitian tersebut mengindikasikan bahwa biosintesis glikosida flavanon terjadi selama tahap pembelahan dan diferensiasi sel dan tidak terjadi dalam tahap elongasi dan maturasi (Moriguchi *et al.*, 2003).



Gambar 3. Biosintesis senyawa flavonoid

Biosintesis Limonoid

Limonoid yang terkandung dalam buah jeruk merupakan aglikon limonoid dan glukosida limonoid. Sejauh ini, dari buah jeruk telah diisolasi sebanyak 36 aglikon limonoid dan 17 glukosida limonoid. Aglikon ini diklasifikasi dalam 4 kelompok taksonomi yaitu kelompok jeruk (19 limonoid), kelompok Fortunella (12 limonoid), kelompok papedocitrus (1 limonoid) dan kelompok Poncitrus (4 limonoid). Untuk mengetahui alur biosintesis dari tiap kelompok ini digunakan label radioaktif. Salah satunya nomilin, yang kemudian diketahui dibiosintesis dari asetat, mevalonat dan/atau *farnesyl pyrophosphate* di bagian floem batang tanaman. Nomiin yang merupakan prekursor ini selanjutnya bermigrasi ke jaringan lain seperti daun, buah dan biji.



Gambar 4. Biosintesa senyawa limonoid

Aglikon limonoid dapat dikonversi menjadi turunan 17β -D-glukopiranosida yang tidak pahit, seperti 17β -D-glukopiranosida limonin selama masa maturasi. Proses *debittering* yang berlangsung natural ini dikatalisasi oleh enzim UDP-D-glukosa yaitu limonoid glucosyltransferase (Gambar 4). Enzim ini bertanggung jawab terhadap proses glukosidasi semua aglikon limonoid menjadi glukosidanya. Enzim *limonoid glucosyltransferase* (Gtase) mulai digunakan dalam proses manipulasi genetik untuk menghasilkan buah jeruk yang bebas dari kepahitan yang ditimbulkan oleh limonin.

SENYAWA NARINGIN DAN LIMONIN SEBAGAI OBAT

Limonoid sebagai Senyawa Obat

Beberapa penelitian melaporkan penggunaan limonoid sebagai bahan obat berbagai penyakit, antara lain :

1. Kanker payudara, Tian *et al.* (2001) melaporkan Limonin dari buah jeruk dan jus jeruk mampu menghambat estrogen reseptor negatif dan positif pada jaringan sel payudara dan mampu menghentikan pertumbuhan sel neuroblastoma.
2. Penghambat senyawa karsinogenik pada organ sel manusia seperti paru-paru, kulit dan kolon (Tsuda *et al.*, 2004).
3. Pada 100 $\mu\text{g/ml}$ limonin mampu menghambat kanker ovarium SKOV-3 (Tian *et al.*, 2001).
4. Detoksifikasi. Pada percobaan dengan menggunakan tikus, 1-10 mg limonin per hari mempunyai efek detoksifikasi (Kelly *et al.*, 2003).
5. Menghambat perbanyakan virus HIV. Limonin konsentrasi 60 μM dan nomilin 52,2 μM mampu menghambat proliferasi virus HIV, pada konsentrasi limonin 61 μM dan nomilin 76,2 μM menghambat produksi HIV-p24 antigen, serta menghambat perbanyakan virus pada sel yang telah terinfeksi HIV pada konsentrasi 20 s/d 80 μM , efeknya mulai pada hari ke 14 dan maksimum pada hari ke 18. Antara limonin dan naringin tidak ada efek penghambatan yang drastis (Battinelli *et al.*, 2003).
6. Anti malaria. Gedunin, nimbin, nimbolide dan beberapa senyawa limonoid lainnya dilaporkan mempunyai aktivitas anti malaria secara *in vitro* pada *P. falciparum* di Uganda (Roy dan Saraf, 2005).
7. Anti mikroba. Penelitian dari Abdelgalielel *et al.* (2005) menyebutkan limonoid mempunyai aktivitas sebagai anti bakteri dan antifungal.
8. Menurunkan kolesterol. Pada kelinci percobaan, limonoid dari *grapefruit* mampu menurunkan *low density* kolesterol (Manners dan Hasegawa, 2000).

