

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Terapan, Universitas Ahmad Dahlan pada tanggal 14 Mei 2024. Hasilnya menunjukkan bahwa daun jeruk nipis yang digunakan adalah spesies *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle. (Lampiran 2)

2. Penyiapan Sampel

Daun jeruk nipis yang dipanen sebanyak 2 kg. Hasil penyiapan sampel dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Penyiapan Sampel

Daun Segar (kg)	Daun Kering (kg)	Serbuk Kering (gram)
2	1,3	800

3. Ekstraksi Daun Jeruk Nipis

Ekstrak daun jeruk nipis diperoleh memakai metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) dengan cara menimbang serbuk simplisia sebanyak 50 gram dengan empat kali pengulangan. Nilai % rendemen yang diperoleh adalah sebesar 13,72% seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Persen Rendemen Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Berat Ekstrak Kental (g)	Rendemen (%)	Referensi (Kemenkes RI, 2022)
27,44	13, 72	Tidak kurang dari 12,6%

4. Uji Kadar Air Ekstrak Etanol 96% Daun Jeruk Nipis

Pengujian ini menggunakan alat *Moisturizer Balance* pada suhu 105°C. Hasil pengujian ini tertera pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Kadar Air Ekstrak Etanol 96%

Kadar Air (MC %)	Referensi (Wandira, 2023)
8,85	≤10 %

5. Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis 96%

Fraksinasi dalam penelitian ini dilakukan dengan metode pemisahan cair-cair memakai corong pisah. Hasil perhitungan rendemen bisa dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Persen Rendemen Fraksi Daun Jeruk Nipis

Sampel	Ekstrak Etanol 96%	Fraksi Kental	Rendemen
	(g)	(g)	(%)
Fraksi n-heksan daun jeruk nipis	20	4,78	23,9
Fraksi etil asetat daun jeruk nipis	20	1,46	7,3
Fraksi air daun jeruk nipis	20	4,71	23,55

6. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia memiliki tujuan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder didalam sampel. Pengujian tertera pada Tabel 6 (Lampiran 6).

Tabel 6. Hasil Skrining Fitokimia

Golongan Senyawa	Hasil Pengamatan		Teori (Andasari, 2020)
	Ekstrak Etanol 96%	Fraksi Etil Asetat	
Flavonoid	+	+	+
Fenolik	+	+	+
Saponin	+	-	+
Tanin	+	+	+
Alkaloid: Mayer	-	-	+
Wagner	-	-	+
Dragendorff	+	+	+

Keterangan:

(+) = terdeteksi golongan senyawa

(-) = tidak terdeteksi golongan senyawa

7. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal DPPH

Panjang Gelombang maksimal diukur dengan spektrofotometri UV-Vis untuk menentukan daerah serapan yang maksimal. Dalam penelitian ini panjang gelombang maksimal dilakukan pada kisaran 400-800 nm. Hasil

scanning tertinggi menunjukkan nilai absorbansi sebesar 1,187 dengan panjang gelombang 517 nm bisa di lihat pada (Lampiran 7).

b. Penentuan *Operating Time*

Operating time bertujuan untuk menetapkan durasi pada waktu sampel uji akan bereaksi dengan senyawa DPPH secara optimal, yang terlihat dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning. *Operating time* dilakukan selama 1 jam dengan mengukur serapannya setiap 1 menit sekali dengan panjang gelombang 517 nm. Hasil *operating time* diperoleh pada menit ke- 30 menit.

c. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH Standar Kuersetin

Pengukuran aktivitas peredaman radikal bebas DPPH kuersetin dilakukan dengan menggunakan seri konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm, lalu dicampurkan dengan larutan DPPH. Didiamkan selama 30 dan diukur dengan panjang gelombang 517 nm. Hasil pembacaan absorbansi uji peredaman radikal bebas DPPH dengan kuersetin tertera pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH Standar Kuersetin

Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
1	5	0,872	26,537	12,843
	10	0,678	42,881	
	15	0,476	59,898	
	20	0,359	69,755	
	25	0,242	79,612	
2	5	0,836	29,570	12,165
	10	0,695	41,449	
	15	0,446	62,426	
	20	0,268	77,422	
	25	0,287	75,821	
3	5	0,865	27,127	12,090
	10	0,696	41,364	
	15	0,416	64,953	
	20	0,260	78,096	
	25	0,240	79,781	
Absorbansi DPPH				1,187
Rata-rata IC ₅₀				12,366
SD				0,414

CV

3,354

Hasil % inhibisi yang sudah diperoleh dari setiap replikasi kemudian digunakan untuk menghitung regresi linier. Persamaan regresi linier untuk replikasi I yaitu $y = 2,6605x + 15,83$ dengan nilai $r = 0,990$, replikasi II yaitu $y = 2,5695x + 18,795$ dengan nilai $r = 0,958$, replikasi III yaitu $y = 2,8408x + 15,653$ dan nilai $r = 0,966$. Grafik hasil regresi tersebut dapat dilihat pada lampiran 10.

