

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Tanaman jeruk nipis yang diidentifikasi diperoleh dari perkebunan Sumber Batikan, Trirenggo, Kec. Bantul, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta (-7.9082423, 110.3431691) pada bulan Juni. Determinasi tanaman jeruk nipis dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta pada 19 Juni 2023 dengan nomor surat keterangan 289/Lab.Bio/B/VI/2023. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan merupakan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 2.

2. Preparasi Sampel

a. Pembuatan Simplisia

Daun dan kulit jeruk nipis yang telah dikumpulkan masing-masing sebanyak 2,5 kg. Pembuatan simplisia daun dan kulit jeruk nipis diawali dengan memilah daun yang berwarna hijau tua dengan kondisi baik (tidak sobek ataupun berlubang), kulit jeruk nipis dilakukan pemisahan dari buahnya. Kulit jeruk nipis yang digunakan yaitu kulit yang berwarna hijau kekuningan (setengah matang). Daun dan kulit jeruk nipis yang telah dipilah selanjutnya dicuci menggunakan air yang mengalir guna menghilangkan kotoran yang menempel pada permukaan daun dan kulit jeruk nipis. Daun dan kulit jeruk nipis yang telah bersih kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C selama ± 24 jam. Daun dan kulit jeruk nipis yang sudah kering dan memenuhi syarat, yaitu simplisia yang apabila diremas akan mudah hancur (Rezaldi *et al.*, 2022). Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air dimana, nantinya bertujuan untuk mencegah pertumbuhan jamur, kapang dan menghentikan reaksi enzimatik dalam tanaman yang dapat merusak kondisi simplisia baik secara kimia maupun

fisik, sehingga kualitas simplisia tetap terjaga (Priamsari *et al.*, 2019). Alasan menggunakan oven yaitu untuk mengurangi kadar air dalam waktu singkat serta suhu dapat di atur sesuai dengan suhu optimal pengeringan (Fahmi *et al.*, 2020). Penyerbukan simplisia kering dilakukan dengan menggunakan grinder, lalu dilakukan pengayakan menggunakan ayakan 40 mesh untuk memperoleh serbuk yang lebih halus. Penyerbukan simplisia dilakukan guna memperoleh partikel yang lebih kecil dan memperluas permukaan serbuk sehingga dapat mempermudah cairan penyari masuk ke dalam sel tanaman dan zat aktif yang ada pada simplisia akan larut (Syarifuddin *et al.*, 2020). Dari hasil penyerbukan diperoleh serbuk daun 258,31 gram dan serbuk kulit jeruk nipis 406,67 gram.

b. Pembuatan Ekstrak

Proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Penggunaan pelarut tersebut berkaitan dengan senyawa yang diambil dari daun dan kulit jeruk nipis yaitu senyawa flavonoid yang bersifat polar sehingga dibutuhkan pelarut yang bersifat polar juga. Sebagaimana prinsip *like dissolve like* yang berarti efektivitas ekstraksi dari suatu senyawa pelarut bergantung pada sifat kelarutan senyawa itu sendiri (Suryadi *et al.*, 2021).

Pada penelitian ini diperoleh hasil ekstrak kental serta nilai rendemen yang ditunjukkan pada Tabel 3. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis memenuhi syarat Farmakope Herbal Indonesia yaitu tidak kurang dari 15,0% (Depkes RI, 2017).

Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak Kental Daun dan Kulit Jeruk Nipis

Sampel	Berat Simplisia Serbuk (gram)	Berat Ekstrak (gram)	% Rendemen (b/b)
Ekstrak Daun jeruk nipis	150	38,68	25,79%
Ekstrak Kulit jeruk nipis	150	29,69	19,79%

3. Kontrol Kualitas Ekstrak

a. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan untuk mendeskripsikan warna, tekstur, rasa dan bau, menggunakan alat indera pada ekstrak kental. Hasil uji organoleptik ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Organoleptik

Uji organoleptik	Keterangan	
	Ekstrak Daun jeruk nipis	Ekstrak Kulit jeruk nipis
Warna	Coklat kehitaman	Hijau kekuningan
Tekstur	Kental	Kental
Rasa	Pahit	Pahit
Bau	Khas	Khas

Hasil uji organoleptik ekstrak daun jeruk nipis yang diperoleh sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi *et al.*, (2021) yaitu berwarna coklat kehitaman, berbentuk kental, memiliki rasa pahit, serta berbau khas daun jeruk nipis. Hasil uji organoleptik pada ekstrak etanol kulit jeruk nipis yang diperoleh sesuai dengan Farmakope Herbal Indonesia yaitu berwarna hijau kekuningan, berbentuk kental, memiliki rasa pahit, dan memiliki bau yang khas.

b. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa dari ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis dengan menggunakan uji tabung. Ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan terpenoid. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji Skrining Fitokimia

Golongan senyawa	Pereaksi	Sampel	
		Ekstrak daun	Ekstrak kulit
Alkaloid	Mayer	+	+
	Dragendorff	+	+
	Wagner	-	+
Flavonoid	Magnesium + HCl pekat	+	+
Saponin	Air + HCl 2N	+	+
Tanin	FeCl ₃	+	+

Golongan senyawa	Pereaksi	Sampel	
		Ekstrak daun	Ekstrak kulit
Terpenoid	$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{SO}_4$	+	+
Steroid	$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{SO}_4$	-	-

Keterangan:

(+): Mengandung senyawa.