Flavonoid sebagai Senyawa Obat

Penelitian tentang naringin sebagai bahan obat antara lain adalah :

1. Sebagai pencegah dan mengurangi sel tumor pada kolon (Tsuda *et al.*, 2004).
2. Sebagai antioksidan. Naringin sebagai antioksidan telah dilakukan penelitian dengan menggunakan tikus yang diberi ransom sebesar 2 mg/kg dan dilakukan radiasi dengan sinar gamma, hasilnya naringin mampu menghambat kenaikan peroksidasi lipid, dengan kata lain bahwa naringin mampu melindungi hati dan usus tikus dari kerusakan oleh radiasi melalui peningkatan antioksidan dan mengurangi peroksidasi lipid (Jagetia dan Eddy, 2005). Selain itu 0,05% naringin yang diberikan pada kelinci selama 8 minggu mempunyai efek meningkatkan efektivitas antioksidan seperti meningkatkan SOD (*Super Oxide Dismutase*) dan aktivitas katalase serta ekspresi gen yang mengontrol produksi SOD, katalase dan G-px (*Glutation peroksidase*) serta melindungi vitamin E pada plasma (Jeon *et al.*, 2001).
3. Mengontrol kenaikan gula darah. Dengan 0,2 g/kg ransum tikus yang dikondisikan untuk menderita diabetes tipe 2, baik naringin maupun hesperidin ternyata mampu mengontrol kenaikan gula darah, trigliserida dan kolesterol dengan membuang trigliserida dan kolesterol ke dalam kotoran (Jung *et al.* 2005).

ANALISIS NARINGIN DAN LIMONIN

Analisa Limonin

Naringin dan limonin dapat dianalisa dengan spektrofotometer. Caranya cukup mudah dan hasilnya pun cukup akurat. Analisa limonin dimulai dari persiapan sampel jeruk dibuat menjadi jus selanjutnya sebanyak 1500 gram jus jeruk disentrifius pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan ditampung dalam wadah lalu diambil 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 2 ml chloroform dan di-shaker selama 2 menit maka akan terbentuk dua fase yang terpisah.

Pada fase yang berwarna jernih di bagian bawah diambil 1 ml dan dimasukkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan 1,5 ml pereaksi Burnham lalu dibiarkan dalam suhu ruang selama 15 menit untuk pengembangan warna. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 503 nm. Hasil absorbansi diplotkan pada kurva standar limonin pada berbagai tingkatan konsentrasi untuk mendapatkan konsentrasi limonin sampel (Abbasi *et al.*, 2005). Pereaksi Burnham merupakan campuran dari beberapa bahan dengan perbandingan 4-(dimethylamino) benzaldehyde 0,1 g, glacial acetic acid 3 ml dan perchloric acid 2,4 ml.

Analisa Naringin

Tahap awalnya sama dengan analisis limonin, supernatan diambil sebanyak 0,1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 0,1 ml NaOH 4N dan 10 ml diethylene glycol lalu di vortex agar homogen. Selanjutnya dibiarkan pada suhu ruang untuk reaksi pengembangan warna dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm. Hasil absorbansi di plotkan pada kurva standar naringin pada berbagai tingkatan konsentrasi untuk mendapatkan konsentrasi naringin sampel (Nagy *et al.*, 1977; Mishra dan Kar, 2003).

Pada prinsipnya uji ini mereaksikan naringin atau beberapa flavonoid dengan diethylene glycol dalam kondisi basa untuk membentuk chalcone yang menimbulkan warna kuning (Kimball, 1991 *dalam* Kasigit, 2006). Kelemahan dari metode ini adalah tidak hanya mengukur kadar naringin saja, tetapi juga flavonoid lainnya yaitu narirutin.