- d. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH Ekstrak Etanol 96% dan Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis

Pengujian aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis mendapatkan data hasil absorbansi seperti pada Tabel 8

Tabel 8. Hasil Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH Ekstrak Etanol 96% Daun Jeruk Nipis

Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
1	50	0,523	50	52,838
	100	0,493	52,868	
	150	0,457	56,309	
	200	0,413	60,516	
	250	0,387	63,001	
2	50	0,527	49,617	51,654
	100	0,486	53,537	
	150	0,453	56,692	
	200	0,413	60,516	
	250	0,385	63,191	
3	50	0,530	49,330	53,207
	100	0,486	53,537	
	150	0,445	57,457	
	200	0,411	60,707	
	250	0,380	63,671	
Absorbansi DPPH				1,046
Rata-rata IC ₅₀				52,566
SD				0,811
CV				1,544

Hasil absorbansi dari setiap replikasi yang sudah diperoleh, selanjutnya data tersebut digunakan untuk menghitung % inhibisi dan akan digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ yang diperoleh melalui persamaan

regresi linier $y = bx+a$ dengan memplotkan nilai 50 sebagai y . Hasil grafik persamaan regresi linier dapat dilihat pada lampiran 12.

Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH fraksi etil asetat daun jeruk nipis diperoleh data seperti pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Peredaman Radikal Bebas Fraksi Etil Asetat

Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
1	50	0,594	41,246	139,542
	100	0,524	48,170	
	150	0,502	50,346	
	200	0,452	55,291	
	250	0,409	59,545	
2	50	0,584	42,235	140,482
	100	0,528	47,774	
	150	0,506	49,950	
	200	0,455	54,991	
	250	0,461	58,852	
3	50	0,581	42,532	53,207
	100	0,528	47,774	
	150	0,508	49,752	
	200	0,454	55,094	
	250	0,407	59,742	
Absorbansi DPPH				1,011
Rata-rata IC ₅₀				139,421
SD				1,126
CV				0,807

Hasil % inhibisi dan konsentrasi digunakan dalam persamaan regresi linier. Hasil regresi dari replikasi I yaitu $y = 0,0874x+37,804$ dengan nilai $r = 0,991$, replikasi II yaitu $y = 0,0835x+38,457$ dengan nilai $r = 0,993$, replikasi III yaitu $y = 0,0809x+38,625$ dan nilai $r = 0,992$. Grafik hasil regresi linier dapat dilihat pada lampiran 14.

Berdasarkan hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH nilai IC₅₀ terbaik diperoleh dari standar kuersetin, selanjutnya diikuti oleh ekstrak etanol 96% lalu fraksi etil setat daun jeruk nipis yang tertera pada Tabel 10.

Tabel 10. Kategori Nilai IC₅₀

Sampel	IC ₅₀ (ppm)	Kategori Antioksidan (Basuki, 2021)
Kuersetin	12,856 ± 0,414	Sangat kuat (<50 ppm)
Ekstrak etanol	58,491 ± 52,566	Kuat (50-100 ppm)
Fraksi etil asetat	126,502 ± 1,126	Sedang (100-150 ppm)

8. Analisis Data

Analisis data aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 25 untuk membandingkan nilai IC₅₀ yang didapat dari baku standar kuersetin, ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis. Analisis dengan SPSS bertujuan untuk menentukan apakah data yang didapatkan terdistribusi normal dan juga homogen dengan memakai uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene Statistic*. Hasil uji normalitas dan homogenitas masing-masing sampel menunjukkan data yang normal dan homogen. Berdasarkan hasil pengujian *One Away ANOVA* menggunakan uji *Post Hoc Test* bahwa adanya perbedaan nilai IC₅₀ yang signifikan ($p < 0,05$) antara standar kuersetin, ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis. Hasil analisis bisa dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil Analisi Data Menggunakan SPSS

Nama	Normalitas (<i>Shapiro-Wilk</i>)	Homogenitas (<i>Levene Statistic</i>)	<i>One Way ANOVA</i> (<i>Post Hoc Test</i>)
Standar kuersetin	0,173*		
Ekstrak etanol 96%	0,438*	0,392**	0,000***
Fraksi etil asetat	0,822*		

Keterangan:

* : Terdistribusi normal

** : Terdistribusi homogen

*** : Berbeda secara signifikan

B. Pembahasan

Penelitian ini menggunakan sampel daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang didapat dari kebun warga daerah Sumber Batikan, RT.04, Trirenggo. Kec. Bantul, Kab. Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Determinasi tanaman dilakukan terlebih dahulu sebelum daun jeruk nipis diteliti agar tidak terjadi kesalahan dalam penggunaan tanaman. Berdasarkan hasil determinasi pada (Lampiran 2) telah terbukti jika tanaman yang digunakan yaitu benar tanaman *Citrus aurantifolia*. Daun yang dipanen sebanyak 2 kg, diambil dari jam 06.00- 10.00 WIB. Pemetikan dilaksanakan pada pagi hari dengan tujuan untuk memperoleh senyawa aktif yang optimal (Yuliani & Dienina, 2015). Daun yang dipanen merupakan daun yang masih segar dan terbebas dari jamur.