(-): Tidak mengandung senyawa.

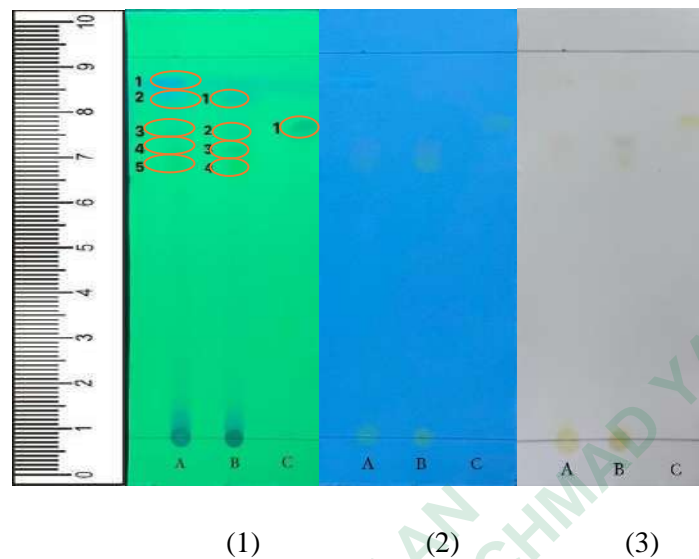
c. Identifikasi Golongan Senyawa Metode KLT

Kromatografi Lapis Tipis pada ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis bertujuan untuk mengidentifikasi adanya kandungan senyawa flavonoid pada daun dan kulit jeruk nipis dengan menggunakan pembanding kuersetin 0,1%. Data yang didapatkan dari uji KLT berupa noda bercak pada lempeng dan nilai Rf. Rf merupakan perbandingan jarak elusi sampel dengan jarak perambatan fase gerak dari titik penotolan. Optimasi fase gerak bertujuan untuk mengetahui pemisahan analit secara tepat. Beberapa fase gerak yang diuji menunjukkan hasil yang berbeda. Hasil optimasi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Optimasi Fase Gerak pada Uji KLT

No	Fase gerak	Hasil
1	Etil asetat: Metanol (9:1)	Standar terelusi dan sampel tidak terelusi sehingga tidak terjadi pemisahan
2	Etil asetat: Metanol (3:1)	Standar dan sampel terelusi namun pada sampel terelusi dengan tailing tebal
3	Etanol: Etil asetat: Kloroform (1,5:2:8,5)	Standar terelusi dan sampel terelusi dengan tailing tebal sehingga tidak terjadi pemisahan yang baik
3	N-heksan: Etil asetat (7:3)	Standar dan sampel terelusi dengan tailing tebal sehingga tidak terjadi pemisahan yang baik
4	N-heksan: Etil asetat (1:4)	Standar dan sampel terelusi dan terjadi pemisahan yang baik

Berdasarkan hasil optimasi fase gerak, maka n-heksan; etil asetat (1:4) dipilih karena menghasilkan pemisahan yang paling optimal. Konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk penotolan yaitu 10 mg/10 mL dan standar kuersetin 0,1% Hasil pemisahan senyawa dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil Uji KLT

Keterangan: (1) Deteksi dengan UV 254 nm; (2) Deteksi dengan UV 365 nm; (3) Setelah di semprot $AlCl_3$. (A) Ekstrak kulit jeruk nipis; (B) Ekstrak daun jeruk nipis; (C) Standar Kuersetin.

Berdasarkan pengamatan pada Gambar 7, plat KLT yang telah diamati dibawah sinar UV 254 nm ekstrak dan kuersetin terdapat bercak noda yang jelas pada ekstrak dan kuersetin. Data yang didapatkan dari uji KLT selanjutnya dihitung menggunakan rumus Rf. Berikut adalah hasil perhitungan Rf dari bercak noda yang tertera pada Tabel 7.

