BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi

Sampel jeruk nipis yang diidentifikasi diperoleh dari Sumber Batikan, Trirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Yogyakarta pada bulan Juli. Identifikasi tanaman bertempat pada Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Jenderal Ahmad Dahlan Yogyakarta 1 Juli 2024. Hasil identifikasi (Lampiran 2) membuktikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini merupakan jeruk nipis (*Citrus autantifolia*).

2. Preparasi Sampel

Sebanyak 2 kg daun jeruk nipis yang telah dipanen dicuci mengunakan air mengalir guna menghilangkan dari kotoran yang menempel dipermukaan daun. Oven digunakan dalam proses pengeringan dan diatur pada suhu terkontrol yaitu 50℃. Suhu terkendali dipilih untuk memastikan daun jeruk nipis kering secara merata dan tidak mengalami kerusakan (Suhendar *et al*., 2020). Proses pembuatan serbuk simplisia daun jeruk nipis dengan cara menghaluskan simplisia yang sudah kering memakai grinder, untuk memperoleh ukuran partikel yang seragam dilakukan pengayakan dengan ayakan 40 mesh. Pengggilingan dan pengayakan bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel hingga memperluas kontak antara permukaan serbuk dengan pelarut, sehingga proses ekstraksi zat aktif menjadi efektif (Syarifuddin *et al*., 2020). Dari Hasil penghalusan didapatkan serbuk daun jeruk nipis sebanyak 571 g.

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

3. Ekstraksi daun jeruk nipis

Ekstraksi senyawa dilakukan menggunakan etanol 96 % sebagai pelarut yang sama dan metode yang berbeda yaitu metode maserasi dan metode UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*). Dalam proses ekstraksi daun jeruk nipis pelarut tersebut dipilih sebagai pelarut karena memiliki kepolaran sesuai dengan flavonoid yang menjadi target ekstraksi. Pelaksanaan maserasi dilakukan pengadukan stiap 24 jam sekali selama 10 menit agar pelarut menyari senyawa metabolit sekunder pada simplisia dengan sempurna. Ampas hasil maserasi pertama diremasrasi lagi selama 1 hari dengan pelarut yang volumenya setengah dari sebelumnnya. Metode UAE dilakukan selama 60 menit pada suhu 25℃ dan ampasnya di ekstraksi kembali seperti pada tahap awal kemudian disaring ekstrak degan kertas saring. Hasil dari filtrat yang diperoleh dari hasil maserasi dan UAE diuapkan dengan menggunakan penangas air pada suhu terkontrol 50℃ selama 1 hari agar terpisahnya antara pelarut etanol 96% dengan ekstrak. Hasil ekstraksi didapatkan ekstrak kental dengan hasil rendemen yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Rendemen Ekstrak Kental Daun Jeruk Nipis

Metode	Berat Simplisia (g)	Ekstrak Kental + Wadah (g)	Berat Wadah (g)	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)
Maserasi	100	81,05	66,62	14,43	14,43
UAE	100	85,86	77,09	8,77	8,77

Berdasarkan hasil rendemen pada Tabel 2 menunjukan metode maserasi memiliki %rendemen yang lebih baik yaitu 14,43% dibandingankan dengan metode UAE yaitu 8,77%. Dari kedua metode tersebut yang memenuhi persyaratan nilai rendemen yang baik yaitu metode maserasi sedangkan metode UAE tidak memenuhi persyaratan karena nilai rendemen <10% berdasarkan Farmakope Herbal indonesia (Kementrian Kesehatan RI, 2017).

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

4. Skrining Fitokimia

Dilakukannya skrining fitokimia guna menganalisis keberadaan senyawa bioaktif pada ekstrak etanol sampel daun jeruk nipis dengan menggunakan uji tabung. Hasil analisis menunjukan bahwa kedua ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis hasil maserasi dan UAE dipastikan terdapat senyawa fenolik, saponin,tanin, alkaloid, flavonoid, serta terpenoid. Didapatkan hasil analisis dalam Tabel 3 dan Lampiran 5.