Daun yang sudah dipanen kemudian di sortasi basah dengan tujuan untuk menghilangkan kotoran maupun benda asing, selanjutnya daun dicuci menggunakan air mengalir untuk melepaskan bahan pengotor lain yang masih tersisa. Daun yang telah dicuci kemudian ditiriskan dan dikering anginkan. Pengeringan tujuannya untuk menurunkan kadar air dalam sampel sehingga dapat mengatasi terjadinya pertumbuhan mikroorganisme (Warnis *et al.*,2020). Pengeringan dilakukan menggunakan oven karena suhunya dapat diatur dan pemanasannya secara merata. Pengeringan menggunakan suhu 50°C untuk menjaga kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam simplisia agar tidak rusak, karena senyawa flavonoid stabil hingga suhu 85°C (Gultom, 2020). Pengeringan berlangsung selama 2 hari dengan parameter kering ketika daun diremas mudah hancur. Daun yang sudah kering kemudian di grinder untuk mengecilkan ukuran partikel karena partikel yang lebih kecil memiliki permukaan yang lebih besar sehingga dapat meningkatkan kontak antara sampel dengan pelarut, sehingga dapat memaksimalkan kecepatan ekstraksi (Asworo & Widwiastuti, 2023). Sampel diayak menggunakan ayakan 40 mesh agar ukuran partikelnya seragam, sehingga pelarut dapat dengan mudah menarik senyawa aktif dari dalam simplisia.

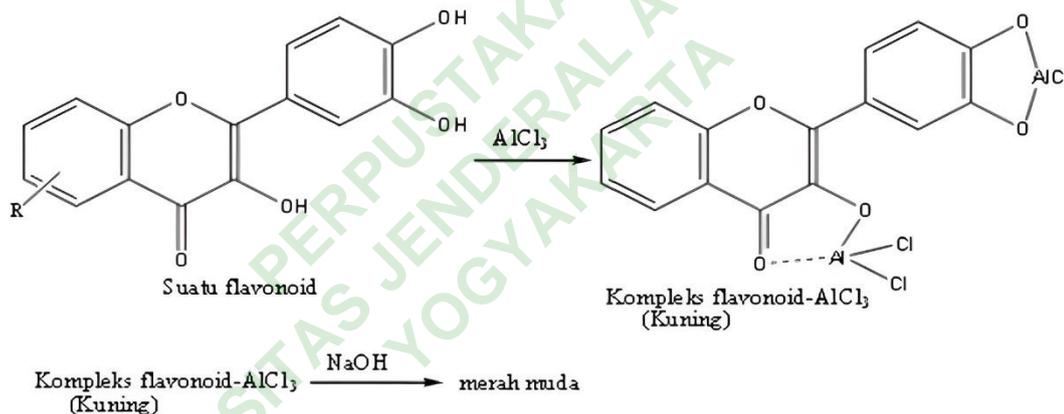
Simplisia yang sudah diayak kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Metode ini memiliki kelebihan diantaranya adalah proses ekstraksi berlangsung lebih cepat dikarenakan ada bantuan getaran

gelombang ultrasonik yang akan meningkatkan pemecahan dinding sel tanaman sehingga memudahkan keluarnya senyawa metabolit sekunder dari dalam sel (Handaratri & Yuniati, 2019). Proses ekstraksi ini menggunakan pelarut etanol 96% karena sifatnya universal, polar, mudah didapat, tidak bersifat toksik, memiliki penyerapan yang baik, dan kemampuan ekstraksinya tinggi (Wendersteyt, 2021). Pelarut etanol bersifat polar yang dapat menyari senyawa polar seperti flavonoid. Proses ekstraksi berlangsung selama 20 menit dengan suhu 27°C-40°C. Ekstrak yang sudah didapatkan kemudian disaring dengan kertas saring guna memisahkan ampas dari filtratnya. Filtrat yang didapat lalu di pekatkan menggunakan suhu 50°C agar tidak merusak kandungan senyawa flavonoid, karena senyawa flavonoid akan terdegradasi pada suhu 85°C (Gultom, 2020).