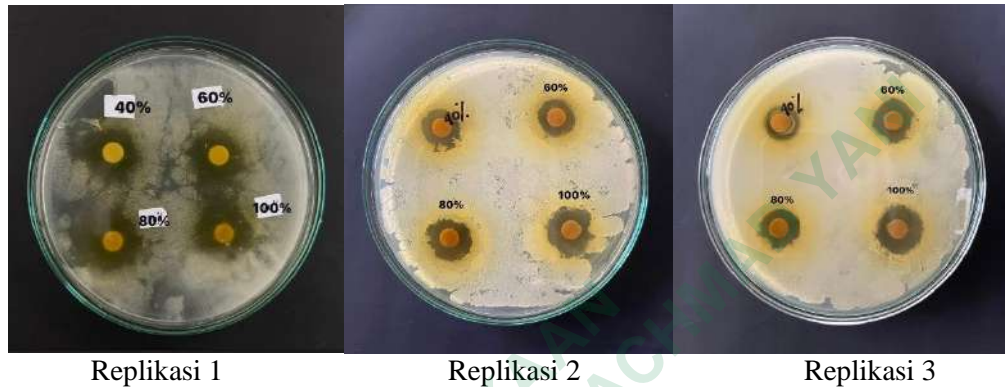
Tabel 7. Hasil Nilai Rf pada Uji KLT Senyawa Flavonoid

Sampel	Nilai Rf		Standar Kuersetin 0,1%	Literatur (Farida <i>et al.</i> , 2020)
	Ekstrak Sampel Kulit Jeruk nipis	Daun jeruk nipis		
Bercak 1	0,937	0,912		
Bercak 2	0,9	0,812		
Bercak 3	0,812	0,765	0,812	0,86
Bercak 4	0,765	0,712		
Bercak 5	0,712	-		

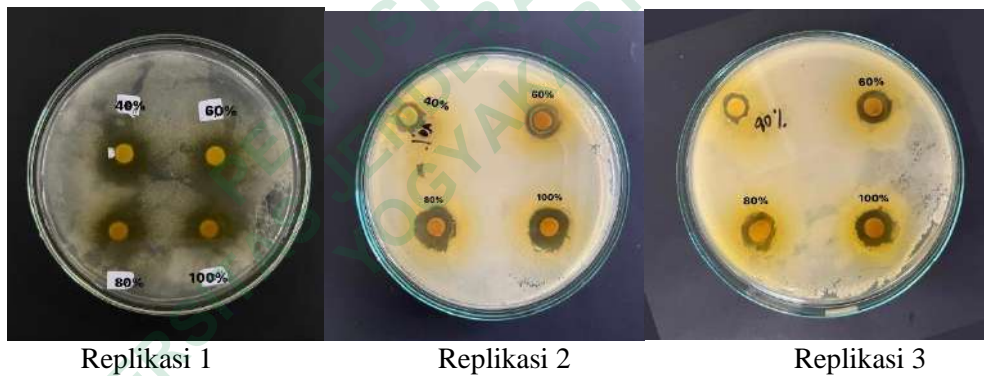
4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode Difusi Agar *Kirby Bauer* dengan 2 kelompok uji, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

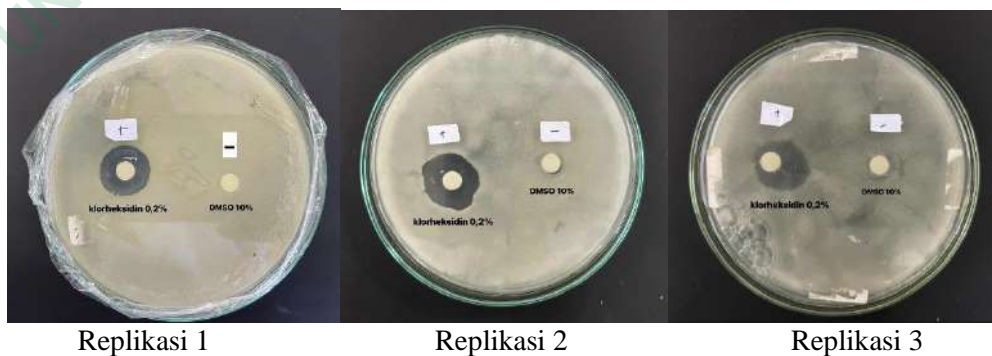
Kelompok perlakuan meliputi ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis dengan konsentrasi 40%; 60%; 80%; dan 100%. Kelompok kontrol meliputi kontrol positif menggunakan klorheksidin 0,2% dan kontrol negatif menggunakan DMSO 10%. Hasil zona hambat pada bakteri *S.mutans* dapat dilihat pada Gambar 8, Gambar 9 dan Gambar 10.



Gambar 8. Zona Hambat Ekstrak Daun Jeruk Nipis

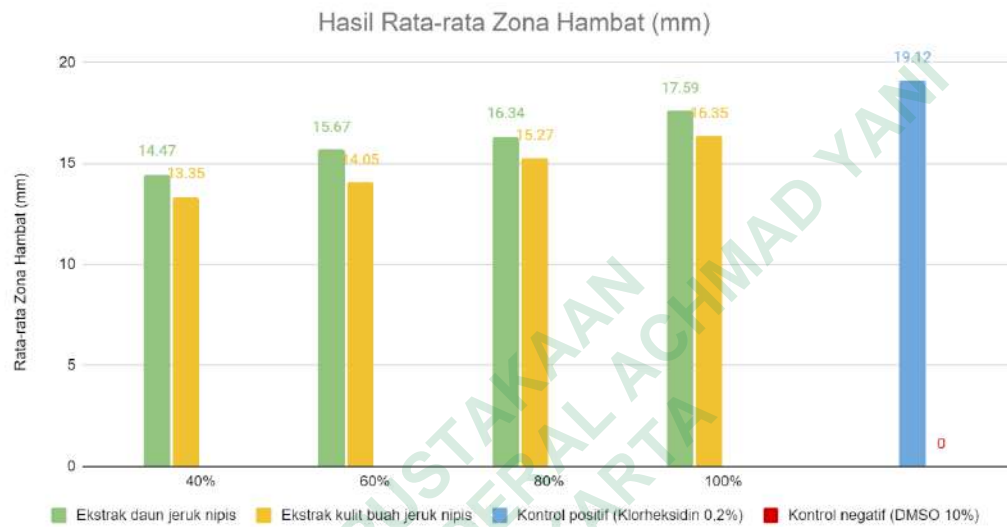


Gambar 9. Zona Hambat Ekstrak Kulit Jeruk Nipis



Gambar 10. Zona Hambat Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Hasil pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter zona hambat yang terbentuk pada kertas cakram berupa zona bening menggunakan jangka sorong dalam satuan mm. Pengukuran dilakukan secara vertikal, horizontal dan diagonal. Perolehan data diameter zona hambat pada bakteri *S.mutans* dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Hasil Rata-rata Diameter Zona Hambat Sampel

Berdasarkan hasil diameter zona hambat pada Gambar 11 ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis dengan variasi konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S.mutans* dengan respon hambat pertumbuhan kuat.

5. Analisis Data

a. Analisis Data Kelompok Perlakuan

Data zona hambat bakteri yang didapatkan pada penelitian ini dianalisis secara statistik menggunakan SPSS versi 29. Tujuan dilakukannya analisis ini yaitu untuk membandingkan konsentrasi dari masing-masing sampel pada bakteri uji. Analisis pertama yang dilakukan yaitu uji normalitas dan dilanjutkan uji homogenitas. Hasil analisis data statistik zona hambat bakteri *S.mutans* ATTC 25175 pada setiap variasi konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 8 dan Tabel 9.

Tabel 8. Hasil Analisis Data Statistik Zona Hambat Daun Jeruk Nipis

Konsentrasi	Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	Uji Homogenitas <i>Levene's</i>	Uji <i>One Way</i> <i>ANOVA</i>
40%	0,081		
60%	0,352	0,735	0,610
80%	0,061		
100%	0,674		

Tabel 9. Hasil analisis Data Statistik Zona Hambat Kulit Jeruk Nipis

Konsentrasi	Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	Uji Homogenitas <i>Levene's</i>	Uji <i>One Way</i> <i>ANOVA</i>
40%	0,390		
60%	0,195	0,735	0,639
80%	0,918		
100%	0,837		

Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena, data yang didapatkan kurang dari 50. Uji *Shapiro-Wilk* dilakukan untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak. Data yang terdistribusi normal apabila nilai sig $>0,05$. Berdasarkan hasil analisis uji *Shapiro-Wilk* zona hambat bakteri *S.mutans* di kedua sampel pada setiap variasi konsentrasi terdistribusi normal. Uji selanjutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene's*. Uji *Levene's* dilakukan untuk mengetahui apakah data terdistribusi homogen atau tidak. Data yang homogen apabila nilai sig $>0,05$. Berdasarkan hasil uji *Levene's* pada data sampel daun dan kulit jeruk nipis pada bakteri *S.mutans* ATTC 25175 didapatkan nilai sig $0,735 > 0,05$ yang menunjukkan bahwa data yang di dapatkan homogen.

Setelah didapatkan data yang terdistribusi normal dan homogen. Uji selanjutnya yaitu uji *One Way ANOVA*. Tujuan uji *One Way ANOVA* ini untuk mengetahui apakah data yang diperoleh berbeda signifikan atau tidak. Data dapat dikatakan signifikan apabila nilai sig $<0,05$. Berdasarkan hasil yang didapatkan pada zona hambat bakteri *S.mutans* ATTC 25175 dari kedua sampel tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada setiap variasi konsentrasi.

b. Analisa Data Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan

Data zona hambat bakteri yang didapatkan pada penelitian ini dianalisis secara statistik menggunakan SPSS versi 29. Karena kekuatan daya hambat antara daun dan kulit jeruk nipis sama, maka dibandingkan dengan kelompok kontrol untuk mengetahui ada perbedaan yang signifikan atau tidak terhadap kelompok kontrol. Analisis pertama yang dilakukan yaitu uji normalitas dan dilanjutkan uji homogenitas. Hasil analisis data statistik zona hambat bakteri antara kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 10 dan Tabel 11.

Tabel 10. Perbandingan Ekstrak Daun Jeruk Nipis dengan Kontrol

Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	Uji Homogenitas <i>Levene's</i>	Uji <i>Kruskal Wallis</i>	Uji <i>Post Hoc</i>
0,000	0,004	0,010	0,159

Tabel 11. Perbandingan Ekstrak Kulit Jeruk Nipis dengan Kontrol

Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	Uji Homogenitas <i>Levene's</i>	Uji <i>Kruskal Wallis</i>	Uji <i>Post Hoc</i>
0,003	0,004	0,004	0,057

Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena, data yang didapatkan kurang dari 50. Uji *Shapiro-Wilk* dilakukan untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak. Data yang terdistribusi normal apabila nilai sig >0,05. Berdasarkan hasil analisis uji *Shapiro-Wilk* pada Tabel 10 dan Tabel 11 data yang didapat tidak terdistribusi normal. Uji selanjutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene's*. Uji *Levene's* dilakukan untuk mengetahui apakah data terdistribusi homogen atau tidak. Data yang homogen apabila nilai sig >0,05. Berdasarkan hasil uji *Levene's* pada Tabel 10 dan Tabel 11 menunjukkan bahwa data yang di dapatkan tidak homogen.

Selanjutnya karena data yang diperoleh tidak terdistribusi normal dan homogen, maka data tidak memenuhi asumsi untuk dilanjutkan

menggunakan uji *One Way ANOVA*. Namun pengujian tetap dapat dilanjutkan menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Tujuan uji *Kruskal Wallis* ini untuk mengetahui apakah data yang diperoleh berbeda signifikan atau tidak. Data dapat dikatakan signifikan apabila nilai sig $<0,05$. Berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* pada Tabel 10 dan Tabel 11 menunjukkan bahwa data rata-rata zona hambat yang di dapatkan signifikan.

Tabel 12. Hasil Analisis Data Statistik Zona Hambat Daun dan Kulit jeruk Nipis

Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	Uji Homogenitas <i>Levene's</i>	Uji One Way ANOVA
0,998	0,815	0,223
0,850		

Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena, data yang didapatkan kurang dari 50. Uji *Shapiro-Wilk* dilakukan untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak. Data yang terdistribusi normal apabila nilai sig $>0,05$. Berdasarkan hasil analisis uji *Shapiro-Wilk* zona hambat bakteri *S.mutans* pada kedua sampel terdistribusi normal. Uji selanjutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene's*. Uji *Levene's* dilakukan untuk mengetahui apakah data terdistribusi homogen atau tidak. Data yang homogen apabila nilai sig $>0,05$. Berdasarkan hasil uji *Levene's* pada data sampel daun dan kulit jeruk nipis pada bakteri *S.mutans* ATTC 25175 didapatkan nilai sig 0,815 $>0,05$ yang menunjukkan bahwa data yang di dapatkan homogen.

Setelah didapatkan data yang terdistribusi normal dan homogen. Uji selanjutnya yaitu uji *One Way ANOVA*. Tujuan uji *One Way ANOVA* ini untuk mengetahui apakah data yang diperoleh berbeda signifikan atau tidak. Data dapat dikatakan signifikan apabila nilai sig $<0,05$. Berdasarkan hasil yang didapatkan pada zona hambat bakteri *S.mutans* ATTC 25175 dari kedua sampel tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada setiap variasi konsentrasi.

B. Pembahasan

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan desain eksperimental laboratorium untuk mengetahui perbandingan efektivitas aktivitas antibakteri.

Penelitian ini diawali dengan melakukan determinasi tumbuhan. Tujuan dilakukannya determinasi adalah untuk memastikan kebenaran spesies tanaman yang digunakan, sehingga dapat mencegah kesalahan dalam pengambilan sampel (Anjaswati *et al.*, 2021). Berdasarkan hasil determinasi, menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan merupakan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

Proses pengambilan senyawa metabolit sekunder pada daun dan kulit jeruk nipis dilakukan menggunakan metode maserai dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Pemilihan metode maserasi karena, peralatan dan cara pengerjaan yang sederhana serta tidak merusak zat aktif yang tidak tahan akibat pemanasan, dimana metode ini merupakan metode ekstraksi cara dingin (Suhendar *et al.*, 2019). Daun dan kulit jeruk nipis mengandung senyawa tanin, minyak atsiri, saponin, alkaloid dan fenol. Senyawa tersebut memiliki daya antibakteri, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri (Sari & Asri, 2022). Alasan menggunakan pelarut etanol 70% karena etanol 70% bersifat polar, sehingga mampu melarutkan senyawa yang bersifat polar juga seperti flavonoid (Pertwi *et al.*, 2022). Selain itu pelarut etanol 70% ini memiliki 30% air yang diharapkan dapat membasahi simplisia sehingga zat penyari dapat masuk ke dalam dinding sel simplisia (Maharadingga *et al.*, 2021). Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dengan pelarut pada suhu ruang serta terhindar dari cahaya matahari dan sesekali dilakukan pengadukan (Anjaswati *et al.*, 2021). Mekanisme yang terjadi pada proses maserasi yaitu terjadinya proses difusi pelarut yang kemudian masuk ke dalam sel tumbuhan untuk mengekstrak senyawa yang terdapat pada tumbuhan tersebut (Kiswando, 2011).