IMPLIKASI

Berdasarkan hasil-hasil penelitian tersebut, flavonoid dan limonoid sangat besar potensinya sebagai bahan obat. Di dalam kultur maupun hewan percobaan memang terbukti bahwa kedua senyawa ini mampu mengatasi berbagai macam jenis penyakit berbahaya. Namun demikian, penelitian lanjutan masih diperlukan. Percobaan dengan epidemi juga dianggap kurang valid. Yang dianggap paling valid adalah dengan percobaan menggunakan manusia dengan studi yang disebut *trial random* terkontrol dengan model *double blind system*, dimana baik peneliti maupun pencoba obat tidak tahu hingga akhir percobaan dengan memberikan placebo. Sayangnya percobaan ini biayanya sangat mahal, misalnya untuk studi beta karoten memerlukan 29.000 laki-laki dengan waktu 8 tahun dan biaya 43 juta dolar (Langseth, 2000).

Sampai saat ini, senyawa limonin dan naringin masih sulit diisolasi dan membutuhkan biaya yang cukup besar. Sehingga cara paling mudah untuk memperoleh manfaat senyawa naringin dan limonin adalah dengan mengkonsumsi jeruk dan produk olahannya. Produk olahan natural jeruk seperti jus sarimurni (jus tanpa tambahan apapun) dan ampas jus (limbah pengolahan jus dengan membran) merupakan produk yang kaya akan kandungan senyawa flavonoid dan limonoid. Jus jeruk sarimurni memiliki limonin dan naringin yang lebih tinggi dengan total padatan terlarut yang rendah karena proses pengolahan ternyata mampu meningkatkan kandungan limonin dan naringin. Hasil penelitian Setyadjit *et al.* (2006) menunjukkan bahwa pada Jeruk Siam yang belum diolah mengandung naringin sebesar 233,66 mg/L dan limonin sebesar 13,70 µg/L. Kadar senyawa tersebut meningkat setelah jeruk diolah menjadi jus sari murni yaitu naringin sebesar 545,97 mg/L dan limonin sebesar 14,42 µg/L. Oleh karena itu banyak-banyaklah mengkonsumsi buah jeruk dan jus jeruk untuk memperoleh manfaat tersebut.

KESIMPULAN

Buah jeruk berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan obat biofarmaka karena kandungan senyawa flavonoid dan limonoidnya baik pada jus, biji dan albedonya. Berbagai penelitian menyebutkan bahwa senyawa tersebut bersifat bioaktif yang mampu melawan berbagai penyakit pada dosis tertentu. Limonoid mampu melawan sel kanker payudara, ovarium, menghambat senyawa karsinogenik, detoksifikasi, anti malaria, anti mikroba dan menghambat virus HIV. Sementara itu pada dosis tertentu flavonoid mampu mengurangi sel tumor pada kolon, sebagai antioksidan dan mampu mengontrol gula darah. Walaupun kebanyakan penelitian masih *in vitro* namun sudah cukup kuat dijadikan sebagai bukti meskipun masih harus dilakukan penelitian dengan menggunakan manusia sebagai percobaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbasi, S., P. Zandi, and E. Mirbagheri. 2005. Quantification of limonin in Iranian orange juice concentrates using High Performance Liquid Chromatography and Spectrophotometric Method . *Eur. Food Res. Technol* 221: 202-207.
- Abdelgaliel., Bajwa, R and S. Shatique. 2005. Appraisal of antifungal activity of *Aloe vera*. *Mycopath*, 5(1): 5-9.
- Battinelli, L., F. Mengoni, M. Lichtner, G. Mazanti, A. Saija, C.M. Mastroianni and V. Vullo. 2003. Effect of Limonin and Nomilin on HIV-1 Replication on Infected Human Mononuclear Cells. Departement of Pharmacology of Natural Substances and General Physiology. University La Sapienza. Italy.32:310-315.
- Braddcock, R.J. 1981. Pectinase Treatment of Raw Orange Juice and Subsequent Quality Changes in 60° Brix Concentrate Proceeding. *Florida State Horticulture Soc.* 94: 270-273.
- Candler, B.V. 1971 (Dalam teks 1966). Some Solubility Relationships of Limonin. Their Importance in Orange Juice Bitterness.(CSIRO Food Researches.31: 36-40.
- Jagetia, G.C and T.K. Reddy. 2005. Modulation of radiation-induced alteration in the antioxidant status of mice by naringin. *J.Life Science* 77: 780-794.
- Jeon, S.M., S.H. Bok, M.K. Jang, M.K. Lee, K.T. Nam, Y.B. Park, S.J. Rhee and M.S. Choi. 2001. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *J. Life Sciences* 69: 2855-2866.
- Jitputdeebodintr, S., Chantachum, S., Ratanaphan A, dan K. Chantapromma. 2005. Stability of limonin from lime seeds. *J.Agric. Environ.* 3(2): 99-100.