Tabel 3. Skrining Fitokimia

Golongan Senyawa		Sampel	
		Maserasi	UAE
Fenolik		+	+
Saponin		+	+
Tanin		+	+
Alkaloid	Mayer	-	+
	Wagner	+	+
	Dragendroff	+	+
Flavonoid		+	+
Terpenoid		+	+

Keterangan :

(+): Positif mengandung senyawa.

(-): Tidak mengandung senyawa.

5. Penenetapan Kadar Flavonoid Total

a. Penentuan panjang gelombang maksimal kuersetin

Pembacaan panjang gelombang maksimal bertujuan untuk menentukan titik maksimal pada kurva absorbansi. Penentuan panjang gelombang menggunakan standar kuersetin konsentrasi 60 ppm. Pembacaan panjang gelombang memakai spektrofotometri UV-Vis dengan rentang 200-700 nm. Hasil pmbacaan panjang gelombang maksimum kuersetin memakai spektrofotometri UV-Vis menunjukan nilai 433 nm, yang mana data tersebut sama dengan penelitian sebelumnya yang diteliti oleh Suhendar *et al.,* (2020) dengan panjang gelombang kuersetin 433 nm.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

b. Penenetapan *operting time* kuersetin

Penetapan OT bertujuan menentukan jangka waktu inkubasi. *Operating time* kuersetin menggunakan standar kuersetin 60 ppm dengan menambahkan CH_3CO_2K, Etanol 500 µL, $AlCl_3$10 % 500 µL dan aquadest 2800 µL. Pengukuran dilakukan selama 60 menit dengan selang waktu satu menit pada λmax = 433 nm. Hasil nilai absorbansi menunjukan waktu stabil dari menit ke 22 – 43, sehinngga *operating time* yang dipakai adalah 22 menit.

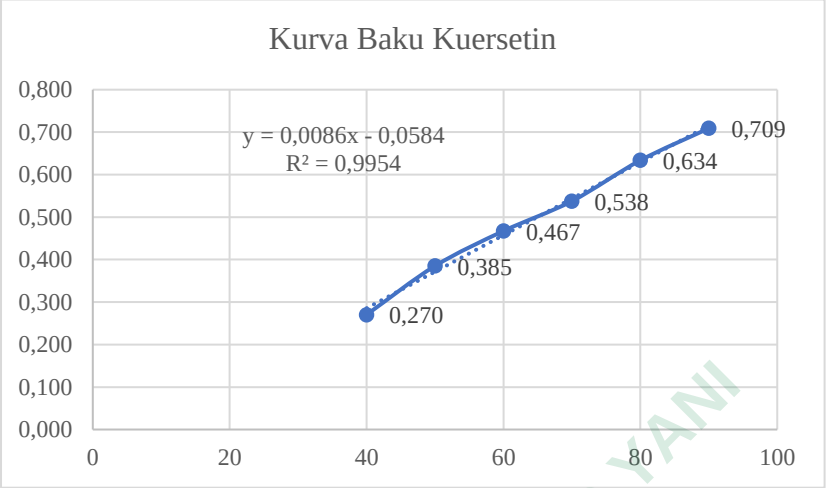
c. Penentapan kurva baku kuersetin

Kurva baku ditetapkan dengan seri konsetrasi 40, 50, 60, 70, 80 ,90 ppm. Seri konsentrasi dibuat dari larutan induk 100 ppm diambil sejumlah 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL dan 9 mL lalu di tambahkan etanol p.a hingga tanda batas 10 mL. Pembuatan dilakukan dengan cara 500 µL dari setiap konsentrasi kuersetin dan ditambahkan 500 µL etanol, 500 µL kalium asetat, 500 µL $AlCl_3$ 10% dan aquades 2800 µL lalu didiamkan 22 menit lalu dibaca pada panjang gelombang maksimal 433 nm. Data pada Tabel 4 menunjukan adanya korelasi antara konsentrasi kuersetin dan absorbansi yang dimana semakin besar konsentrasi dari kuersetin maka semakin besar pula nilai absorbansi yang terukur