Ekstrak kental yang sudah diperoleh kemudian ditimbang dan didapat bobotnya sebesar 27,44 gram dengan nilai rendemen sebesar 13,72%. Rendemen yang dihasilkan memenuhi persyaratan karena tidak $\leq 12,6\%$ (Kemenkes RI, 2022). Perhitungan nilai rendemen dilakukan untuk melihat seberapa besar senyawa metabolit yang tertarik. Semakin besar nilai rendemannya artinya semakin besar senyawa metabolit sekunder yang diperoleh (Bani *et al.*, 2023). Hal ini sejalan dengan hasil perolehan kadar air yang juga memenuhi syarat dengan perolehan nilai 8,85% tidak lebih dari 10% karena pelarut yang dipakai dalam ekstrak adalah etanol 96%, yang mana 4% nya adalah air. Kandungan air yang sedikit menyebabkan pelarut dapat lebih efisien dalam menarik senyawa metabolit sehingga perolehan rendemen yang didapat hasilnya baik. Pengujian kadar air perlu dilakukan untuk melihat seberapa besar air yang berada di dalam ekstrak (Luthfiani, 2018). Tingginya kandungan air dapat menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme yang mempengaruhi kualitas kadungan senyawa aktif yang terdapat dalam sampel dan berpengaruh terhadap daya tahan penyimpanan. Hasil rendemen yang baik pada ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis berkaitan juga dengan uji skrining fitokimia, yang mana dari hasil uji menunjukkan sampel daun jeruk nipis positif adanya kandungan senyawa flavonoid, fenolik, saponin dan tanin. Hal ini disebabkan oleh jenis pelarut yang dipakai pada ekstrak bersifat polar, sehingga bisa menarik lebih banyak senyawa yang juga bersifat polar.

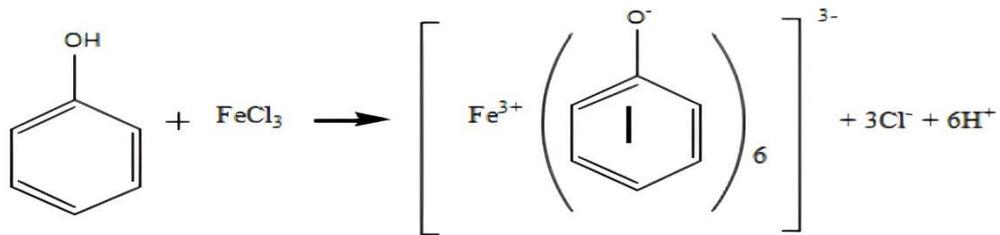
Ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis yang sudah dipekatkan kemudian difraksi cair-cair dengan corong pisah. Dilakukan fraksinasi bertujuan untuk menarik senyawa metabolit sekunder berdasarkan kepolaran pelarut (Saputri, 2023). Pemilihan corong pisah karena kemudahan dalam penggunaannya, dan tingginya selektivitas dalam pemisahan senyawa berdasarkan kepolaran dan massa jenis (Hasanah, 2019). Pelarut yang dipakai pada fraksi adalah n-heksan (nonpolar), etil asetat (semi polar), dan air (polar). Senyawa yang bersifat nonpolar akan terlarut dengan pelarut n-heksan, senyawa semi polar akan larut pada pelarut etil asetat dan senyawa yang bersifat polar terlarut dalam pelarut air. Hasil fraksi akan membentuk 2 fase, fraksi yang memiliki densitas lebih rendah terletak di fase atas, sedangkan fraksi yang memiliki densitas lebih besar terletak di fase bawah (Constanty, 2021). Pada penelitian ini fase bawah adalah fraksi air karena memiliki berat jenis sebesar 1 g/mL yang lebih besar dari pelarut n-heksan (0,6714 g/mL) dan etil asetat (0,8944 g/mL), sedangkan fase atas adalah fraksi n-heksan dan etil asetat. Proses fraksinasi dilakukan sebanyak tiga kali replikasi dari setiap pelarut. Hasil rendemen dari pelarut n-heksan, etil asetat dan air seperti pada Tabel 5. Rendemen yang baik jika nilainya tidak kurang dari 12,6%, yang mana dari ketiga hasil rendemen tersebut yang tidak memenuhi persyaratan adalah fraksi etil asetat, karena rendemen yang dihasilkan kurang dari ketentuan (Kemenkes RI, 2022). Rendemen yang dihasilkan berbeda-beda karena tingkat kepolaran pelarutnya berbeda. Pada penelitian ini pelarut n-heksan menunjukkan rendemen yang paling tinggi dilanjutkan dengan fraksi air dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis. Oleh karena itu, bisa disimpulkan bahwa senyawa metabolit sekunder pada fraksi daun jeruk nipis sebagian besar bersifat non polar (fraksi n-heksan), diikuti dengan senyawa polar (fraksi air) dan semi polar (etil asetat). Fraksi etil asetat daun jeruk nipis tersebut kemudian dilakukan skrining fitokimia dan uji peredaman radikal bebas DPPH bersama ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis. fraksi etil asetat daun jeruk nipis dilakukan uji skrining fitokimia dan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Alasan pemilihan fraksi etil asetat untuk uji lanjutan dikarenakan etil asetat adalah pelarut semi polar yang mampu menyari senyawa metabolit sekunder khususnya flavonoid, kuersetin yang terkandung pada jeruk nipis.