Hasil ekstraksi metode maserasi berupa ekstrak kental yang kemudian dihitung % rendemennya. Syarat rendemen yang baik untuk tanaman jeruk nipis yaitu tidak kurang dari 15,0% (Depkes RI, 2017). Berdasarkan hasil perhitungan rendemen pada Tabel 3. Masing-masing sampel didapatkan % rendemen lebih dari 15,0%, sehingga rendemen yang didapatkan sudah memenuhi syarat ekstrak. Hasil %rendemen daun lebih tinggi yaitu sebesar 25,79%, sedangkan hasil %rendemen kulit jeruk nipis yaitu sebesar 19,79%. Data hasil rendemen tersebut ada hubungannya dengan jumlah senyawa aktif dari suatu sampel, sehingga apabila

jumlah rendemen besar maka semakin banyak jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam sampel (Lamadjido *et al.*, 2019). Hal ini di dukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Herlina *et al.*, (2020) beliau menyatakan bahwa kandungan flavonoid total pada bagian daun jeruk nipis lebih tinggi dibandingkan bagian kulit jeruk nipis.

Pada masing-masing ekstrak dilakukan uji kualitatif skrining fitokimia untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis berupa uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin terpenoid dan steroid. Berdasarkan Tabel 5 didapatkan hasil skrining fitokimia dari ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis yaitu ekstrak positif senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, terpenoid. Pada identifikasi senyawa alkaloid, menggunakan tiga pereaksi yaitu pereaksi Mayer, Dragendroff dan Wagner. Sampel yang positif mengandung alkaloid jika direaksikan dengan pereaksi Mayer akan menghasilkan endapan putih, sampel yang di reaksikan dengan pereaksi Dragendroff akan menghasilkan endapan berwarna jingga dan sampel yang direaksikan dengan pereaksi Wagner akan menghasilkan endapan merah kecoklatan (Agustina *et al.*, 2017). Hasil identifikasi senyawa alkaloid dalam ekstrak daun menunjukkan hasil positif pada 2 pereaksi Mayer dan Dragendroff karena adanya endapan yang terbentuk. Hal ini bisa terjadi karena senyawa alkaloid mengandung atom nitrogen yang memiliki pasangan elektron bebas yang dapat membentuk ikatan kovalen koordinat bersama ion logam sehingga terbentuklah endapan (Aprilia & Yanti, 2019). Hasil identifikasi pada kulit jeruk nipis menunjukkan hasil positif setelah direaksikan dengan ketiga pereaksi. Dapat dikatakan ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis mengandung senyawa alkaloid. Selaras dengan penelitian Novriyanti *et al.*, (2019) dan Siregar *et al.*, (2020) yang menyatakan bahwa daun dan kulit jeruk nipis mengandung senyawa alkaloid.

Penentuan senyawa flavonoid pada sampel direaksikan ekstrak dengan magnesium dan HCl pekat. Penambahan magnesium dan HCl akan menyebabkan berkurangnya senyawa flavonoid yang terdapat dalam sampel sehingga akan menimbulkan reaksi berwarna kuning jingga hingga merah (Parbuntari *et al.*, 2018). Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis

mengandung senyawa flavonoid. Hal ini juga selaras dengan penelitian Novriyanti *et al.*, (2019) dan Siregar *et al.*, (2020) yang menyatakan bahwa daun dan kulit jeruk nipis mengandung senyawa flavonoid.

Penentuan senyawa saponin pada sampel dapat dilihat dengan terbentuknya buih yang stabil. Saponin mengandung glikosil yang termasuk gugus polar. Senyawa yang memiliki gugus polar bersifat sebagai surfaktan alami, sehingga jika dikocok dengan kuat, saponin akan membentuk buih (Parbuntari *et al.*, 2018). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dimana terbentuknya busa stabil setelah ditambahkan dengan larutan HCL 2N, maka dapat disimpulkan ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis mengandung senyawa saponin. Selaras dengan penelitian Mustiqawati & Yolandari (2022) dan Pratiwi *et al.*, (2017) yang menyatakan bahwa daun dan kulit jeruk nipis mengandung senyawa saponin.

Penentuan senyawa tanin pada sampel menggunakan pereaksi FeCl_3 1%, karena tanin termasuk senyawa polifenol. FeCl_3 akan bereaksi membentuk gugus fenol dengan terbentuknya lautan yang berubah menjadi kehitaman (Harbone, 1996). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan terbentuknya warna hijau kehitaman, maka dapat dikatakan ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis mengandung senyawa tanin. Hal ini juga selaras dengan penelitian Novriyanti *et al.*, (2019) dan Siregar *et al.*, (2020) yang menyatakan bahwa daun dan kulit jeruk nipis mengandung senyawa tanin.

Penentuan senyawa terpenoid dan steroid yaitu dengan penambahan CH_3COOH dan H_2SO_4 . Jika hasil berwarna ungu atau jingga menunjukkan positif terpenoid, dan menunjukkan positif steroid apabila menghasilkan warna biru. Hasil penelitian didapatkan bahwa adanya perubahan warna jingga pada kedua ekstrak yang menandakan bahwa ekstrak positif mengandung terpenoid. Hal tersebut selaras dengan penelitian Ruslan *et al.*, (2022) dimana hasil penelitian didapatkan hasil negatif steroid pada ekstrak kulit jeruk nipis. Hal ini juga selaras dengan penelitian Kasi, (2012) yang menyatakan bahwa daun jeruk nipis mengandung terpenoid.

Untuk membuktikan lebih lanjut adanya kandungan flavonoid di dalam daun dan kulit jeruk nipis maka dilakukan uji KLT. Senyawa flavonoid akan

tampak berwarna kuning pada sinar UV. Plat KLT harus di aktivasi terlebih dahulu sebelum digunakan, hal ini bertujuan untuk untuk menghilangkan kandungan air yang ada pada plat silika sehingga daya serap plat silika menjadi maksimal dan tidak mengganggu proses elusi (Fasya *et al.*, 2020). Tahap selanjutnya yang dilakukan adalah penjenuhan chamber terlebih dahulu dengan menggunakan eluen (fase gerak) menggunakan kertas saring sebagai indikator kejenuhannya. Tujuan penjenuhan chamber yaitu untuk meratakan tekanan uap dari fase gerak yang digunakan sehingga menghasilkan pemisahan yang optimal (Dewi *et al.*, 2018).

Pemisahan senyawa dengan metode ini diawali dengan optimasi fase gerak terlebih dahulu. Tujuan dilakukannya optimasi fase gerak adalah untuk mengetahui fase gerak dan perbandingannya sehingga akan menghasilkan pemisahan yang optimal. Setelah dilakukan beberapa optimasi fase gerak, ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid yang ditandai adanya bercak dengan warna yang sama dengan kuersetin maka dapat dikatakan bahwa senyawa flavonoid tersebut adalah senyawa flavonoid dengan karakteristik seperti kuersetin (Kunti Mulangsri & Zulfa, 2020). Berdasarkan hasil perhitungan yang tertera pada Tabel 7 didapatkan nilai R_f kuersetin 0,812, sampel yang mengandung senyawa flavonoid ditandai dengan bercak yang sejajar dengan standar kuersetin, maka yang mendekati dengan kuersetin yaitu bercak 3 dan 2 dengan R_f 0,812. Menurut Farida *et al.*, (2020) nilai standar kuersetin pada jeruk nipis yaitu 0,86 dengan menggunakan fase gerak etil asetat: asam format: air (100: 15: 17). Dari hasil yang diperoleh pada penelitian ini hasil R_f kuersetin tidak berbeda jauh dengan penelitian Farida *et al.*, (2020) sehingga dapat dikatakan bahwa kulit dan daun jeruk nipis ini mengandung senyawa flavonoid jenis kuersetin. Setelah dilakukan uji skrining fitokimia dan KLT, didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis positif mengandung senyawa flavonoid.

Parameter uji aktivitas antibakteri adalah diameter zona hambat yang terbentuk disekitar cakram yang mengandung ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis dari setiap konsentrasi, kontrol positif menggunakan klorheksidin 0,2% dan kontrol negatif menggunakan DMSO 10%. Pada penelitian ini DMSO 10%

digunakan untuk membuat seri konsentrasi ekstrak. Alasan menggunakan DMSO 10% sebagai kontrol negatif karena DMSO merupakan pelarut organik yang mampu melarutkan senyawa non polar maupun polar dan tidak dapat membunuh bakteri (Assidqi *et al.*, 2012). Tujuan dilakukannya uji ini yaitu untuk membandingkan efektivitas antibakteri yang ditimbulkan dari ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis terhadap *S.mutans*. Berdasarkan hasil rata-rata zona hambat bakteri *S.mutans* pada Gambar 11 menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis memiliki aktivitas zona hambat dengan kategori kuat dalam menghambat bakteri *S.mutans*. Dilihat dari hasil rata-rata zona hambat bakteri *S.mutans* pada Gambar 11 menunjukkan bahwa ekstrak daun memiliki rata-rata zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak kulit jeruk nipis, Semakin tinggi konsentrasi, maka zona hambat yang terbentuk akan semakin luas. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Parama *et al.*, (2019), semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin besar zona hambat yang terbentuk, karna semakin banyak senyawa yang terkandung.

Hasil pengujian antibakteri kontrol negatif menggunakan DMSO 10% tidak menghasilkan zona hambat. Hal ini sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Sari & Asri (2022) yang menyatakan bahwa tidak terdapat zona hambat pada cakram yang berisi DMSO 10%. Hal ini menunjukkan bahwa DMSO 10% tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis.