Tabel 4. Absorbansi Kurva Baku Kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata ± SD
40	0,270 ± 0,0545
50	0,385 ± 0,0272
60	0,467 ± 0,0068
70	0,537 ± 0,0186
80	0,633 ± 0,0130
90	0,709 ± 0,0187

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN



Gambar 11. Kurva Baku Kuersetin

Berdasarkan analisis regresi linier antara konsentrasi dan absorbansi kurva baku standar kuersetin menghasilkan persamaan regresi linier y = 0,0086x – 0,0584 dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar = 0,9954. Nilai r (+1) atau yang mendekati 1 menunjukan bahwa konsentrasi dengan absorbansi memiliki hubungan yang kuat. Persamaan ini dipakai untuk menghitung kadar flavonoid total ekstrak daun jeruk nipis hasil maserasi dan UAE.

d. Penentuan Kadar Flavonoid Total

Tujuan penetapan kadar flavonoid total ialah guna mengidentifikasi seberapa besar nilai flavonoid total pada ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis memakai metode spektrofotometri UV-Vis memakai kuersetin sebagai pembanding dan larutan $AlCl_3$. Nilai absorbansi yang telah didapat kemudian dihitung dengan perhitungan kadar flavonoid total dengan memasukan nilai abssorbansi sampel dalam persamaan regresi linier y = 0,0086x – 0,0584 r = 0,9954. Hasil absorbansi dan kadar diperoleh sebagai y dan x kemudian dimasukan dalam persamaan rumus TFC (*Total Flavonoid Content*) dengan mengalihkan kadar dengan volume yang digunakan (mL) kemudian dikali dengan faktor pengenceran lalu dibagi dengan sampel (g) yang digunakan. Hasil perhitungan akhir kadar flavonoid dapat dilihat pada Tabel 5..

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Tabel 5. Kadar Flavonoid Total

Metode	Flavonoid Total (mg QE/g) ± SD	CV (%)
Maserasi	36,876 ± 0,386	0,89
UAE	38,626 ± 0,321	0,76

Metode UAE menghasilkan kadar flavonoid total sebesar 38,626 mg QE/g dan metode maserasi yaitu sebesar 36,876 mg QE/g. Berdasarkan perbandingan rata-rata kadar flavonoid total pada kedua metode ekstraksi dapat disimpulkan bahwa metode UAE terbukti lebih efektif dalam mengekstraksi flavonoid dari daun jeruk nipis.

6. Analisis Data

Hasil dari data penelitian dianalisis secara statistik menggunakan perangkat lunak SPSS. Uji homogenitas (*Levene's*) dan normalitas (*Shapiro-Wilk*) dengan taraf kepercayaan 95% membuktikan hasil yang yang terdistribusi normal dan juga homogen ($p<0,05$). Selanjutnya data diuji T–*Independent* guna melihat perbedaan antar kadar flavonoid total ekstrak daun jeruk nipis dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil uji menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan secara statistik antara kadar flavonoid total maserasi dan UAE ($p<0,05$).

Tabel 6. Hasil Uji Statistika Flavonoid total

Metode	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji T-Test
Maserasi	0,006*	0,799**	0,004***
UAE	0,262*		

Keterangan: Sig >0,05 data terdistribusi normal (*), Sig >5,05 data terdistribusi homogen (**), Sig (2-tailed) <0,05 terdapat perbedaan signifikan (***).

B. Pembahasan

Di penelitian ini menggunakan desain eksperimental guna mengidentifikasi pengaruh dari metode ekstraksi terhadap kadar flavonoid total dari daun jeruk nipis. Tahap awal penelitian ini adalah melakukan determinasi tumbuhan. Proses

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

determinasi ini sangat penting untuk memastikan tanaman yang dipakai pada penelitian adalah tanaman yang benar yaitu jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) (Lampiran 2). Oleh karena, itu dapat dipastikan bahwa semua data dan hasil penelitian yang diperoleh berasal dari spesies tanaman yang benar. Daun jeruk nipis dipanen pada bulan Juli 2024 di Sumber Batikan, Trirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Yogyakarta. Tanaman dikeringkan mengguakan oven pada suhu 50℃ untuk mencegah rusaknya kandungan simplisia terutama senyawa flavonoid. Senyawa flaavonoid diketahui dapat terdegradasi pada suhu diats 60℃ (Widyasari *et al*., 2020). Penghalusan serbuk simplisia guna untuk memperkecil ukuran partikel agar dapat meningkatkan lusa permukaan hingga proses ekstraksi jadi lebih maksimal (Prasetyo *et al*., 2022).