Skrining fitokimia dilakukan pada ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis guna mengetahui golongan senyawa metabolit sekundernya meliputi uji flavonoid, fenolik, saponin, tanin dan alkaloid. Hasil pengujian tersebut tertera pada Tabel menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis positif adanya kandungan senyawa flavonoid, fenolik, saponin dan tanin yang sesuai dengan penelitian Andasari, (2020). Sedangkan fraksi etil asetat daun jeruk nipis mengandung senyawa flavonoid, fenolik, dan tanin. Pada uji senyawa flavonoid, sampel yang mengandung senyawa tersebut akan menunjukkan warna kuning ketika bereaksi dengan AlCl_3 . Adanya warna kuning yang terbentuk menandakan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung adalah kuersetin. Warna kuning ini disebabkan karena terjadi pembentukan senyawa kompleks antara flavonoid dengan AlCl_3 (Marpaung, 2018) seperti pada Gambar 4.



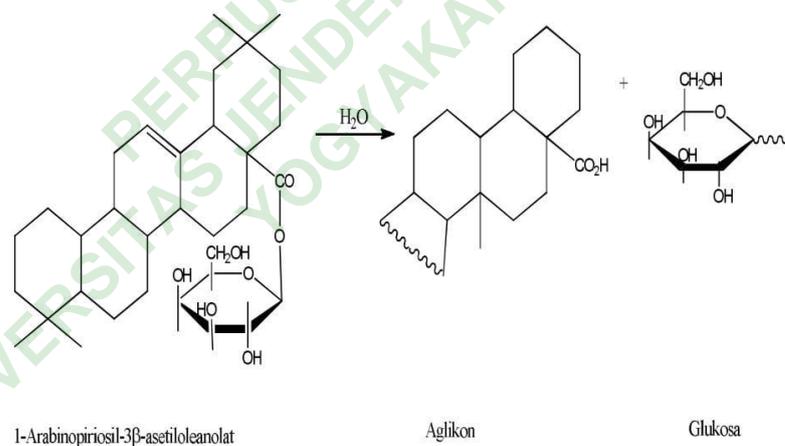
Gambar 4. Reaksi Antara Senyawa Flavonoid dengan AlCl_3 (Lindawati & Ma'ruf, 2020)

Uji senyawa fenolik dilakukan dengan menambahkan FeCl_3 1% yang berfungsi untuk mengidentifikasi gugus fenol yang terdapat dalam sampel (Qodri, 2023). Adanya kandungan senyawa fenolik ditunjukkan dengan munculnya warna hitam kebiruan hingga hitam pekat (Salsabila, 2022). Mekanisme reaksi antara senyawa fenolik dengan FeCl_3 seperti pada Gambar 5.



Gambar 5. Reaksi Antara Senyawa Fenolik dengan FeCl₃ (Putri, 2018)

Uji saponin pada ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis positif mengandung senyawa saponin, karena terbentuk busa yang stabil dengan ketinggian 0,5 cm dan ketika ditetesi dengan HCL 2 N busa tidak hilang. Busa yang terbentuk karena saponin memiliki senyawa hidrofilik yang larut dengan air dengan senyawa hidrofobik yang larut pada pelarut non-polar, berfungsi sebagai surfaktan sehingga mampu mengurangi tegangan permukaan. Ketika dikocok, senyawa hidrofilik berinteraksi bersama air dan senyawa hidrofobik berinteraksi dengan udara dan membentuk buih (Sulistyarini *et al.*, 2019). Reaksi tersebut seperti pada Gambar 6.

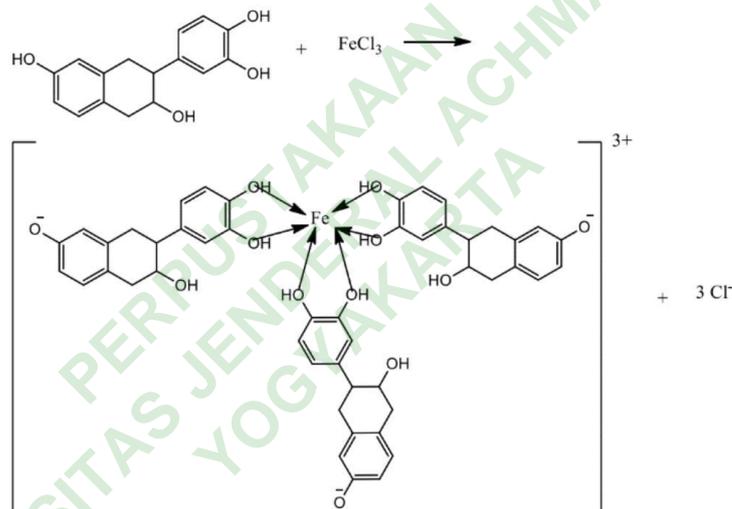


Gambar 6. Reaksi Hidrolisis Saponin dalam Air (Nugrahani, 2016)

Sedangkan pada pengujian fraksi etil asetat daun jeruk nipis tidak menunjukkan adanya senyawa saponin karena tidak membentuk buih setelah pengocokan. Hal ini kemungkinan dapat terjadi karena pada fraksi etil asetat pelarut yang digunakan bersifat semi polar, sedangkan saponin bersifat polar. Oleh karena itu, tidak banyak senyawa yang dapat tertarik sehingga pada saat dilakukan pengujian tidak membentuk buih. Sedangkan pada ekstrak etanol 96% daun jeruk

nipis menunjukkan hasil positif karena pelarut yang dipakai mempunyai sifat polar yang sama dengan sifat senyawa saponin, sehingga penarikan senyawa dapat lebih maksimal.