Uji aktivitas antibakteri kontrol positif menggunakan klorheksidin 0,2% menunjukkan bahwa rata-rata zona hambat yang didapatkan adalah 19,12 mm. Sejalan dengan penelitian Mervrayano *et al.*, (2015) hasil rata-rata zona hambat yang diperoleh dari klorheksidin 0,2% sebesar 19,4 mm dengan kategori daya hambat kuat. Klorheksidin sebagai senyawa antibakteri yang paling efektif dalam menghambat bakteri Gram positif seperti *S.mutans* (Rosidah *et al.*, 2014). Mekanisme klorheksidin sebagai senyawa antibakteri yaitu dengan menghancurkan permeabilitas dinding sel hingga sel bakteri bocor sehingga bakteri yang terpapar pertumbuhannya akan terhambat dan mati (Ananda *et al.*, 2018).

Parama Wiswananta dalam penelitiannya menyatakan bahwa ekstrak jeruk nipis dengan konsentrasi 40%; 60%; 80% dan 100% dapat menghambat

pertumbuhan *S.mutans* secara in vitro. Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Abdul Razak, menyatakan bahwa air perasan jeruk nipis dengan konsentrasi 25%; 50%; 75% dan 100% dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Sari Novita (2022), menyatakan ekstrak kulit jeruk nipis yang digunakan yaitu konsentrasi 12,5%; 25%; 37,5%; dan 50%, dapat menghambat bakteri *Shigella dysenteriae*. Senyawa kimia yang memiliki aktivitas antibakteri antara lain, flavonoid, tanin, saponin, fenolik, terpenoid, steroid dan alkaloid (Parama *et al.*, 2019). Flavonoid dapat menghambat sintesis DNA dan RNA, menghambat fungsi metabolisme energi sel dan membran sitoplasma sehingga bersifat sebagai antibakteri (Parama *et al.*, 2019). Dapat dilihat pada Gambar 11 rata-rata dari zona hambat yang terbentuk antar replikasi bervariasi. Menurut Zeniusa *et al.*, (2019) hal ini dapat dipengaruhi oleh kekeruhan suspensi bakteri, suhu inkubasi, ketebalan media agar, sampel tidak berdifusi dengan maksimal pada *papper disk*.

Berdasarkan uji statistika *One Way ANOVA* pada kelompok perlakuan didapatkan hasil pada perlakuan ekstrak daun sebesar $0,610 > 0,05$, dan didapatkan hasil pada perlakuan ekstrak kulit sebesar $0,639$. Hal ini menandakan bahwa tidak terdapat perbedaan rata-rata diameter zona hambat yang signifikan pada variasi konsentrasi pada masing-masing kelompok perlakuan.

Nilai signifikansi pada uji statistika perbandingan ekstrak daun jeruk nipis dengan kelompok kontrol yaitu sebesar $0,010$ ($\text{sig} < 0,05$). Hal ini menandakan terdapat perbedaan diameter zona hambat yang signifikan antara penggunaan ekstrak daun jeruk nipis dengan kontrol positif dan negatif. Berdasarkan uji *Post hoc* yang di dapatkan dari uji perbandingan ekstrak etanol daun jeruk nipis dengan kontrol dapat dilihat pada Lampiran 16 nomor 3 poin d terlihat bahwa data diameter zona hambat yang menggunakan ekstrak etanol daun jeruk nipis berada di kolom yang sama dengan kontrol positif. Sementara kontrol negatif berada di kolom lainnya. Hal ini menandakan bahwa aktivitas antibakteri yang dilihat dari diameter zona hambat pada ekstrak etanol daun jeruk nipis tidak jauh berbeda dengan kontrol positif, namun berbeda signifikan dengan kontrol negatif.

Pada uji perbandingan ekstrak etanol kulit jeruk nipis dengan kelompok kontrol yang dapat dilihat pada Tabel 11 terlihat bahwa nilai signifikansinya sebesar 0,004 (sig <0,05). Hal ini menandakan terdapat perbedaan diameter zona hambat yang signifikan antara penggunaan ekstrak etanol kulit jeruk nipis dengan kontrol positif dan negatif. Berdasarkan uji *Post hoc* yang di dapatkan dari uji perbandingan ekstrak kulit jeruk nipis dengan kontrol dapat dilihat pada Lampiran 16 nomor 4 poin d terlihat bahwa data diameter zona hambat yang menggunakan ekstrak etanol kulit jeruk nipis berada di kolom yang sama dengan kontrol positif. Sementara kontrol negatif berada di kolom lainnya. Hal ini menandakan bahwa diameter zona hambat yang menggunakan ekstrak etanol kulit jeruk nipis tidak jauh berbeda dengan kontrol positif, namun berbeda signifikan dengan kontrol negatif. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis tidak jauh berbeda dengan klorheksidin 0,2% dari *S.mutans*.

Berdasarkan uji statistika *One Way ANOVA* antara perbandingan kelompok perlakuan dapat dilihat pada hasil pada Tabel 12. Hal ini menandakan bahwa tidak terdapat perbedaan rata-rata diameter zona hambat yang signifikan pada masing-masing kelompok perlakuan. Sehingga aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun dan kulit jeruk nipis terdapat efektivitas yang sama dalam menghambat bakteri *S.mutans*.