

Aktivitas Antioksidan dan Inhibitor Enzim Tirosinase Ekstrak Daun Jeruk Manis (*Citrus sinensis* L.)

Runitasari Saragih¹, Edy Fachrial^{2,3*}, Nerly Juli Pranita Simanjuntak⁴

¹Program Studi Sarjana Farmasi Klinis, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Prima Indonesia, Medan, 20118, Indonesia

²Departemen Magister Ilmu Biomedis, Fakultas Kedokteran dan Kedokteran Gigi, Universitas Prima Indonesia, Medan, 20118, Indonesia

^{3,4}PUI Phyto Degenerative & Lifestyle Medicine, Universitas Prima Indonesia
edyfachrial@unprimdn.ac.id

ABSTRACT

Sweet orange leaves (Citrus sinensis L.) are a potential source of bioactive compounds that can be developed as natural antioxidants and tyrosinase inhibitors for the prevention of premature skin aging and hyperpigmentation. This study aimed to evaluate the phytochemical constituents, antioxidant activity, and tyrosinase inhibitory potential of the ethanol extract of sweet orange leaves. Extraction was carried out using ultrasonic-assisted extraction with 70% ethanol as the solvent. Phytochemical screening revealed the presence of flavonoids, tannins, alkaloids, and steroids, while saponins were not detected. Antioxidant activity was evaluated using the DPPH radical scavenging method at concentrations of 200–500 ppm and showed a concentration-dependent increase in inhibition, with values of 76.46% (200 ppm), 78.61% (300 ppm), 82.32% (400 ppm), and 84.43% (500 ppm), indicating strong antioxidant activity. Tyrosinase inhibition was assessed using L-DOPA as the substrate and demonstrated inhibition percentages of 51.13% and 51.01%, indicating good inhibitory activity. Based on these findings, the ethanol extract of sweet orange leaves exhibits promising antioxidant and tyrosinase inhibitory properties and may be further developed for pharmaceutical and cosmetic applications, particularly as natural anti-aging and antihyperpigmentation agents.

Keywords : Phytochemical screening, Antioxidant activity, DPPH, tyrosinase inhibition, sweet orange leaf, *Citrus sinensis* L.

ABSTRAK

Daun jeruk manis (*Citrus sinensis* L.) merupakan sumber senyawa bioaktif yang berpotensi dikembangkan sebagai bahan alami antioksidan dan agen penghambat enzim tirosinase untuk pencegahan penuaan dini dan hiperpigmentasi kulit. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kandungan fitokimia, aktivitas antioksidan, serta kemampuan inhibisi enzim tirosinase dari ekstrak etanol daun jeruk manis. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode ultrasonikasi dengan pelarut etanol 70%. Skrining fitokimia menunjukkan hasil positif terhadap flavonoid, tanin, alkaloid, dan steroid, sedangkan saponin tidak terdeteksi. Aktivitas antioksidan diuji menggunakan metode DPPH pada konsentrasi 200–500 ppm dan menunjukkan peningkatan persentase inhibisi seiring dengan peningkatan konsentrasi, yaitu sebesar 76,46% (200 ppm), 78,61% (300 ppm), 82,32% (400 ppm), dan 84,43% (500 ppm), yang mengindikasikan aktivitas antioksidan kuat. Uji inhibisi enzim tirosinase menggunakan substrat L-DOPA menunjukkan persentase penghambatan sebesar 51,13% dan 51,01%, menandakan kemampuan inhibisi enzim yang baik. Berdasarkan hasil tersebut, ekstrak etanol daun jeruk manis memiliki potensi sebagai sumber bahan alam dengan aktivitas antioksidan dan penghambatan enzim tirosinase yang relevan untuk pengembangan produk farmasi dan kosmetik, khususnya sebagai agen anti-aging dan antihiperpigmentasi.

Kata kunci : Skrining fitokimia, aktivitas antioksidan, DPPH, penghambatan tirosinase, daun jeruk manis, *Citrus sinensis* L.

PENDAHULUAN

Kulit merupakan organ terluar dan terbesar pada tubuh manusia yang berfungsi sebagai pelindung utama terhadap pengaruh lingkungan eksternal, termasuk paparan mikroorganisme, bahan kimia, dan radiasi ultraviolet. Selain berperan sebagai barier fisik, kulit juga memiliki fungsi fisiologis penting seperti pengaturan suhu tubuh, ekskresi, persepsi sensorik, serta sintesis vitamin D. Secara struktural, kulit tersusun atas tiga lapisan utama, yaitu epidermis, dermis, dan hipodermis, yang bekerja secara sinergis untuk menjaga homeostasis dan integritas jaringan tubuh (Indasah *et al.*, 2025). Penuaan kulit merupakan proses biologis progresif yang ditandai dengan menurunnya fungsi struktural dan fisiologis kulit seiring bertambahnya usia. Proses ini dipengaruhi oleh faktor intrinsik, seperti genetik dan perubahan hormonal, serta faktor ekstrinsik, seperti paparan sinar ultraviolet, polusi, dan stres oksidatif akibat peningkatan produksi radikal bebas. Sebagai negara beriklim tropis yang terletak di wilayah khatulistiwa, Indonesia menerima paparan sinar matahari dengan intensitas relatif tinggi sepanjang tahun. Kondisi tersebut meningkatkan risiko paparan UV kronis pada kulit masyarakat, yang berpotensi mempercepat pembentukan ROS dan memperbesar peluang terjadinya penuaan dini kulit. Oleh karena itu, diperlukan upaya preventif yang efektif untuk melindungi kulit dari efek merugikan radikal bebas akibat paparan sinar UV yang tinggi (Yaar *et al.*, 2020). Salah satu strategi utama dalam pencegahan penuaan dini kulit adalah penggunaan antioksidan, khususnya antioksidan topikal, yang berperan dalam menetralkan radikal bebas dan menekan efek stres oksidatif pada kulit. Antioksidan topikal bekerja langsung pada permukaan kulit dan lapisan epidermis, sehingga mampu memberikan perlindungan yang lebih optimal terhadap paparan lingkungan. Saat ini, pengembangan antioksidan topikal berbasis bahan alam semakin diminati karena dinilai lebih aman dan memiliki potensi efek samping yang lebih rendah dibandingkan antioksidan sintesis (Draeos *et al.*, 2021). Paparan