Pengujian senyawa tanin menggunakan FeCl_3 1% dimana hasil positif terlihat oleh timbulnya warna hijau kehitaman atau biru kehitaman (Salsabila, 2022). Pada penelitian ini positif tanin ditunjukkan dengan adanya warna hijau kehitaman. Warna tersebut muncul karena ada pembentukan senyawa kompleks antara Fe dan tanin, dimana ion Fe^{3+} bertindak sebagai atom inti sementara atom O dalam tanin yang mempunyai elektron bebas berikatan dengan atom inti sebagai ligannya (Qodri, 2023) seperti yang tertera pada Gambar 7.

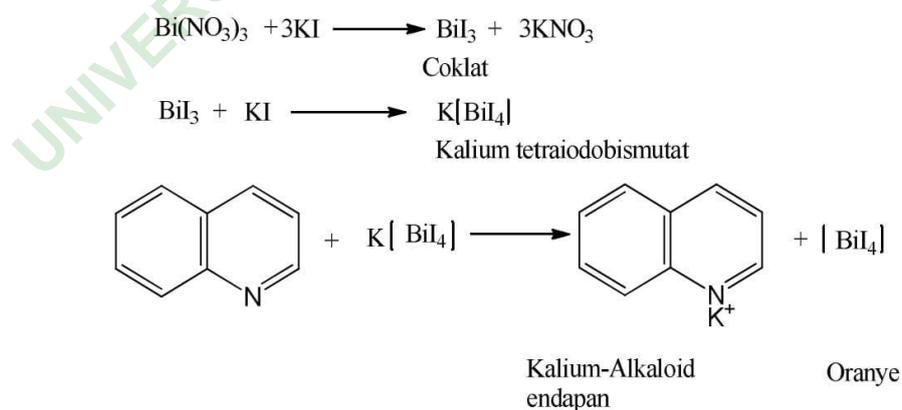


Gambar 7. Reaksi Tanin dengan Polifenol dan FeCl_3 (Sutoyo, 2021)

Tanin dapat terbagi menjadi dua jenis, yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Keduanya akan menunjukkan warna yang berbeda ketika ditambahkan dengan FeCl_3 . Tanin yang terhidrolisis akan berubah warna menjadi biru kehitaman, sedangkan tanin terkondensasi akan berubah warna menjadi hijau kehitaman (Yani *et al.*, 2023). Pada penelitian ini ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis menghasilkan warna hijau kehitaman pada uji tanin yang menunjukkan pada sampel terdapat senyawa tanin terkondensasi.

Alkaloid adalah senyawa yang bersifat basa dan memiliki atom nitrogen, sehingga perlu menambahkan larutan asam. Umumnya, alkaloid dalam tumbuhan

membentuk garam yang berikatan dengan asam organik (Saputra *et al.*, 2022). Pengujian alkaloid pada ekstrak etanol 96% dan fraksi etil aseta daun jeruk dilarutkan menggunakan kloroform untuk melarutkan garam alkaloid. Sedangkan penambahan amoniak sebagai basa lemah akan melepaskan alkaloid dari garamnya (Tulangow *et al.*, 2016). Ditambahkan asam sulfat tujuannya untuk mengekstrak alkaloid yang bersifat basa dengan memanfaatkan larutan asam (Sulistyarini *et al.*, 2019). Reagen yang digunakan dalam uji alkaloid kemudian akan bereaksi menghasilkan endapan kompleks yang mengandung alkaloid (Tulangow *et al.*, 2016). Uji alkaloid dilakukan dengan 3 pereaksi Wagner, Mayer, dan Dragendorff. Apabila positif, pereaksi Mayer akan menunjukkan endapan putih, pereaksi Wagner menunjukkan endapan kuning, sedangkan pereaksi Dragendorff menunjukkan endapan jingga. Alkaloid dikatakan positif apabila dua dari ketiga pereaksi tersebut menunjukkan hasil positif (Subaryanti, 2022). Dari pengujian ini ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis menunjukkan hasil negatif alkaloid, karena hanya pereaksi Dragendorff yang membentuk endapan berwarna jingga. Terjadinya endapan berwarna jingga dikarenakan adanya pergantian ligan, dimana nitrogen pada alkaloid yang mempunyai pasangan elektron bebas akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ dari kalium tetraiodobismutat, oleh karena itu menghasilkan kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Habibi *et al.*, 2018) seperti pada Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Dragendorf (Nugrahani, 2016)

Hasil negatif pada uji Mayer dan Wagner terjadi sebab tidak terbentuknya endapan pada larutan sampel. Hal ini diduga karena alkaloid dalam sampel termasuk kedalam golongan alkaloid purin, yang merupakan basa lemah. Alkaloid purin hanya membentuk garam dengan asam kuat atau asam organik seperti sitrat, natrium asetat atau benzoate, sehingga tidak menghasilkan endapan saat diuji menggunakan pereaksi Mayer maupun Wagner (Sulasmi *et al.*, 2018)

Uji kuantitatif aktivitas peredaman radikal bebas DPPH standar kuersetin, ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis menggunakan DPPH 0,1 mM dengan metode spektrofotometer UV-Vis. Tujuan dilakukan uji kuantitatif ini untuk mengetahui perbandingan nilai IC_{50} dari kedua ekstrak tersebut apakah terjadi perbedaan yang signifikan. Pemilihan DPPH karena penggunaannya sederhana, cepat, mudah dan memerlukan sedikit sampel (Basuki, 2021). Prinsip kerjanya dengan melibatkan atom hidrogen dari senyawa antioksidan mengikat elektron bebas pada senyawa radikal, sehingga mengubah radikal bebas (*diphenylpicrylhydrazyl*) menjadi senyawa nonradikal (*diphenylpicrylhydrazine*). Perubahan ini terlihat adanya perubahan warna ungu menjadi kuning yang menunjukkan bahwa radikal bebas telah direduksi oleh antioksidan (Setiawan *et al.*, 2018). Perubahan warna ini ditandai dengan menurunnya nilai absorpsi DPPH pada panjang gelombang maksimal yang diukur dengan spektrofotometri UV-Vis. Parameternya yaitu nilai IC_{50} , dimana semakin kecil nilai IC_{50} nya berarti semakin kuat aktivitas antioksidannya (Wijayanti, 2023).

Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dilakukan pada panjang gelombang kisaran 400-800 nm. Hasil pengukuran ini didapatkan panjang gelombang maksimal 517 nm sejalan dengan penelitian yang sudah dilakukan oleh Damanis *et al.*, (2020) yang memakai panjang gelombang 517 nm. Panjang gelombang yang sudah peroleh akan digunakan dalam mencari *operating time* dan pengukuran absorbansi sampel pada uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. *Operating time* dilakukan guna melihat durasi pengukuran absorbansi yang diperlukan senyawa uji untuk berinteraksi dengan senyawa DPPH (Basuki, 2021). Penentuan ini di dasarkan pada waktu ketika nilai absorbansi dari larutan uji terhadap DPPH mulai menunjukkan kestabilan (Putri, 2023). *Operating time* diukur

setiap satu menit sekali selama satu jam dengan panjang gelombang 517 nm dengan perolehan hasil *operating time* pada menit ke-30, hasil tersebut sejalan dengan penelitian yang sudah dilakukan oleh Damanis *et al.*, (2020) dan Milwan, (2023) yaitu 30 menit.

Pada penelitian ini menggunakan pembanding kuersetin. Senyawa kuersetin dipilih karena merupakan senyawa flavonoid yang termasuk dalam golongan flavonol yang mempunyai aktivitas antioksidan (Hakim *et al.*,2022). Pada penelitian ini menggunakan standar kuersetin dengan seri konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm yang akan direaksikan dengan larutan DPPH. Pemilihan konsentrasi ini berdasar hukum *Lambert-Beer*, yang menyebutkan bahwa nilai serapan harus berada dalam rentang 0,2-0,8. Tujuannya adalah untuk menghindari kesalahan fotometrik sehingga kesalahan analisis tetap dalam Batasan yang dapat diterima yaitu 0,5%-1% (Lindawati & Ma'ruf, 2020). Nilai absorbansi yang diperoleh dari ketiga replikasi kemudian dihitung % inhibisinya. Semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar % inhibisi, yang berarti semakin banyak senyawa antioksidan dalam ekstrak yang dapat meredam aktivitas radikal bebas antioksidannya (Widyasanti, 2016). Hasil yang diperoleh dari setiap replikasi lalu dimasukkan kepersamaan regresi linier yaitu konsentrasi (sumbu x) dan % inhibisi (sumbu y). Nilai koefisien korelasi (r) yang baik adalah mendekati satu, karena kurva akan linier antara konsentrasi dengan absorbansi. Hasil persamaan regresi linier digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} yang didapatkan dari persamaan regresi linier $y = bx+a$ dengan memplotkan nilai 50 sebagai y dan % inhibisi sebagai x. Dari ketiga replikasi diperoleh rata-rata nilai IC_{50} kuersetin sebesar 12,366 ppm sehingga bisa disimpulkan jika kuersetin mempunyai aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat karena hasil yang diperoleh dibawah 50 ppm. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Milwan,(2023) diperoleh nilai IC_{50} kuersetin sebesar 8,61 ppm. Penelitian lain yang dilakukan oleh Kausar *et al.*,(2023) dan Melsi *et al.*,(2022) menghasilkan nilai IC_{50} kuersetin yaitu 16,774 ppm dan 13,03 ppm. Setelah diperoleh rata-rata nilai IC_{50} lalu dihitung standar deviasi (SD) untuk mengetahui persebaran data dalam sampel dengan data rata-rata. Standar deviasi jika nilainya jauh lebih besar daripada rata-rata maka nilai rata-rata tersebut tidak

menunjukkan data dengan baik, sementara jika nilai SD jauh lebih kecil dibandingkan dengan nilai rata-rata maka rata-rata tersebut menggambarkan keseluruhan data yang baik (Alfian, 2022). Dari perhitungan tersebut diperoleh hasil $0,414 < 12,366$ yang berarti persebaran data yang diperoleh menunjukkan hasil yang cukup baik. Dilanjutkan perhitungan nilai koefisien variasi (CV) diperoleh hasil sebesar 3,354. Nilai CV yang diperoleh memenuhi persyaratan karena nilainya kurang dari 5 (Sri & Nurbayanti, 2017).

Pengujian aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis menggunakan konsentrasi yang sama yaitu 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm. Diperoleh rata-rata nilai IC_{50} dari ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis sebesar 52,566 ppm kategori kuat, dilanjutkan dengan perhitungan nilai SD dan diperoleh sebesar $0,811 < 52,566$ menunjukkan hasil yang cukup baik (Alfian, 2022) dan nilai CV sebesar 1,544 memenuhi ketentuan karena nilai yang diperoleh kurang dari 5 (Sri & Nurbayanti, 2017). Peredaman radikal bebas DPPH pada fraksi etil asetat daun jeruk nipis diperoleh rata-rata IC_{50} sebesar 139,421 ppm kategori sedang. Selanjutnya perhitungan SD diperoleh nilai sebesar $1,126 < 139,421$ menunjukkan hasil yang cukup baik (Alfian, 2022) dan perolehan perhitungan nilai CV sebesar 0,807. Hasil CV memenuhi ketentuan karena nilai yang diperoleh kurang dari 5 (Sri & Nurbayanti, 2017).

Data perolehan nilai rata-rata IC_{50} ekstrak etanol 96% dan fraksi etil asetat dianalisis dengan aplikasi SPSS versi 25. Data hasil uji normalitas terdistribusi normal karena nilai $p > 0,05$. Pengujian berikutnya yaitu uji homogenitas dengan memakai uji *Levene Statistic* bertujuan untuk melihat apakah dua data sampel atau lebih diperoleh dari populasi yang mempunyai varians sama (Sianturi, 2022). Hasil uji *Levene Statistic* yang diperoleh data homogen karena nilai $p > 0,05$. Data yang terdistribusi dengan normal dan homogen kemudian di uji *One Way ANOVA* untuk melihat apakah data tersebut mempunyai perbedaan signifikan. Untuk melihat sampel mana yang menunjukkan selisih yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test*. Hasil tersebut menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam peredaman radikal bebas DPPH antara kuersetin, ekstrak etanol, dan fraksi etil asetat karena $p < 0,05$.

Berdasarkan hasil analisis yang sudah didapatkan, bisa disimpulkan jika hasil uji peredaman radikal bebas DPPH yang lebih baik secara berturut adalah standar kuersetin dengan perolehan nilai IC_{50} sebesar 12,366 ppm kategori sangat kuat (≤ 50 ppm), dilanjutkan oleh ekstrak etanol 96% dengan nilai IC_{50} sebesar 52,566 ppm kategori kuat (50-100 ppm), kemudian fraksi etil asetat daun jeruk nipis dengan nilai IC_{50} sebesar 139,421 ppm kategori sedang (100-150 ppm) dan hasil ini berbeda secara signifikan. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai rata-rata IC_{50} , ekstrak etanol 96% lebih baik dibandingkan dengan nilai rata-rata IC_{50} fraksi etil asetat daun jeruk nipis. Ekstrak mengandung keseluruhan senyawa yang berhasil disari dari suatu tanaman, sehingga senyawa-senyawa tersebut dapat saling bekerja sama untuk menimbulkan aktivitas farmakologisnya. Fraksi telah mengalami proses pemisahan senyawa, dimana adanya pemisahan tersebut diduga dapat mengurangi aktivitasnya. Aktivitas antioksidan dari ekstrak lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi karena salah satu mekanisme kerja bahan alami adalah efek *synergism effect*. *Synergism effect* adalah ketika senyawa-senyawa saling memperkuat untuk memberikan aktivitas farmakologis (Rizki *et al.*, 2022).