Proses pengambilan senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan memakai metode ekstraksi maserasi dan metode UAE. Metode maserasi dipakai karena kesederhanaan peralatan dan prosedur kerjanya. Selain itu, metode ini termasuk esktraksi dingin sehingga menghindari degradasi senyawa termolabil (Suhendar *et al*., 2019). Sedangkan metode UAE dipilih karena memiliki kelebihan dibandingkan metode ekstraksi maserasi ialah cepatnya perpindahan masa lebih cepat, dapat menigkatkan penetrasi cairan menuju dinding sel, dan mengefisiensi waktu dan pelarut yang digunakan (Fauziyah *et al*., 2022). Ekstraksi serbuk simplisia menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Pemilihan etanol 96% sebagai pelarut didasarkan pada sifat polarnya yang mampu melarutkan senyawa-senyawa polar yaitu flavonoid (Suhendar *et al*., 2020).

Setelah proses ekstraksi, dilakukan penyaringan untuk memisahkan ampas dengan pelarut dan mendapatkan ekstrak bening, kemudian ekstrak diuapkan menggunakan penangas air pada suhu 50 ℃ sehingga didapatkan ekstrak kental (Puspitasari *et al*., 2013). Pada proses pengentalan digunakan suhu 50℃ karena mencegah terdegradasi senyawa flavonoid pada suhu diatas 60℃ sehingga suhu yang dipakai tersebut masih aman. Hasil ekstrak kental dari metode maserasi dan UAE kemudian dihitung % randemennya untuk mengetahui perbandingan berat ekstrak yang didapatkan pada berat simplisia, nilai rendemen yang besar menunjukkan banyaknya komponen senyawa aktif yang terkandung di dalamnya.

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

Semakin besar rendemennya semakin banyak kandungan zat yang terbawa di suatu bahan baku (Senduk *et al*., 2020). Besar kecilnya nilai rendemen merupakan parameter yang menentukan keberhasilan proses ekstraksi (vifta *et al*., 2019). Rendemen yang baik ialah tidak <10 % (Depkes RI, 2017). Hasil perhitungan randemen pada Tabel 2. Metode maserasi didapatkan % rendemen sebesar 14,43% yang berarti memenuhi syarat standar yang ditetapkan, sedangkan metode UAE sebesar 8,77% tidak memenuhi syarat. Efektifitas proses ekstraksi terpengaruhi beberapa faktor yaitu jenis pelarut, ukuran partikel, metode ekstraksi, dan lama proses ekstraksi. Metode maserasi menghasilkan nilai rendemen yang lebih tinggi dibandingkan metode UAE dikarenakan maserasi menggunakan masa ekstraksi yang lebih lama hingga kontak antar pelarut pada simplisia lebih optimal (Syarifuddin *et al*., 2020).