lingkungan yang bersifat merugikan, seperti radiasi ultraviolet (UV) dan radikal bebas, berperan sebagai faktor utama penuaan kulit dari luar tubuh. Faktor-faktor tersebut bekerja melalui beragam mekanisme, terutama dengan memicu peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*) di dalam tubuh, yang salah satunya diinduksi oleh paparan sinar UV secara berulang dan berkepanjangan. Sebagai negara beriklim tropis yang berada di wilayah khatulistiwa, Indonesia menerima intensitas paparan sinar matahari yang relatif tinggi sepanjang tahun. Kondisi ini dapat menyebabkan peningkatan kadar ROS disertai penurunan sistem pertahanan antioksidan endogen, sehingga terjadi ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan yang dikenal sebagai stres oksidatif. Keadaan tersebut berkontribusi terhadap terjadinya kerusakan sel dan berperan penting dalam percepatan proses penuaan kulit (Subaidah *et al.*, 2023). Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai antioksidan untuk pencegahan penuaan dini adalah daun jeruk manis, kandungan bioaktif dalam buah jeruk, seperti karotenoid, flavonoid, limonoid, dan terpen, memiliki peran penting dalam menjaga kesehatan kulit wajah. Karotenoid berfungsi sebagai antioksidan yang membantu melindungi kulit dari kerusakan akibat radiasi ultraviolet dan kesehatan oksidatif yang dapat mempercepat penuaan kulit. Flavonoid berkontribusi dalam mengurangi peradangan serta menetralkan radikal bebas, sehingga berpotensi mencegah munculnya hiperpigmentasi, keriput, dan gangguan kulit akibat paparan lingkungan. Selain itu, limonoid dan terpen yang banyak ditemukan dalam minyak esensial jeruk menunjukkan aktivitas antimikroba dan antioksidan yang dapat membantu menjaga keseimbangan kesehatan kulit serta mencegah infeksi ringan pada kulit wajah. Secara keseluruhan, senyawa bioaktif buah jeruk berpotensi mendukung kesehatan, perlindungan, dan peremajaan kulit wajah (Borghi & Pavanelli, 2023). Berdasarkan teori di atas penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan serta

kemampuan ekstrak daun jeruk manis (*Citrus sinensis* L) dalam menghambat enzim tirosinase.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan Foodryer, Blender, Seperangkat alat-alat gelas, Aluminium foil, Timbangan analitik, Inkubator shaker, Ultrasonic, Sentrif gas, Rotary evaporator, Waterbath, Spektrofotometer UV-Visible, Lumpang Alu, Milwaukee MW802 PRO 3-in-1 Combo Meter. Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah Daun pandan, Etanol 70%, metanol ,akuadest, Fecl₃, Chloroform, Asam asetat anhidrat, H₂SO₄, HCL, Mayer, Dragendorff, Magnesium, Vitamin C, DPPH, Pospat buffer, L-Dopa, Enzim tirosinase.

Preparasi Sampel Penelitian

Sebanyak 5 kg daun jeruk manis (*Citrus sinensis* L.) digunakan sebagai bahan penelitian dan terlebih dahulu dibersihkan dengan mencucinya dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran serta kontaminan yang menempel pada permukaan bahan. Setelah proses pencucian, sampel kemudian dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil dengan tujuan memperluas permukaan bahan sehingga proses pengeringan dapat berlangsung secara lebih optimal dan merata. Selanjutnya, bahan yang telah dirajang dikeringkan menggunakan alat *food dryer* pada suhu 40-50° selama 24 jam hingga diperoleh kondisi bahan yang kering secara sempurna. Pemilihan suhu ini bertujuan untuk menurunkan kadar air bahan tanpa merusak senyawa bioaktif yang bersifat termolabil, seperti flavanoid, senyawa fenolik, dan vitamin C. Setelah pengeringan selesai, sampel kering kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk dengan ukuran partikel yang relatif seragam. Serbuk yang dihasilkan selanjutnya ditimbang untuk mengetahui bobot akhir bahan kering sebelum digunakan pada tahapan penelitian selanjutnya (Chaves *et al.*, 2020).

Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Manis

Serbuk sampel ditimbang sebanyak 30 g, kemudian dibagi dan dimasukkan ke dalam 5 buah labu Erlenmeyer sebagai wadah proses ekstraksi. Ke dalam masing-masing Erlenmeyer ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan bahan terhadap pelarut sebesar 1:10 (b/b) , yaitu sebanyak 300 mL, sehingga seluruh sampel terendam sempurna. Etanol 70% dipilih karena memiliki polaritas sedang yang efektif untuk mengekstraksi senyawa bioaktif polar dan semi- polar seperti flavanoid, fenolik, tanin, dan vitamin c. Setiap Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil untuk mencegah penguapan pelarut serta menghindari kontaminasi dari lingkungan luar. Campuran selanjutnya diekstraksi menggunakan shaker (maserasi dinamis) dengan kecepatan 170 rpm selama 12 jam untuk memaksimalkan kontak antara pelarut dan matriks sampel sehingga difusi senyawa aktif ke dalam pelarut berlangsung secara optimal. Setelah proses pengocokan selesai, larutan ekstrak dipindahkan ke dalam tabung sentrifus dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Proses ini bertujuan untuk memisahkan fraksi padat (residu) dan fraksi cair (supernatan) berdasarkan perbedaan densitas. Endapan padat akan membentuk pellet di dasar tabung ,sedangkan fraksi cair berupa supernatan berada di bagian atas. Supernatan kemudian dipisahkan secara hati-hati dan dimasukkan kembali ke dalam labu Erlenmeyer untuk proses lanjutan. Selanjutnya dilakukan perlakuan ultrasonikasi menggunakan ultrasonic bath pada frekuensi 40 kHz, daya 150 W, dan waktu 30 menit. Tahap ini bertujuan untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi melalui mekanisme kavitas ultrasonik yang menyebabkan kerusakan dinding sel tanaman, sehingga senyawa bioaktif yang terperangkap dalam matriks sel dapat dilepaskan secara lebih optimal. Setelah proses ultrasonikasi selesai, larutan ekstrak kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada tekanan vakum dengan suhu water bath 45–50 °C. Parameter utama pada tahap ini adalah tekanan vakum dan suhu

pemanasan, bukan kecepatan putaran (rpm). Proses ini bertujuan untuk menguapkan pelarut tanpa merusak senyawa aktif yang bersifat termolabil. Tahap akhir dilakukan penguapan lanjutan menggunakan water bath hingga diperoleh ekstrak kental yang stabil dan siap digunakan untuk tahap pengujian selanjutnya (Kalompatsio *et al.*, 2025).

Skrining Fitokimia

Menurut Djamal *et al.*, (2025), identifikasi skrining fitokimia terdiri dari:

1. Uji Alkaloid ekstrak sampel yang dilarutkan dalam etanol dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi terpisah. Tabung pertama ditambahkan 2–3 tetes reagen Wagner, tabung kedua diberi 5 tetes reagen Mayer disertai penambahan 3 tetes HCl, sedangkan tabung ketiga ditambahkan 5 tetes reagen Dragendorff. Keberadaan senyawa alkaloid ditunjukkan oleh terbentuknya endapan berwarna coklat kemerahan pada uji Wagner, endapan putih pada uji Mayer, serta endapan berwarna merah hingga jingga pada uji Dragendorff.
2. Uji Flavonoid sebanyak 0,5 g ekstrak sampel dilarutkan dalam 5 mL etanol hingga homogen, dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 5 tetes larutan HCl 2 g serbuk magnesium, setelah itu, campuran di reaksikan dengan sekitar 10 tetes asam klorida pekat. kemudian didiamkan selama kurang lebih 3 menit. Lalu hasil pengujian dinyatakan positif apabila dikatakan terjadi perubahan warna merah tua mengindikasikan adanya senyawa flavonoid dalam sampel.
3. Uji Saponin dilakukan dengan mencampurkan 0,5 g ekstrak sampel ke dalam 2 mL akuades panas di dalam tabung reaksi, kemudian dikocok kuat selama beberapa menit. Hasil positif saponin ditandai dengan terbentuknya busa stabil yang tidak segera hilang dan bertahan selama kurang lebih 15 menit,

menunjukkan sifat aktif permukaan dari senyawa saponin sekitar 1-3 cm.

4. Uji Tanin Sebanyak 0,5 g ekstrak sampel dilarutkan dan dipanaskan hingga mendidih, kemudian disaring untuk memperoleh filtrat. Filtrat sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan FeCl₃. warna biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya kandungan tanin dalam ekstrak.
5. Uji Triterpenoid dan Steroid Sebanyak 0,5 g simplisia direndam dalam asam asetat anhidrat hingga seluruh bagian sampel terendam dan didiamkan selama sekitar 15 menit. Selanjutnya, sebanyak 6 tetes larutan sampel dipindahkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 2–3 tetes asam sulfat pekat (H₂SO₄). Munculnya warna kecokelatan atau violet menandakan adanya triterpenoid, sedangkan perubahan warna menjadi biru kehijauan menunjukkan keberadaan senyawa steroid.

Uji Antioksidan DPPH

Sebanyak 0,0580 gram sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur berkapasitas 10 mL, kemudian ditambahkan metanol hingga mencapai tanda batas dan dihomogenkan. Larutan stok yang diperoleh memiliki konsentrasi 5800 mg/L. Selanjutnya, larutan tersebut diencerkan untuk menghasilkan beberapa variasi konsentrasi uji dengan volume akhir yang sama di dalam tabung reaksi. Ke dalam masing-masing larutan ditambahkan pereaksi DPPH, kemudian campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Setelah proses inkubasi, absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 517 nm. Persentase kemampuan penghambatan radikal bebas (% inhibisi) dihitung untuk setiap konsentrasi sampel (Syahara *et al.*, 2023).

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase

Uji aktivitas penghambatan enzim tirosinase dilakukan menggunakan metode

spektrofotometri berbasis pembentukan dopakrom dari substrat L-tirosin, yang diukur menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 492 nm, sebagai panjang gelombang karakteristik pembentukan dopakrom. Enzim tirosinase yang digunakan merupakan mushroom tirosinase dengan aktivitas 2500 U/mL, dan reaksi dilakukan dalam larutan dapar fosfat 50 mM pH 6,5, sesuai dengan kondisi optimum aktivitas enzim tirosinase yang dilaporkan pada penelitian sebelumnya (Ratnasari et al., 2020). Sebanyak 20 µL larutan ekstrak daun kulit jeruk manis yang dilarutkan dalam DMSO pada berbagai konsentrasi uji (6,25–400 ppm) dimasukkan ke dalam sumur mikroplat 96 sumur, kemudian ditambahkan 138 µL buffer fosfat, 2 µL enzim tirosinase, dan reaksi dimulai dengan penambahan 40 µL substrat L-tirosin (2,5 mM) sehingga volume total reaksi menjadi 200 µL. Seluruh campuran reaksi kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C sebelum dilakukan pengukuran absorbansi (Mukhriani et al., 2022).

Blanko dan Kontrol

Blanko dan kontrol disiapkan untuk mengoreksi absorbansi yang tidak berasal dari reaksi enzimatik. Blanko (B1) disiapkan dengan mencampurkan buffer fosfat, enzim tirosinase, dan substrat L-tirosin tanpa penambahan sampel uji, sehingga mewakili aktivitas enzim normal tanpa inhibitor. Blanko kontrol (B0) dibuat dengan prosedur yang sama, namun substrat L-tirosin digantikan dengan buffer fosfat, sehingga tidak terjadi pembentukan dopakrom dan digunakan untuk mengoreksi absorbansi dasar reagen (Furi et al., 2022). Sampel uji (S1) disiapkan dengan

mencampurkan ekstrak uji, enzim tirosinase, dan substrat L-tirosin, sedangkan sampel kontrol (S0) dibuat dengan perlakuan yang sama namun tanpa penambahan substrat, sehingga berfungsi untuk mengoreksi absorbansi yang berasal dari warna alami sampel, bukan dari reaksi enzimatik (Mukhriani et al., 2022).

Asam Kojat sebagai Kontrol Positif

Asam kojat digunakan sebagai kontrol positif karena telah diketahui memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim tirosinase secara signifikan. Perlakuan kontrol positif dilakukan dengan prosedur yang sama seperti sampel uji, menggunakan berbagai konsentrasi asam kojat, dan diukur pada panjang gelombang 492 nm (Rini et al., 2021). Persentase inhibisi dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(B1 - B0) - (S1 - S0)}{(B1 - B0)} \times 100\%$$

B1: Absorbansi blanko (enzim + substrat)

B0: Absorbansi blanko kontrol (enzim tanpa substrat)

S1: Absorbansi sampel (enzim + substrat + sampel uji)

S0: Absorbansi sampel kontrol (enzim + sampel uji tanpa substrat)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Skrining Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan secara kualitatif dengan memanfaatkan reaksi antara ekstrak dan pereaksi tertentu, yang ditandai oleh munculnya perubahan warna atau endapan khas. Pengujian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak kental daun kulit jeruk manis seperti yang ada pada tabel 1 yang dibawah (Widiastuti et al., 2023).

Tabel 1. Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Jeruk Manis

Golongan senyawa	Hasil pengujian	Standard
Flavonoid	+	Warna jingga, merah atau kuning
Steroid	+	Warna biru
Alkaloid	+	Endapan coklat (Dragendorff)
Saponin	-	Terbentuk busa yang stabil
Tanin	+	Biru tua atau hitam kehijauan

Keterangan:

(+) Terdapat Senyawa Kimia

(-) Tidak Terdapat Senyawa Kimia

Berdasarkan tabel 1. dapat dilihat bahwa pada ekstrak positif untuk flavanoid, steroid, alkaloid, dan tanin mengandung gugus senyawa positif. Sedangkan pada saponin tidak terdeteksi. Kombinasi metabolit sekunder tersebut menunjukkan bahwa ekstrak memiliki potensi biologis yang baik, terutama sebagai sumber antioksidan alami dan senyawa bioaktif lainnya (Mathr *et al.*, 2024).

Hasil positif flavonoid ditandai dengan perubahan warna merah hingga jingga setelah penambahan serbuk magnesium dan HCl pekat. Reaksi ini menunjukkan terjadinya reduksi gugus karbonil pada struktur flavonoid, yang merupakan ciri khas senyawa polifenol. Flavonoid diketahui memiliki kemampuan mendonorkan elektron atau atom hidrogen sehingga berperan sebagai antioksidan alami. Studi terkini menunjukkan bahwa flavonoid dari genus *Citrus* berkontribusi signifikan terhadap aktivitas penangkal radikal bebas dan proteksi sel kulit dari stres oksidatif (Xu *et al.*, 2021).

Hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan coklat menggunakan pereaksi Dragendorff, yang menunjukkan adanya senyawa nitrogen basa dalam ekstrak. Alkaloid merupakan golongan metabolit sekunder yang banyak dilaporkan memiliki aktivitas farmakologis seperti antibakteri, analgesik, antidiabetik, dan antioksidan. Keberadaan alkaloid dalam ekstrak mendukung potensi aktivitas biologis yang signifikan (Dubale *et al.*, 2023).

Hasil uji saponin menunjukkan reaksi negatif karena tidak terbentuk busa stabil. Tidak terdeteksinya saponin dapat disebabkan oleh perbedaan metode ekstraksi, jenis pelarut, atau konsentrasi ekstrak. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa saponin tidak selalu terdeteksi dalam uji kualitatif sederhana meskipun terkandung dalam jumlah kecil (Maheshwaran *et al.*, 2024).

Uji tanin menunjukkan hasil positif dengan perubahan warna biru tua atau hitam kehijauan, yang mengindikasikan adanya

senyawa polifenol. Tanin dikenal memiliki kemampuan antioksidan yang kuat serta aktivitas antibakteri melalui mekanisme pengikatan protein dan enzim mikroba. Penelitian terbaru melaporkan bahwa tanin sering ditemukan bersamaan dengan flavonoid dalam ekstrak tanaman yang memiliki aktivitas biologis tinggi (Scalbert *et al.*, 2021)

Uji steroid yang menunjukkan perubahan warna biru menandakan keberadaan senyawa steroid atau triterpenoid. Senyawa ini diketahui memiliki aktivitas biologis seperti antiinflamasi, imunomodulator, dan perlindungan membran sel. Studi fitokimia modern menyebutkan bahwa steroid nabati sering ditemukan pada ekstrak tanaman dan berkontribusi terhadap efek farmakologis secara sinergis dengan metabolit lain (Dubale *et al.*, 2023).

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

Radikal bebas merupakan molekul tidak stabil yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga mudah bereaksi dengan komponen seluler dan memicu stres oksidatif. Kondisi ini berperan penting dalam proses penuaan serta berbagai penyakit degeneratif. Oleh karena itu, keberadaan antioksidan sangat dibutuhkan untuk menetralkan radikal bebas dengan cara mendonorkan elektron atau atom hidrogen sehingga mencegah terjadinya kerusakan sel. Salah satu metode yang umum digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan adalah metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) karena memiliki sensitivitas tinggi, prosedur sederhana, serta hasil yang dapat direpresentasikan melalui persentase inhibisi radikal bebas (Kumar *et al.*, 2023). Daun jeruk manis (*Citrus sinensis* L.) diketahui mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, fenolik, dan senyawa bioaktif lainnya yang berpotensi sebagai antioksidan alami. Senyawa-senyawa tersebut berperan dalam menangkap radikal bebas melalui mekanisme transfer elektron dan penghambatan reaksi oksidatif berantai. Untuk menilai kekuatan aktivitas antioksidan ekstrak daun jeruk manis, dilakukan pengujian DPPH

pada beberapa variasi konsentrasi dan dibandingkan dengan vitamin c sebagai kontrol positif, mengingat vitamin c merupakan antioksidan murni yang telah

banyak digunakan sebagai standar dalam pengujian aktivitas antioksidan (Zhang *et al.*, 2024).

Tabel 2. Persentase Inhibisi DPPH oleh Ekstrak Daun Jeruk Manis dan Vitamin C

Persentase (mg/mL)	Ekstrak (% ±SD)	95% CI (Ekstrak)	Vitamin C (% ±SD)	95% CI (Vitamin C)	P-Value *
200	76.46±0.00	76.46-76.46	91.85±0.00	91.85-91.85	0.05
300	78.61±0.00	78.61-78.61	94.84±0.00	94.84-94.84	
400	82.32±0.00	82.32-82.32	98.28±0.00	98.28-98.28	
500	84.43±0.00	84.43-84.43	99.37±0.00	99.37-99.37	

Uji antioksidan dilakukan dengan cara larutan uji (1 mL) dari masing-masing konsentrasi (200, 300, 400, 500 ppm) ditambahkan 1 mL larutan DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) (100 mg/L) dan metanol (2 mL), dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya, diukur absorbansi dengan panjang gelombang 200-400 nm. Apabila masing-masing konsentrasi yang diuji memiliki aktivitas antioksidan maka radikal DPPH yang berwarna ungu gelap akan tereduksi menjadi bentuk nonradikal yang berwarna kuning (Aisyah *et al.*, 2025).

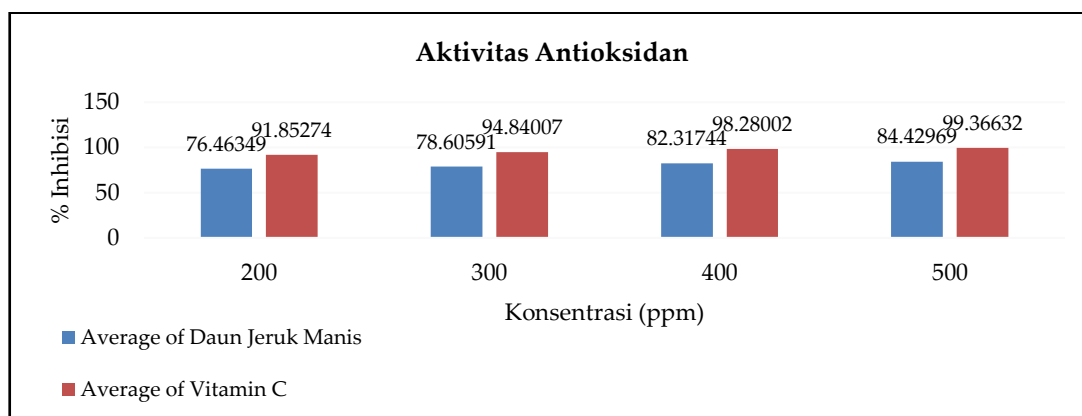
Berdasarkan Aktivitas antioksidan ekstrak daun jeruk manis dan Vitamin C pada tabel 2 diatas yang dianalisis menggunakan metode DPPH dapat di tunjukkan bahwa hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, dapat diketahui bahwa ekstrak daun jeruk manis menunjukkan kemampuan penangkapan radikal bebas yang meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi. Pada konsentrasi 200 mg/mL, persentase inhibisi ekstrak tercatat sebesar 76,46%, kemudian meningkat menjadi 78,61% pada 300 mg/mL, 82,32% pada 400 mg/mL, dan mencapai 84,43% pada konsentrasi 500 mg/mL. Peningkatan ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin besar pula kemampuan ekstrak dalam mereduksi radikal bebas DPPH. Hasil tersebut mengindikasikan

bahwa ekstrak daun jeruk manis mengandung senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan, seperti flavonoid, fenolik, dan senyawa metabolit sekunder lainnya. Senyawa-senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogen atau elektron kepada radikal bebas DPPH sehingga radikal menjadi lebih stabil dan tidak reaktif. Sebagai pembanding, vitamin C menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak pada seluruh konsentrasi yang diuji. Persentase inhibisi vitamin C dimulai dari 91,85% pada konsentrasi 200 mg/mL, kemudian meningkat menjadi 94,84% pada 300 mg/mL, 98,28% pada 400 mg/mL, dan mencapai 99,37% pada 500 mg/mL. Tingginya aktivitas vitamin C disebabkan oleh sifatnya sebagai antioksidan murni yang sangat efektif dalam menangkap radikal bebas melalui mekanisme donasi elektron. Meskipun aktivitas antioksidan ekstrak daun jeruk manis masih berada di bawah vitamin C, nilai persentase inhibisi yang dihasilkan tergolong tinggi dan menunjukkan potensi antioksidan yang kuat. Hal ini menandakan bahwa ekstrak tersebut berpotensi dikembangkan sebagai sumber antioksidan alami alternatif. Hasil analisis statistik menunjukkan nilai $p < 0,05$, yang menandakan bahwa perbedaan aktivitas antioksidan antara ekstrak daun jeruk manis dan vitamin C pada berbagai konsentrasi bersifat signifikan secara statistik. Dengan

demikian, dapat disimpulkan bahwa variasi konsentrasi berpengaruh nyata terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Rozi *et al.*, (2025) yang melaporkan bahwa vitamin C memiliki persen inhibisi di atas 80% pada berbagai konsentrasi uji menggunakan metode DPPH. Tingginya aktivitas tersebut dikaitkan dengan sifat vitamin C sebagai antioksidan larut air yang mampu mereduksi radikal bebas secara cepat dan stabil. Hal ini menjelaskan mengapa vitamin C pada penelitian ini menunjukkan aktivitas yang secara konsisten lebih tinggi dibandingkan ekstrak daun jeruk manis.

Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Jeruk Manis (*Citrus sinensis* L.) dan vitamin C

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan untuk membandingkan kemampuan ekstrak daun kulit jeruk manis (*Citrus sinensis* L.) dengan vitamin c sebagai pembanding dalam menangkal radikal bebas. Hasil pengujian disajikan dalam bentuk persentase inhibisi pada beberapa aktivitas variasi konsentrasi, sehingga dapat diamati kecenderungan peningkatan antioksidan seiring bertambahnya konsentrasi. Diagram aktivitas antioksidan ekstrak daun kulit jeruk manis dan vitamin C ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram Antioksidan Ekstrak Daun Kulit Jeruk Manis (*Citrus sinensis* L.) dan Vitamin C

Berdasarkan grafik batang yang menunjukkan hasil pengujian aktivitas menggunakan metode DPPH, dapat diamati diagram konsentrasi diatas, terlihat bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak daun jeruk manis (*Citrus sinensis* L.) menunjukkan dari 200 hingga 500 $\mu\text{g/mL}$ menyebabkan peningkatan persentase inhibisi radikal bebas seiring mengindikasikan aktivitas antioksidan secara bertahap, yang menunjukkan adanya hubungan kenaikan konsentrasi uji, yang mengidentifikasi aktivitas antioksidan secara bertahap, yang menunjukkan adanya hubungan dosis-respon dimana antara konsentrasi ekstrak dan kemampuan penangkapan radikal bebas (Xu *et al.*, 2021). Fenomena ini sejalan dengan teori Shahidi *et al.*, (2020) yang menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenol, dan asam askorbat dalam ekstrak tanaman, maka

semakin besar pula kemampuan ekstrak tersebut dalam menangkap dan mendonorkan elektron atau atom hidrogen untuk menetralkan radikal bebas DPPH, kondisi ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa kandungan senyawa fenolik dan flavonoid pada daun jeruk. Namun demikian, jika dibandingkan dengan vitamin C sebagai donor elektron atau atom hidrogen sehingga mampu kontrol positif, nilai aktivitas antioksidan ekstrak daun jeruk manis pada seluruh konsentrasi masih lebih rendah, yang tercermin dari persentase inhibisi vitamin C yang konsisten lebih tinggi pada setiap titik da konsentrasi. Hal ini berkaitan dengan sifat vitamin C sebagai antioksidan murni yang larut air, memiliki mekanisme kerja langsung dan cepat dalam mereduksi radikal DPPH secara efektif, meskipun tingkat bebas stabil seperti DPPH, sehingga menghasilkan aktivitas anti-

oksidan yang lebih tinggi dan stabil (Nimse, 2020).

Peningkatan aktivitas antioksidan ekstrak daun jeruk masih berada di bawah antioksidan standar seperti vitamin C, sebagaimana dilaporkan oleh Handayani *et al.*, (2020), Hasanah *et al.*, (2023), serta Herlina *et al.*, (2024) memberikan efek antioksidan yang signifikan dan relevan secara biologis (Dias *et al.*, 2023), yang menyatakan bahwa ekstrak daun jeruk memiliki aktivitas antioksidan kategori kuat hingga sangat kuat namun relatif lebih landai dibandingkan vitamin C dapat disebabkan oleh kompleksitas matriks ekstrak, dimana senyawa antioksidan masih terikat dalam jaringan sel tumbuhan dan berinteraksi dengan senyawa lain, sehingga efektivitas penangkapan radikal bebas menjadi lebih rendah dibandingkan senyawa Tunggal (Tungmun- nithum *et al.*, 2020). Meskipun demikian, kecenderungan peningkatan aktivitas antioksidan seiring bertambahnya konsentrasi menunjukkan bahwa daun jeruk manis berpotensi sebagai sumber antioksidan alami yang dapat dikembangkan lebih lanjut dalam formulasi sediaan farmasi atau kosmetik anti-penuaan (Kaur *et al.*, 2022). Selain itu, perbedaan nilai aktivitas antioksidan antara ekstrak daun jeruk manis dan vitamin C juga dapat dipengaruhi oleh perbedaan polaritas senyawa aktif dan kesesuaian pelarut dengan sistem uji yang digunakan, dimana metode DPPH lebih sensitif terhadap senyawa dengan kemampuan reduksi tinggi dan struktur sederhana seperti vitamin C (Apak *et al.*, 2021). Oleh karena itu, meskipun aktivitas antioksidan ekstrak daun jeruk manis lebih rendah, kontribusi sinergis antar senyawa bioaktif di dalamnya tetap memerlukan konsentrasi yang lebih tinggi untuk mencapai efektivitas yang sebanding dengan antioksidan standar.

Hasil Aktivitas Enzim Tirosinase

Hasil aktivitas Enzim tirosinase ekstrak kulit jeruk manis dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Enzim Tirosinase

Sampel	Kontrol	Blanko Sampel	Hasil
--------	---------	---------------	-------

0,9515%	0,982	0,441 0,353	95,1%
---------	-------	----------------	-------

Berdasarkan hasil yang disajikan pada Tabel 3, sampel dengan konsentrasi yang sangat kuat yaitu 0,9515% menunjukkan aktivitas penghambatan enzim tirosinase sebesar 95,1%. Nilai tersebut diperoleh dari perbandingan absorbansi kontrol sebesar 0,982 dengan absorbansi sampel yang telah dikoreksi menggunakan blanko, yaitu berkisar antara 0,441 hingga 0,353. Penurunan absorbansi yang signifikan ini mengindikasikan bahwa senyawa aktif dalam sampel mampu menghambat aktivitas katalitik enzim tirosinase secara efektif (Zhang *et al.*, 2024). Tingginya persentase inhibisi tirosinase yang diperoleh menunjukkan bahwa sampel memiliki potensi kuat sebagai agen antimelanogenesis. Enzim tirosinase berperan penting dalam proses biosintesis melanin, khususnya pada tahap hidroksilasi tirosin menjadi DOPA dan oksidasi DOPA menjadi dopaquinon. Oleh karena itu, penghambatan aktivitas enzim ini secara langsung dapat menurunkan produksi melanin dan berkontribusi terhadap efek pencerahan kulit (Kim *et al.*, 2023) Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, yang di laporkan oleh (Hassan *et al.*, 2023) bahwa nilai inhibisi sebesar 95,1% tergolong sangat tinggi. senyawa-senyawa alami yang berasal dari tumbuhan umumnya menunjukkan aktivitas penghambatan enzim tirosinase pada tingkat sedang hingga tinggi, dengan variasi efektivitas yang dipengaruhi oleh struktur kimia senyawa aktif, keberadaan gugus fenolik atau flavonoid, serta metode dan kondisi pengujian yang digunakan. Sebagian besar inhibitor tirosinase dari bahan alam dilaporkan memiliki aktivitas yang bervariasi dan hanya beberapa senyawa tertentu yang menunjukkan daya hambat yang sangat kuat. Oleh karena itu, hasil inhibisi sebesar 95,1% pada penelitian ini menunjukkan keunggulan aktivitas biologis sampel dibandingkan dengan mayoritas bahan alami.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, ekstrak etanol daun jeruk manis (*Citrus sinensis* L.) diketahui mengandung

senyawa metabolit sekunder utama berupa flavonoid, tanin, alkaloid, dan steroid, sedangkan saponin tidak terdeteksi. Ekstrak tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat, ditandai dengan tingginya persentase penghambatan radikal bebas DPPH yang meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak. Selain itu, ekstrak etanol daun jeruk manis juga menunjukkan kemampuan yang baik dalam menghambat aktivitas enzim tirosinase, dengan persentase inhibisi sekitar 51%, yang mengindikasikan potensi dalam menekan proses pembentukan melanin. Aktivitas biologis ini diduga berkaitan erat dengan kandungan senyawa fenolik dan flavonoid yang berperan sebagai penangkap radikal bebas serta penghambat aktivitas enzim. Secara keseluruhan, ekstrak etanol daun jeruk manis memiliki potensi yang menjanjikan untuk dikembangkan sebagai sumber bahan alam antioksidan dan agen penghambat enzim tirosinase, khususnya untuk aplikasi anti-aging dan antihiperpigmentasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah, N., Sriwidodo, S., Husni, P dan Sinala, S. (2025). Analisis aktivitas antioksidan nanoemulsi berbasis tanaman dalam aplikasi farmasi dan kosmetik: Kajian literatur. *Media Kesehatan Politeknik Kesehatan Makassar*, 20(1), 139–152.
- Borghini, S. M dan Pavanelli, W. R. (2023). Antioxidant Compounds and Health Benefits of Citrus Fruits. *Antioxidants*, 12(8), 1–5.
- Chaves, J. O., de Souza, M. C., da Silva, L. C., Lachos-Perez, D., Torres-Mayanga, P. C., Machado, A. P. D. F., Forster-Carneiro, T dan Rostagno, M. A. (2020). Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. *Trends in Food Science & Technology*, 95, 1–15.
- Draeos, Z. D. (2021). Cosmeceuticals: Evolving concepts and regulations. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 20(9), 2755–2762.
- Dubale, S. (2023). Phytochemical screening and antimicrobial activity evaluation of selected medicinal plants. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 13(4), 312–320.
- Djamil, J. M., Megawati, J and Rahman, A. (2025). Phytochemical screening methods for medicinal plant extracts. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 45–53
- Furi, M., Sari, R and Nugroho, A. (2022). In vitro tyrosinase inhibition assay for natural products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(4), 120–126.
- Furi, A. L. (2022). Correction of non-enzymatic absorbance in tyrosinase inhibition assay. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(4), 126–128.
- Hashemi, S. M., Emami, S. A and Ghorbani, A. (2023). Kojic acid as a standard tyrosinase inhibitor. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 158, 114112.
- Indasah, I., Kusumaningsih, E dan Khomsiyatin, B. R. (2025). Efektivitas Edukasi Kesehatan terhadap Peningkatan Kesadaran Masyarakat dalam Pemilihan Krim Perawatan Kulit Yang Aman di RSUD Kabupaten Kediri. *Jurnal Pengabdian Masyarakat Bhinneka*, 3(4), 121–129.
- Kalompatsio, D., Papageorgiou, M and Tsatsaragkou, K. (2025). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from plant matrices. *Journal of Food Processing and Preservation*, 49(2), e17421.
- Kaur, C., Kapoor, H. C and Singh, B. (2022). Antioxidants in fruits and vegetables. *International Journal of Food Sciences*, 57(3), 123–134.
- Kim, J. H., Park, S. Y and Lee, Y. S. (2023). Tyrosinase inhibitors from natural sources and their application in cosmetic formulations. *Journal of Cosmetic Science*, 74(2), 85–98.
- Kumar, S., Patel, R and Singh, A. (2023). Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of *Citrus leaves*. *Journal of Herbal Medicine*, 39,
- Lee, J. H., Park, S. Y and Kim, M. J. (2024). Dose-dependent antioxidant activity of phenolic-rich plant extracts. *Journal of*