- Jung, U.J., M.K. Lee, Y.B. Park, M.A. Kang and M.S. Choi. 2006 (Dalam teks tahun 2005). Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38 (7): 1134-1145.
- Kasigit,L. 2006. Pengaruh CMC (*Carboxy Methyl Celullose*) dan enzim naringinase terhadap kepahitan dan mutu sari buah jeruk Siam. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. IPB. Bogor.
- Kelly, C., Jewell,C and N.M. O'Brien. The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin and nomilin on xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat. 2003.*J.Nutrition Research* 23: 681-690.
- Koul O, Multani J.S., Singh G., Daniewiski, W.M., dan S. Berlozecki. 6 β -Hydroxygedunin from *Azadirachta indica*. Its potentiation effect with some non azadirachtin limonoids in neem against lepidopteran larvae. 2004. *J.Agric. Food Chem.* 51: 2937-2942.
- Langseth, L. 2000. Antioxidanths and their effect on health. *In: Schmidl, M.K. and Labuza, T.P. (Eds.). Essentials of Functional Foods. Aspen Publ, Gaithersburg.* 303-317.
- Manners,G and S. Hasegawa.2005. Bioavailability of citrus limonoid to humans. *J.of Agric Food Chem* 51: 4156-4161.
- Mishra, P and R. Kar. 2003. Treatment of grapefruit juice bitterness removal by amberlite IR 400 and alginate entapped naringinase enzyme. *J. of Food Science* 6(4): 1229-1233.
- Moriguchi, T., K. Masayuki, S. Hasegawa and M. Omura. 2003. Molecular approach to citrus flavonoid and limonoid biosynthesis. *Food Agriculture & Environment* 1 (1): 22-25.
- Nagy, S., P.E. Shaw and M.K. Veldhuis. 1977. Citrus Science and Technology. Vol. 1. Fruit production, processing. 397.
- Roy and Saraf, 2005. Limonoid: Overview of Significant Bioctive of Triterpenes *Distributed in Plants Kingdom. Biol. Pharm.Bull.*29(2): 191-201.
- Setyadjit, Dondy ASB, Ermi Sukasih, Niken Harimurti, Agus Budiyanto, Kun Tanti D, Iceu Agustinisari, Ira Mulyawanti, Sjaifullah, Yulianingsih, Ridwan Thahir dan Murtiningsih 2006. Pengembangan Teknologi Penanganan dan Pengolahan Jeruk. Laporan Akhir Tahun. BE. Litbang Pascapanen Pertanian.

- Tian, Q., E.G. Miller, H. Ahmad, Tang and B.S. Patil. 2001. Differential Inhibition of Human Cancer Cell Proliferation by Citrus Limonoids. *Nutrition and Cancer*, 40(2): 180-184.
- Tsuda, H., Y. Ohshima, H. Nomoto, K. Fujita, E. Matsuda, I. Masaaki, T. Nobuo and M.A. Moore. 2004 . Cancer prevention by natural compounds.. *J. Drug Metab. Pharmacokin.* 19(4): 245-253.