Semua ekstrak yang diperoleh dilakukan analisis kualitatif berupa skrining fitokimia untuk mengidentifikasi kandungan zat aktif di ekstrak daun jeruk nipis berupa uji fenolik, saponin, tanin, alkaloid, flavonoid, terpenoid. Dari uji skrining fitokimia membuktikan ekstrak daun jeruk nipis mengandung senyawa fenolik, saponin, tannin, alkaloid, flavonoid, dan terpenoid dan untuk hasil lengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil ini sejalan dengan penelitian (Yanuarty *et al*., 2021) menyebutkan jika daun jeruk nipis memiliki senyawa fenolik, saponin, tanin, lakaloid, flavonoid dan terpenoid. Penentuan senyawa fenolik pada sampel direaksikan ekstrak dengan tiga tetes larutan $FeCl_3$, reaksi positif dari hasil ditunjukan terbentuknya kompleks ungu kehitaman yang berasal dari besi (III) klorida (Qomaliyah *et al*., 2023). Keberadaan zat aktif pada sampel yaitu saponin dapat diamati saat terbentuknya buih yang stabil. Saponini diketahui mempunyai glikosil yang termasuk gugus polar. Sifat surfaktan alami dari saponin, yang disebabkan oleh gugus glikosis polarnya, memungkinkan terbentuknya buih saat sampel dikocok. Hal ini selaras dengan penelitian sebelumnya yang dimana terbentuknya buih yang stabil setelah ditambahkan HCl pekat (Oktavia & Sutoyo, 2021). Pembentukan busa yang stabil mengindikasikan adanya saponin, identifikasi tanin dengan menggunakan reagen $FeCl_3$ 1% perubahan warna menjadi hitam kehijauan setelah penambahan $FeCl_3$ 1% merupakan hasil indikasi adanya tannin.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Reaksi ini terjadi karena $FeCl_3$ bereaksi dengan gugus fenol dalam struktur tanin sehingga terbentuknya larutan yang berubah menjadi kehitaman (Oktavia & Sutoyo, 2021).

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan memakai tiga pereaksi yaitu, pereaksi Mayer, Dragendroff dan Wagner. Tiap pereaksi akan memberikan hasil yang berbeda jika bereaksi dengan alkaloid. Pereaksi Mayer terkandung kalium iodida dan merkuri klorida, endapan yang teradi karena adanya reaksi antara alkaloid dengan kalium iodida sehingga terbentuk endapan putih dengan hasil uji dinyatakan positif pada ekstrak UAE tetapi tidak pada maserasi. Faktor yang dapat mempengaruhi hasil negatif pada uji alkaloid metode maserasi menggunakan pereaksi mayer salah satunya ialah konsentrasi alkaloid yang rendah. Jika konsentrasi alkaloid dalam sampel rendah maka tidak cukup untuk membentuk endapan yang terlihat dengan reagen Mayer selain itu ekstraksi pada UAE melibatkan gelombang ultrasonik sehingga dapat menarik senyawa alkaloid lebih banyak dibandingkan dengan maserasi (Novita Sari et al., 2019). Pereaksi Wagner mengandung kalium iodida dan iodium sehingga ikatan kovalen koordinasi terbentuk antara ion logam K^+ dan atom N, sehingga tebentuk endapan kompleks kalium alkaloid dengan warna coklat, (Erwan & Parbuntari, 2023). Bismuth nitrat dan kalium iodida yang terkandung di pereaksi Dragendroff dalam larutan asam asetat anhidrat, reaksi yang terjadi antara alkaloid dan pereaksi dragendroff yaitu ligan mengalami subtitusi dimana atom N memiliki pasangan elektron bebas dan dari kalium tetraiodobismut hingga membentuk endapan jingga (Erwan & Parbuntari, 2023). Hasil uji menggunakan reagen Dragendorff dan reagen Wagner untuk identifikasi alkaloid membuktikan bahwa alkaloid positif terkandung dalam kedua ekstrak.

Senyawa flavonoid pada sampel ditentukan dengan magnesium dan HCl pekat (Sangi *et al*., 2012). Senyawa flavonoid akan tereduksi pada saat penambahan magnesium dan HCl pekat. Hal ini ditandai dengan munculnya reaksi berwarna kuning hingga merah. Hasil pengujian menunjukan bahwa esktrak daun jeruk nipis maserasi dan UAE membentuk warna kuning bertanda jika ekstrak positif terdpat flavonoid. Penentuan senyawa terpenoid yaitu dengan penambahan pereaksi

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Bouchardat. Pada kedua ekstrak menghasilkan jingga kecoklatan yang menandakan bahwa kedua ekstrak positif mengandung senyawa terpenoid (Robbiyan *et al*., 2021).