- Functional Foods*, 104, 105478.
- Maheshwaran, L., Nadarajah, L., Senadeera, S. P. N. N., Ranaweera, C. B., Chandana, A. K and Pathirana, R. N. (2024). Phytochemical testing methodologies and principles for preliminary screening/qualitative testing. *Asian Plant Research Journal*, 12(5), 11-38.
- Mathe, E., Sethoga, L., Mapfumari, S., Adeniran, O., Mokgotho, P., Shai, J and Gololo, S. (2024). Phytochemical screening and characterization of volatile compounds from three medicinal plants with reported anticancer properties using GC-MS. *Life*, 14(11), 1375.
- Mukhriani, M., Wahyuni, S and Rahmat, A. (2022). Evaluation of tyrosinase inhibitory activity of plant extracts. *Pharmacognosy Journal*, 14(3), 612–618.
- Nimse, S. B and Pal, D. (2020). Free radicals, antioxidants, and disease. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006.
- Nguyen, T. H., Tran, D. L and Pham, Q. T. (2023). Antioxidant potential of Citrus leaf extracts evaluated using DPPH radical scavenging assay. *Plants*, 12(18), 3210.
- Pillaiyar, T., Namasivayam, V and Manickam, M. (2021). Inhibitors of melanogenesis: An updated review. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 147166.
- Putra, R. (2020). Measurement of dopachrome formation in tyrosinase assay. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 8(2), 90–95.
- Putri, M. E., Handayani, L and Kurniawan, D. (2024). Potential of *Citrus sinensis* leaf extract as a natural antioxidant for anti-aging topical formulation. *International Journal of Cosmetic Science*, 46(4), 389–398.
- Ratnasari, D., Lestari, F and Putra, R. (2020). Measurement of dopachrome formation in tyrosinase assay. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 8(2), 90–95.
- Rahmawati, D. (2020). Kandungan senyawa tanin dan aktivitas biologis ekstrak daun kulit jeruk manis (*Citrus sinensis*) sebagai agen antimikroba. *Journal of Herbal Medicine*, 12(2), 85–92.
- Ratnasari, D (2020). Tyrosinase inhibitory activity assay using L-tyrosine substrate. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*.
- Rahmawati, D., Hasanah, U., & Pratama, A. (2024). Aktivitas antioksidan ekstrak daun jeruk manis menggunakan metode DPPH. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 21(3), 215–223.
- Rini, D. S. (2021). Kojic acid as standard inhibitor in tyrosinase assay. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*.
- Scalbert, A. (2021). Tannins in plant extracts: Biological significance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(7), 1123–1138.
- Subaidah, W. A., Hajrin, W and Juliantoni, Y. (2023). Edukasi penggunaan sediaan tabir surya sebagai upaya pencegah penuaan dini dan kanker kulit di SMAIT Anak Sholeh Mataram. *INDRA: Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 4(2), 42–46.
- Tripathi, S., Pathak, V and Dwivedi, M. K. (2025). Phytochemical Screening of Some Medicinal Plants of Rutaceae Family. 12(August), 62–66.
- Xu, Y., Chen, J and Liu, D. (2021). Dose-dependent antioxidant activity of plant extracts. *Food Chemistry*, 343, 128499.
- Zahra, F., Khaerunnisa, A., Jayantie, D. D., Vauziah, E and Iryana, I. (2025). Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Antihiperpigmentasi Serum Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) sebagai Inhibitor Enzim Tيروسinase. *Jurnal Pharmascience*, 12(2), 512.
- Zhang, L., Wu, Y and Chen, Z. (2024). Comparative antioxidant activity of natural plant extracts and vitamin C using DPPH assay. *Antioxidants*, 13(2), 245.
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T. (2023). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), 214–228.