Kadar flavonoid ditentukan memakai metode spektrofotometri UV-Vis yang melibatkan reaksi membentuk warna kompleks antara flavonoid dan alumunium klorida. Penambahan alumunium klorida menghasilkan kompleks dengan gugus hidroksi keton sehingga warna yang dihasilkan dapat dilihat gelombang *visible.* Struktur flavonoid dan flavonol mempunyai gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 berdampingan (Azizah *et al*., 2014). Penentuan kadar flavonoid dihitung menggunakan persamaan regeresi linier y = 0,086x - 0,0584 r = 0,9954, nilai r yang didapatkan mendekati 1 menunjukan hubungan yang kuat antara absorbansi dan konsentras. Kemudian nilai x yang diperoleh didistribusikan kedalam rumus perhitungan TFC. Metode maserasi menghasilkan kadar flavonoid total sebesar 36,876 ± 0,386 mg QE/g dengan nilai CV 0,89%, sedangkan Metode UAE sebesar 38,626 ± 0,321 mg QE/g dengan nilai CV 0.76%. Nilai CV yang dihasilkan sudah baik karena kurang dari 5% persyaratan nilai CV (Pratiwi, 2021). Berdasarkan hasil dapat disimpulkan bahwa metode ekstraksi UAE daun jeruk nipis menghasilkan kadar flavonoid total lebih baik dibandingkan dengan metode maserasi. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian (Suhendar *et al*., 2020) pada sampel daun iler, metode UAE menghasilkan kadar lebih tinggi sebesar 0,6252 mg QE/g dibandingkan dengan metode maserasi yaitu 0,415 mg QE/g. Metode esktraksi UAE melibatkan aplikasi gelombang ultrasonik pada frekuensi tinggi yaitu 20 kHz (20000 Hz) pada suhu terkontrol yaitu 25℃ untuk dapat memecah dinding sel yang akan membantu terlepasnya senyawa aktif keluar (Suhendar *et al*., 2020), sedangkan metode maserasi hanya melibatkan perendaman simplisia dalam pelarut dengan pengadukan secara berkala (Suhendar *et al*., 2020). Adanya perbedaan metode esktraksi juga dapat dihubungkan antara nilai rendemen dengan kadar flavonoid total. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai rendemen dengan kadar flavonoid total tidak berkorelasi positif. Rendemen ekstrak yang diperoleh dari metode maserasi sebesar 14,43% dengan kadar flavonoid total36,876 ± 0,386 mg

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

QE/g sedangkan metode UAE menghasilkan rendemen sebesar 8,77% dan kadar flavonoid total 38,626 ± 0,321 mg QE/g. Besarnya rendemen ekstrak tidak berkolerasi positif dengan kadar flavonoid total karena efisiensi ekstraksi senyawa aktif sangat dipengaruhi oleh metode esktraksi yang digunakan (Suhendar *et al*., 2020). Komposisi rendemen yang lebih besar mungkin lebih banyak senyawa non-flavonoid seperti alkaloid, saponin, tanin dan sebagainya yang tidak memiliki kontribusi signifikan terhadap nilai flavonoid total, dengan kata lain metode maserasi mengekstraksi flavonoid dengan konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan UAE. Metode UAE menggunakan bantuan gelombang ultrasonik yang bisa memecah dinding sel simplisia sehingga memaksimalkan penarikan senyawa metabolit sekunder terutama flavonoid.

Analisis dilakukan dengan uji *Independent Sample T-test* program SPSS, yang dimana untuk menentukan adanya perbedaan yang signifikan dari dua kelompok data yang tidak berhubungan. Uji homogenitas dan normalitas untuk memastikan data kadar flavonoid terdistribusi homogen dan normal. Uji statistik *Independent Sample T-Test* membuktikan bahwa adanya perbedaan yang signifikan antara kadar flavonoid total yang diperoleh dari hasil UAE dan maserasi ($p<0,05$). Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa perpedaan metode ekstraksi mempengaruhi kadar flavonoid total pada daun jeruk nipis.

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA