BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman

Sampel tanaman jeruk nipis dideterminasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yoyakarta pada tanggal 22 April 2024 dengan nomor surat 192/Lab.Bio/B/IV/2024. Tujuan determinasi yaitu untuk membuktikan kebenaran identitas tanaman yang digunakan dalam penelitian. Hasil determinasi menegaskan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini memang dari spesies (*Citrus aurantifolia*) dengan hasil detailnya dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

2. Persiapan sampel

Sampel daun jeruk nipis yang digunakan diambil pada bulan Mei 2024 di Sumber Batikan, Trirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Daun jeruk nipis diambil sebanyak 3 kg pada pagi hari, dipilih daun ketiga hingga daun ke lima dari pucuk. Daun jeruk nipis dibersihkan melalui proses sortasi basah agar terhindar dari hama kutu putih dan daun berjamur, selanjutnya dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran, kemudian untuk mempercepat proses pengeringan, daun jeruk nipis dipotong kecil-kecil. Daun jeruk nipis dikeringkan dengan oven pada suhu 60℃ selama 3 hari, untuk mengurangi kadar air dan memperkecil tumbuhnya mikroba (Warnis *et al*., 2020). Proses penghalusan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk, selanjutnya diayak menggunakan ayakan ukuran 40 mesh untuk mendapatkan ukuran serbuk yang seragam dan memperbesar luas permukaan partikel simplisia. Semakin luas permukaan semakin kecil ukuran partikel sehingga diperoleh hasil ekstraksi yang maksimal (Pujiastuti & Andreana, 2022).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

3. Ekstraksi sampel

Sampel daun jeruk nipis yang sudah diserbukhaluskan dan diayak kemudian diekstraksi menggunakan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) dengan perbandingan 1:10 menggunakan tiga jenis pelarut yaitu etanol 96%, metanol, dan aseton yang bersifat polar namun memiliki indeks kepolaran yang berbeda yaitu 5,2; 5,1; 5,1. Serbuk daun jeruk nipis sebanyak 100 gram, ditambahkan dengan masing-masing pelarut 1000 mL. Ekstraksi dilakukan selama 30 menit pada suhu 40℃ dengan sonikator (*Cole Parmer Waterbath Sonicator*). Hasil ekstraksi masing-masing pelarut kemudian disaring menggunakan kertas saring, dilakukan pengulangan ekstraksi dengan pelarut baru sebanyak 500 mL dan disaring kembali, dilanjutkan dengan penguapan menggunakan penangas air pada suhu 50℃ sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental masing-masing pelarut ditimbang dan dihitung untuk mendapatkan nilai rendemen. Hasil rendemen ekstrak daun jeruk nipis dapat dilihat pada **Tabel 4**. Berdasarkan hasil yang diperoleh, menunjukkan bahwa daun jeruk nipis ekstrak etanol 96% dan metanol memiliki nilai rendemen yang tinggi yaitu 19,22% dan 13,38% dan memenuhi syarat karena tidak kurang dari 10% (Tenda *et al*., 2023). Sedangkan pada pelarut aseton sebesar 5,82% dan tidak memenuhi syarat karena kurang dari 10%.

Tabel 4. Data Rendemen Ekstrak Daun Jeruk Nipis

No	Bahan Tanaman	Bobot serbuk daun jeruk nipis (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
1	Ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis	100	19,22	19,22
2	Ekstrak metanol daun jeruk nipis		13,38	13,38
3	Ekstrak aseton daun jeruk nipis		5,82	5,82

4. Uji organoleptik

Uji organoleptik dilakukan untuk menilai kualitas ekstrak secara langsung dengan mengamati bentuk, warna, bau, dan rasa ekstrak. Tujuannya untuk mengetahui apakah ekstrak mengalami kerusakan akibat pemanasan atau

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

proses penyimpanan yang dapat mempengaruhi mutu ekstrak. Adapun hasil organoleptik masing-masing ekstrak dapat dilihat pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Data Organoleptik Ekstrak Daun Jeruk Nipis

No	Parameter	Hasil karakteristik ekstrak daun jeruk nipis		
		Etanol 96%	**Metanol**	**Aseton**
1	Bentuk	Kental	Kental	Kental
2	Warna	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman
3	Bau	Khas	Khas	Khas
4	Rasa	Pahit	Pahit	Pahit

5. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam daun jeruk nipis. Adapun uji yang dilakukan yaitu uji alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin dan saponin. Pada pengujian alkaloid diencerkan dengan kloroform, NH_3 dan H_2SO_4 pekat dikarenakan senyawa alkaloid bersifat basa dan jika ditambahkan dengan asam akan terbentuk garam alkaloid (Kapondo *et al*., 2020). Uji alkaloid dibagi dalam tiga tabung reaksi, pereaksi Dragendroff dimasukkan dalam tabung (I), pereaksi Mayer dimasukkan ke tabung (II), dan pereaksi Wagner dimasukkan ke tabung (III) masing-masing 1 tetes. Uji alkaloid dengan pereaksi Dragendroff menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya endapan berwarna jingga. Uji Mayer hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih atau kekuningan. Uji Wagner hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan jingga hingga coklat. Berdasarkan **Tabel 6**, ketiga pereaksi pada pelarut etanol 96%, metanol dan aseton dikatakan positif karena terdapat warna endapan yang sesuai menurut Katja, (2020) dapat dilihat pada **Lampiran 5**.

Pengujian fenolik dilakukan dengan penambahan $FeCl_3$ 1% menunjukkan hasil positif, ditandai dengan munculnya warna biru tua atau hijau kehitaman pada larutan (Manongko *et al*., 2020). Pada pengujian flavonoid dengan penambahan Mg dan HCl pekat menunjukkan hasil positif, dengan terjadinya perubahan warna merah, kuning, dan jingga pada larutan sehingga dapat diartikan sampel mengandung senyawa flavonoid (Katja, 2020). Pengujian tanin dengan menambahkan larutan $FeCl_3$ 1% menunjukkan hasil positif dengan perubahan warna biru tua atau hijau kehitaman pada larutan

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

menandakan positif senyawa tanin (Manongko *et al*., 2020). Hasil pengujian dapat dilihat di **Lampiran 5**.

Pengujian saponin dilakukan dengan penambahan aquades dan dipanaskan 2-3 menit dinyala api bunsen menunjukkan hasil negatif, dengan tidak terbentuk buih atau busa (**Lampiran 5**), sehingga tidak mengandung senyawa saponin, yang mana uji saponin dikatakan positif jika terdapat buih atau busa stabil (Katja, 2020). Berdasarkan keseluruhan hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton positif mengandung senyawa alkaloid, fenolik flavonoid dan tanin. Adapun hasil data uji skrining fitokimia yang teridentifikasi terangkum pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Data Skrining Fitokimia Daun Jeruk Nipis

No	Jenis uji	Ekstrak daun jeruk nipis			Literatur (Katja, 2020; Manongko *et al*., 2020)
		Etanol 96%	Metanol	Aseton	
1	Alkaloid				
	a. Dragendroff	(+)	(+)	(+)	Endapan jingga
	b. Mayer	(+)	(+)	(+)	Endapan putih, kuning
	c. Wagner	(+)	(+)	(+)	Endapan jingga, coklat
2	Fenolik	(+)	(+)	(+)	Hijau kehitaman
3	Flavonoid	(+)	(+)	(+)	Kuning
4	Tanin	(+)	(+)	(+)	Hijau kehitaman
5	Saponin	(-)	(-)	(-)	Buih atau busa

Keterangan: (+) Menunjukkan ada kandungan senyawa, (-) Menunjukkan tidak ada kandungan senyawa.

6. Uji kromatografi lapis tipis (KLT)

Uji KLT bertujuan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa ekstrak. Pada penelitian ini yaitu untuk mengidentifikasi kandungan senyawa flavonoid pada ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis dengan kuersetin sebagai senyawa penanda. Pada uji KLT digunakan fase diam silika gel 60 F_{254}, dan didapat fase gerak paling optimal setelah dilakukan optimasi dapat dilihat pada **Tabel 7**.

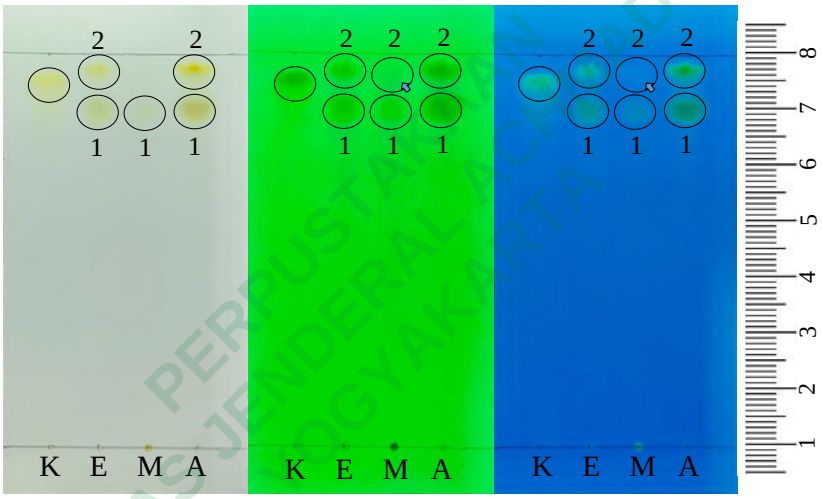
Tabel 7. Hasil Optimasi Fase Gerak Uji KLT

No	Fase gerak	Hasil
1	Toluen : aseton : asam format (4:4:2)	Bercak sejajar dan tidak terjadi pemisahan

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

2	n-butanol : asam asetat : aquades (3:1:1)	Bercak tidak sejajar dan terelusi sampai garis batas
3	Etil asetat : metanol : aquades (1:4:5)	Bercak sejajar yang terelusi terlalu tinggi dengan pemisahan yang baik

Berdasarakan hasil optimasi pada **Tabel 7**, fase gerak etil asetat, metanol, dan aquades (1:4:5) dipilih karena menghasilkan pemisahan yang paling optimal pada standar maupun ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis. Konsentrasi pembuatan larutan standar dan ekstrak yang digunakan untuk penotolan yaitu 1% (b/v). Hasil pemisahan senyawa dapat dilihat pada **Gambar 6**.



Gambar 6. Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Keterangan: 1. Sinar tampak; 2. Sinar UV 254 nm; 3. Sinar UV 365 nm; (K) standar kuersetin; (E) Ekstrak etanol; (M) Ekstrak metanol; (A) Ekstrak aseton. Fase gerak Etil asetat : Metanol : Aquades (1:4:5).

Hasil pengamatan uji KLT pada sinar tampak, sinar UV 254 nm dan sinar UV 365 nm dapat dilihat pada **Gambar 6**, pengamatan dibawah sinar tampak dapat disimpulkan terdapat bercak jelas bewarna kuning dari standar kuersetin, eksrak etanol 96%, metanol dan aseton. Pengamatan dibawah sinar UV 254 nm menunjukkan masing-masing ekstrak etanol 96%, metanol, aseton dan standar kuersetin bewarna kuning kehijauan, sedangkan pada sinar UV 365 nm bercak bewarna kuning jelas untuk standar kuersetin dan ekstrak etanol 96%, kemudian ekstrak metanol berwarna kuning pudar dan ekstrak aseton berwarna kuning kehijauan. Berdasarkan warna bercak yang terbentuk, hasil uji

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

KLT menunjukan ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton diduga mengandung senyawa flavonoid, yang mana hasil positif mengandung senyawa flavonoid dilihat dari warna bercak yang sama dengan standar kuersetin. Berdasarkan yang dinyatakan Putri *et al*., (2023) yaitu hasil positif jika terbentuknya bercak berwarna kuning. Masing-masing bercak menghasilkan nilai Rf yang dapat dilihat pada **Tabel 8**.

Tabel 8. Nilai Rf Daun Jeruk Nipis

No	Sampel	Warna pada plat KLT			Hasil	
		Sinar tampak	Sinar UV 254 nm	Sinar UV 365 nm	Bercak	Rf
1	Kuersetin	Kuning	Kuning kehijauan	Kuning		0,93
2	Ekstrak etanol 96%	Kuning	Kuning kehijauan	Kuning	1	0,86
					2	0,95
3	Ekstrak metanol	Kuning	Kuning kehijauan	Kuning	1	0,86
					2	0,95
4	Ekstrak aseton	Kuning	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan	1	0,86
					2	0,95

Berdasarkan **Tabel 8**, nilai Rf yang diperoleh ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton pada bercak 1 yaitu sebesar 0,86 kemudian pada bercak 2 sebesar 0,95 yang menunjukkan positif mengandung senyawa flavonoid kuersetin, karena hasil pada bercak 2 tidak berbeda jauh dengan hasil nilai Rf standar kuersetin yaitu 0,93. Hasil tersebut dikatakan tidak baik karena melewati rentang 0,2-0,8 (Raharjo *et al*., 2023). Pada ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton juga terdapat bercak dengan nilai Rf 0,86 yang mana menunjukkan terdapat senyawa lain pada ekstrak.

7. Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk menentukan panjang gelombang keberapa DPPH stabil dalam menghasilkan absorbansi yang maksimal. Pengukuran sangat bergantung pada absorbansi tertinggi yang dapat dicapai. Untuk menentukan panjang gelombang maksimum, larutan DPPH diukur dengan spektrofotometer UV-Vis dalam rentang panjang gelombang 400-800 nm. Hasil panjang gelombang yang diperoleh

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

516 nm dapat dilihat pada **Lampiran 7**. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian Yanuarty, (2021) yaitu 517 nm. Radikal bebas DPPH stabil dengan panjang gelombang maksimum berada sekitar 515-520 nm (Tenda *et al*., 2023).

b. Penentuan *operating time*

Penentuan *operating time* dilakukan untuk mengetahui waktu inkubasi ideal bagi larutan sampel dan pembanding saat bereaksi dengan larutan DPPH yang sudah dicampurkan agar bereaksi secara optimal, dan untuk menentukan menit keberapa DPPH stabil pada saat dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang masimum. *Operating time* dilakukan ketika nilai absorbansi mencapai kondisi stabil. Konsentrasi sampel yang digunakan yaitu 10 ppm, yang mana penentuan dilakukan dengan interval waktu 1 menit selama 1 jam. Hasil dikatakan stabil ditandai dengan tiga atau lebih nilai absorbansi yang sama. Hasil yang stabil diperoleh pada menit ke-44 dapat dilihat pada **Lampiran 8**. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian Hasanah *et al*., (2023) bahwa hasil stabil pada menit ke-43, yang mana menit tersebut senyawa antioksidan dan radikal bebas DPPH telah bereaksi secara maksimal.

c. Penetapan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

Penentuan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH oleh kuersetin dan ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis dengan perbandingan 1:2, kuersetin dan ekstrak sebanyak 1 mL dengan DPPH 2 mL dimasukkan dalam tabung reaksi yang ditutup aluminium foil agar terhindar dari cahaya, dan diinkubasi selama 44 menit untuk memaksimalkan reaksi antara senyawa antioksidan dan radikal bebas DPPH. Masing-masing konsentrasi dibuat sebanyak 3 kali replikasi. Pembacaan absorbansi pada panjang gelombang maksimum 516 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Hasil pengujian DPPH dengan pembanding kuersetin dapat dilihat pada **Lampiran 10**, yang mana pembanding kuersetin menghasilkan persamaan regresi linear y=1,4337x+41,784 dengan nilai koefisien korelasi r^2 = 0,997 yang didapatkan dari hubungan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

antara konsentrasi vs %inhibisi. Semakin tinggi konsentrasi, %inhibisi semakin meningkat. Nilai IC_{50} ditentukan dengan perhitungan berdasarkan persamaan regresi linear, yang mana dari hasil perhitungan diperoleh nilai IC_{50} kuersetin sebesar 5,731 ppm.

Pengujian DPPH pada ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis dapat dilihat pada **Lampiran 11**. Hasil persamaan regresi linear yang diperoleh ekstrak etanol 96% yaitu y=0,074x+45,796 dengan nilai r^2 = 0,995 diperoleh nilai IC_{50} sebesar 56,811 ppm. Ekstrak metanol diproleh persamaan regresi linear y=0,056x+46,24 dengan r^2 = 0,9971. Hasil diperoleh nilai IC_{50} ekstrak metanol 67,143 ppm, kemudian hasil persamaan regresi linear yang diperoleh ekstrak aseton yaitu y=0,0605x+44,535 nilai r^2 = 0,9902 dengan hasil nilai IC_{50} yang diperoleh sebesar 90,331 ppm.

Dari keseluruhan hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH kuersetin, ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton masing-masing diperoleh nilai IC_{50} sebesar 5,731 ppm; 56,811 ppm; 67,143 ppm dan 90,331 ppm. Artinya pembanding kuersetin maupun ekstrak mampu menghambat 50% radikal bebas DPPH, sehingga berdasarkan kategori antioksidan, nilai IC_{50} kuersetin dikategorikan sangat kuat, dan ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton dikategorikan kuat. Hasil kategori IC_{50} pembanding kuersetin maupun ekstrak dapat dilihat pada **Tabel 9**.

Tabel 9. Hasil Kategori Nilai IC_{50}

No	Ekstrak	IC_{50} (ppm)	Kategori (Anggriani & Anggarani, 2022)
1	Kuersetin	5,731	Sangat kuat (<50 ppm)
2	Etanol 96%	56,811	Kuat (50-100 ppm)
3	Metanol	67,143	
4	Aseton	90,331	

8. Analisis Data

Analisis data perbedaan jenis pelarut terhadap aktivitas peredaman radikal bebas DPPH daun jeruk nipis menggunakan SPSS *Statistics* 25. Uji Shapiro Wilk digunakan untuk menguji normalitas, dan uji Levene digunakan untuk menguji homogenitas, kedua uji ini dipilih karena data pada penelitian ini <50. Berdasarkan pada **Tabel 9**, hasil pengujian nilai IC_{50} dari kuersetin, ekstrak

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis menunjukkan masing-masing terdistribusi normal dan homogen (p>0,05). Data yang terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *One Way* ANOVA, yang mana uji ini dipilih karena ingin membandingkan tiga jenis pelarut yang berbeda terhadap hasil IC_{50}. Berdasarkan uji *One Way* ANOVA terdapat perbedaan signifikan antara nilai IC_{50} pembanding kuersetin, ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis (p<0,05). Adapun hasil analisis IC_{50} pembanding kuersetin dan ekstrak dapat dilihat pada **Tabel 10**.

Tabel 10. Hasil Analisis Peredaman Radikal Bebas DPPH

No	Ekstrak (IC_{50})	Normalitas (Shapiro Wilk)	Homogenitas (Levene Statistic)	ANOVA
1	Kuersetin	0,598*****		
2	Etanol	0,934*****	0,156*****	0,000******
3	Metanol	0,225*****		
4	Aseton	0,964*****		

Keterangan: *: Terdistribusi normal dan homogen (Sig.>0.05), ******: Terdapat perbedaan yang signifikan (Sig.<0.05).

B. Pembahasan

Pada penelititan ini bertujuan untuk membandingkan pengaruh jenis pelarut ekstraksi daun jeruk nipis yaitu etanol 96%, metanol dan aseton terhadap aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Pemilihan jenis pelarut merupakan hal yang sangat penting saat melakukan proses ekstraksi, yang mana pada penelitian Salim *et al.*, (2019) menyatakan bahwa proses ekstraksi menggunakan jenis pelarut berpengaruh terhadap aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Sebelum melakukan penelitian pada tanaman jeruk nipis, terlebih dahulu dilakukan determinasi. Determinasi bertujuan untuk membuktikan kebenaran identitas tanaman yang akan digunakan, yang mana hasil menyatakan bahwa sampel yang ingin digunakan benar spesies tanaman jeruk nipis. Daun jeruk nipis kemudian dipanen pada pagi hari dengan kriteria daun tidak terlalu muda dan tua, dipilih daun ketiga hingga kelima dari pucuk. Panen pada pagi hari dilakukan untuk menjaga agar daun jeruk nipis tetap dalam keadaan masih segar atau belum banyak terjadi penguapan senyawa metabolit sekunder yang disebabkan oleh suhu tinggi dan tanaman belum mengalami fotosintesis (Sosilowati & Sari, 2020). Pengeringan daun jeruk nipis

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

menggunakan oven dengan suhu 60℃, suhu tersebut cukup baik untuk pengeringan, karena senyawa metabolit sekunder flavonoid tidak tahan pemanasan terlalu tinggi diatas 60-70℃ (Dewi *et al*., 2021).

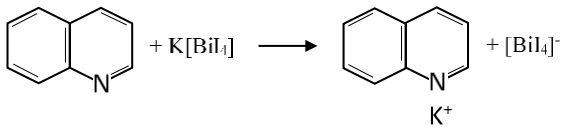
Pemilihan pelarut etanol 96%, metanol dan aseton dikarenakan, berdasarkan Yanuarty, (2021) menyatakan bahwa daun jeruk nipis mengandung senyawa kuersetin, yang mana senyawa tersebut merupakan senyawa golongan flavonoid yang bersifat polar. Berdasarkan hal tersebut penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96%, metanol dan aseton yang bersifat polar dalam melakukan proses ekstraksi. Metode ekstraksi penelitian ini menggunakan metode UAE yang mana prinsipnya gelombang ultrasonik akan mengenai sampel, menghasilkan gelembung-gelembung kecil (kavitasi) dan akan memecah dinding sel, sehingga mempermudah senyawa yang ingin diekstraksi dari sampel ditarik oleh pelarut (Torres *et al*., 2017). Metode UAE dipilih karena merupakan metode ekstraksi non-konvensional yang membutuhkan waktu lebih cepat dibanding dengan metode ekstraksi konvensional, kemudian dilanjutkan penguapan pelarut ekstraksi daun jeruk nipis dengan suhu 50℃. Suhu tersebut dipilih karena cukup baik untuk menguapkan daun jeruk nipis, yang mana suhu yang terlalu tinggi dapat merusak senyawa dalam daun jeruk nipis. Menurut Dewi *et al*., (2021) bahwa senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid sangat sensitif terhadap pemanasan suhu tinggi diatas 60°C.

Hasil penguapan ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton masing-masing sebesar 19,22 gram; 13,38 gram dan 5,82 gram dan didapatkan nilai rendemen yaitu ekstrak etanol 96% sebesar 19,22%; metanol 13,38% dan aseton 5,82%. Hasil nilai rendemen ekstrak etanol 96% dan metanol memenuhi syarat remdemen menurut Tenda *et al*., (2023), karena tidak kurang dari 10%, sedangkan ekstrak aseton kurang dari 10%. Hal tersebut terjadi karena pelarut aseton lebih mudah menguap dibandingkan dengan pelarut etanol 96% dan metanol pada saat proses ekstraksi maupun penguapan. Semakin tinggi nilai rendemen menandakan senyawa metabolit sekunder dapat terekstraksi secara maksimal. Menurut pernyataan Ramadhani *et al*., (2023) rendemen dapat mempengaruhi aktivitas peredaman radikal bebas DPPH, dimana lebih tinggi nilai %rendemen menyebabkan semakin

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

besar nilai penghambatan radikal bebas DPPH. Ekstrak kental hasil penguapan dapat dilihat pada **Lampiran 3**, selanjutnya dilakukan uji organoleptik meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa pada ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis, dengan bentuk ekstrak yang kental, berwarna hijau kehitaman, berbau khas ekstrak daun jeruk nipis dan memiliki rasa yang pahit. Hasil pengamatan dapat dilihat pada **Tabel 5**.

Pada pengujian fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dalam daun jeruk nipis menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda. Senyawa yang diuji yaitu alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin dan saponin. Hasil ketiga jenis pelarut yaitu ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis positif mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, fenolik, flavonoid dan tanin akan tetapi pada pengujian saponin hasil negatif. Pada uji alkaloid hasil positif dengan dilakukan penambahan kloroform, NH_3 dan H_2SO_4 sebelum ditambahkan pereaksi, hal tersebut dikarenakan alkaloid bersifat basa sehingga direaksikan dengan pelarut asam (Karlina & Nasution, 2022). Pengujian alkaloid pada ketiga ekstrak daun jeruk nipis menunjukkan hasil positif pada pereaksi Dragendroff yang mana terbentuk endapan berwarna jingga karena terdapat reaksi antara bismuth dan kalium iodida menjadi bismuth (III) iodide yang mengendap, sehingga menjadi kalium kompleks tetraiodobismutat yang mengendap (Dewi *et al*., 2021). Atom nitrogen membentuk ikatan khusus yang disebut ikatan kovalen koordinat (K^+) dengan menyumbangkan semua pasangan elektron (Hasan *et al*., 2023). Mekanisme reaksi senyawa alkaloid dengan pereaksi Dragendroff dapat dilihat di **Gambar 7**.

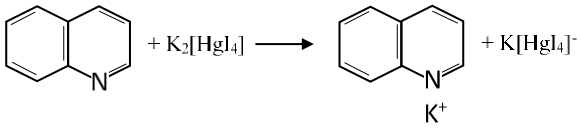


Gambar 7. Reaksi Senyawa Alkaloid dengan Pereaksi Dragendroff (Hasan *et al*., 2023)

Pereaksi Mayer terbentuknya endapan berwarna kuning dan putih kekuningan. Warna yang muncul saat uji alkaloid dengan pereaksi Mayer disebabkan oleh adanya reaksi antara nitrogen dalam alkaloid dan ion logam K^+, terbentuknya kalium alkaloid kompleks yang mengendap oleh kalium

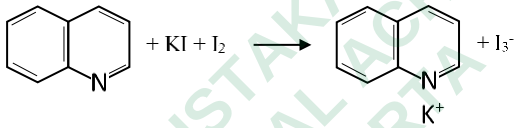
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

tetraiodomerkurat (II) (Dewi *et al*., 2021). Mekanisme reaksi senyawa alkaloid dengan pereaksi Mayer dapat dilihat di **Gambar 8**.



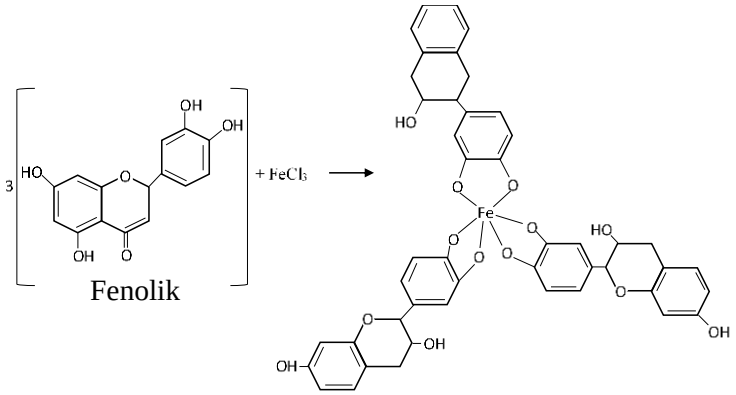
Gambar 8. Reaksi Senyawa Alkaloid dengan Pereaksi Mayer (Hasan *et al*., 2023)

Pada pereaksi Wagner terbentuk endapan berwarna jingga disebabkan oleh adanya reaksi antara iodin dan ion I^- dalam kalium iodida sehingga menghasilkan ion I_3^-. Terbentuk ikatan kovalen karbohidrat dengan nitrogen pada ion logam K^+, sehingga terbentuk menjadi endapan kalium iodide kompleks (Alviani *et al*., 2022). Mekanisme reaksi senyawa alkaloid dengan pereaksi Wagner dapat dilihat di **Gambar 9**.



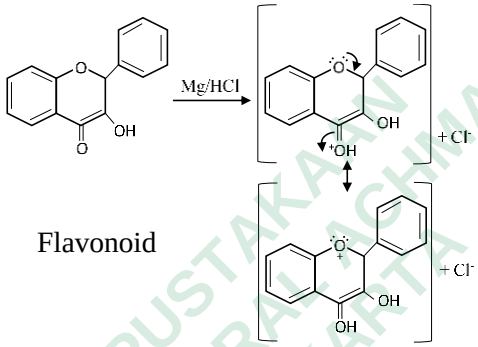
Gambar 9. Reaksi Senyawa Alkaloid dengan Pereaksi Wagner (Noviyanty & Hepiyansori, 2018)

Hasil perubahan warna dari pereaksi Dragendroff, Mayer dan wagner tersebut sesuai yang dinyatakan oleh Setiawan, (2013), positif adanya senyawa alkaloid apabila minimal di dapat endapan pada dua atau lebih pereaksi yang dilakukan. Pada uji fenolik dilakukan penambahan $FeCl_3$ 1% dikatakan hasil positif dengan terbentuk warna hijau kehitaman pada masing-masing ekstrak yang mana disebabkan adanya reaksi antara $FeCl_3$ dengan gugus hidroksil (-OH) aromatis sehingga terbentuk sebagai besi (III) heksafenolat (Alviani *et al*., 2022). Mekanisme reaksi senyawa fenolik dapat dilihat di **Gambar 10**.

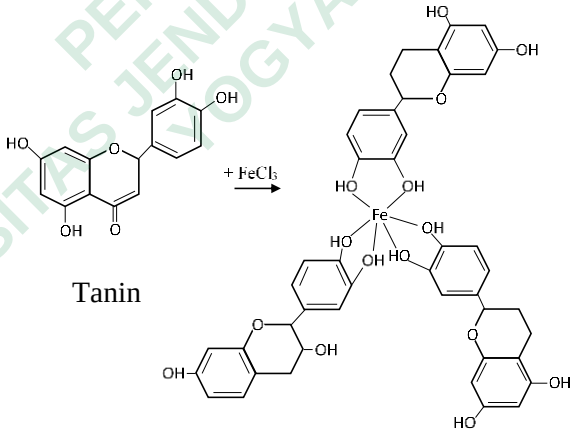


Gambar 10. Reaksi Senyawa Fenolik (Rismawati *et al*., 2018)

Uji flavonoid menunjukkan hasil positif, dengan perubahan warna menjadi kuning dengan menambahkan Mg dan HCl, adanya Mg dan HCl menyebabkan inti benzopiron dalam molekul flavonoid mengalami reduksi dengan terbentuknya warna menjadi kuning (Karlina & Nasution, 2022). Pada uji tanin dengan penambahan $FeCl_3$ 1% dikatakan hasil positif, hal tersebut dikarenakan adanya perubahan warna menjadi hijau kehitaman akibat reaksi antara $FeCl_3$ dan gugus -OH pada senyawa tanin (Dewi *et al*., 2021). Mekanisme reaksi senyawa flavonoid dan tanin dapat dilihat di **Gambar 11** dan **12**.



Gambar 11. Reaksi Senyawa Flavonoid (Hasan *et al*., 2023)



Gambar 12. Reaksi Senyawa Tanin (Hasan *et al*., 2023)

Pada uji saponin hasil negatif pada masing-masing eksatrak ditandai dengan tidak adanya buih atau busa yang stabil karena tidak adanya penambahan HCl. Sesuai dengan yang dilakukan pada masing-masing ekstrak diambil sebanyak 1 mL, lalu dicampurkan dengan aquades 1 mL, dipanaskan hingga 2-3 menit (Katja, 2020). Hasil perlakuan tersebut bertentangan dengan temuan Magfirah *et al*., (2022); Musiam *et al*., (2018) yang berhasil mengidentifikasi adanya senyawa saponin pada ekstrak daun jeruk nipis karena penambahan aquades dan HCl 2 N,

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

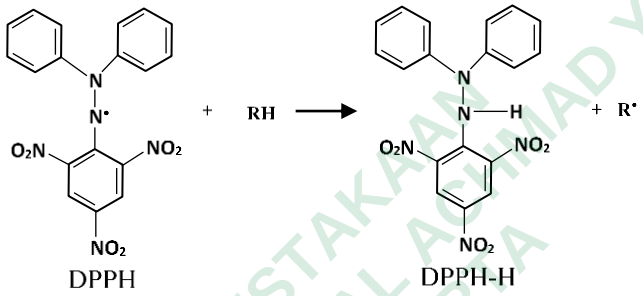
yang mana penambahan HCl akan menyebabkan peningkatan kepolaran pada senyawa saponin, gugus non-polar hidrofobik akan menghadap kedalam dan gugus polar hidrofilik akan menghadap keluar, sehingga disebut struktur misel dan akan membentuk busa yang stabil (Putri & Lubis, 2020). Berdasarkan penelitian Handayani *et al*., (2020) hasilnya positif senyawa saponin dengan penambahan aquades, berbanding terbalik dengan penelitian yang sudah dilakukan yaitu negatif senyawa saponin,

Hasil skrining fitokimia senyawa flavonoid ekstrak daun jeruk nipis dapat diperkuat dengan uji KLT. Hasil pada **Gambar 6** diperoleh bercak berwarna kuning pada ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis yang dibandingkan dengan standar kuersetin karena merupakan senyawa penanda. Uji ini dilakukan untuk membuktikan pernyataan oleh Yanuarty, (2021) sebelumnya menyebutkan pada daun jeruk nipis terdapat kandungan senyawa kuersetin golongan flavonoid yang dapat meredam radikal bebas DPPH. Pada uji KLT menggunakan fase diam silika gel 60 F_{254} yang bersifat polar dan fase gerak yang sesuai untuk mencapai hasil optimal. Fase gerak yang digunakan pada elusi awal yaitu toluen : aseton : asam format (4:4:2) oleh Annegowda *et al*., (2012) yang mana hasil bercak sejajar tetapi tidak terjadi pemisahan yang baik, kemudian fase gerak yang kedua 1-butanol : asam asetat : aquades (3:1:1) oleh Saputri & Kusnadi, (2016) yang mana didapatkan hasil bercak tidak sejajar dan terelusi terlalu tinggi hingga pada tanda batas elusi. Fase gerak yang digunakan pada elusi akhir yaitu etil asetat : metanol : aquades (1:4:5) oleh Putri *et al*., (2023) didapatkan bercak sejajar berwarna kuning antara standar kuersetin dengan ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis yang dihitung dengan jarak tempuh elusi sampel dibagi jarak batas elusi yang mana dikatakan sebagai nilai *Retention factor* (Rf). Nilai Rf yang didapatkan pada standar kuersetin yaitu 0,93 dengan ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton pada bercak pertama yaitu 0,86 kemudian bercak kedua 0,95. Nilai Rf dan warna bercak standar kuersetin dan ekstrak tidak jauh berbeda, menandakan bahwa terdapat senyawa kuersetin pada ekstrak daun jeruk nipis yang dapat meredam radikal bebas DPPH. Batas optimal nilai Rf berkisar diantara 0,2-0,8 (Raharjo *et al*., 2023). Hasil nilai Rf perlakuan tidak jauh berbeda dengan penelitian Sopianti & Sulasmi, (2020)

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

yang memperoleh nilai Rf sebesar 0,9 pada standar kuersetin maupun ekstrak, dan hasil tersebut dikatakan mengandung senyawa flavonoid.

Uji aktivitas peredaman radikal bebas daun jeruk nipis dengan menggunakan DPPH memiliki mekanisme kerja yaitu untuk melihat perubahan warna dari ungu tua menjadi kuning yang disebabkan oleh senyawa antioksidan ekstrak yang memberikan suatu atom H untuk berikatan dengan elektron yang bersifat radikal pada DPPH (Anggriani & Anggarani, 2022). Mekanisme reaksinya dapat dilihat pada **Gambar 12**.



Gambar 13. Reaksi Atom H Terhadap DPPH (Butarbutar, 2019)

Kemampuan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH, dapat dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk melihat perubahan yang terjadi pada saat direaksikan dalam bentuk data absorbansi dengan panjang gelombang maksimal DPPH, yang mana radikal bebas DPPH stabil pada panjang gelombang maksimal berada sekitar 515-520 nm (Tenda *et al*., 2023). Pada penelitian ini didapatkan panjang gelombang maksimal 516 nm. Adapun *Operating time* dilakukan untuk melihat waktu keberapa sampel dapat bereaksi dengan DPPH secara maksimal. hasil penelitian ini menunjukkan waktu yang dibutuhkan yaitu 44 menit, yang mana hampir sama dengan temuan penelitian sebelunya oleh Hasanah *et al*., (2023) yang stabil pada menit ke-43.

Hasil pengujian peredaman radikal bebas DPPH diperoleh nilai IC_{50} ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis sebesar 56,811 ppm, diikuti metanol 67,143 ppm dan aseton 90,331 ppm dan dikategorikan antioksidan yang kuat, karena berada pada rentang 50-100 ppm (Anggriani & Anggarani, 2022). Berdasarkan hasil yang didapat, IC_{50} yang paling baik yaitu pada pembanding kuersetin sebesar 5,731 ppm dikategori sangat kuat karena <50 ppm (Anggriani & Anggarani, 2022). Pada penelitian sebelumnya oleh Handayani *et al*., (2020) juga diperoleh nilai IC_{50}

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

kuersetin sebesar 5,087 ppm. Hal tersebut dikarenakan kuersetin merupakan senyawa murni golongan flavonoid yang dapat meredam radikal bebas DPPH (Melanie *et al*., 2023). Kuersetin juga termasuk senyawa flavonoid yang sangat mudah larut dalam etanol 96%, karena sifat kepolarannya yang mirip dan dapat larut pada pelarut tersebut secara optimal (Yunita & Khodijah, 2020). Berdasarkan hasil dari tiga pelarut, nilai IC_{50} yang paling baik yaitu ekstrak dengan pelarut etanol 96% diikuti metanol dan aseton. Ketiga pelarut tersebut bersifat polar dan memiliki indeks kepolaran yang berbeda yaitu etanol 5,2 diikuti metanol dan aseton 5,1 (Taufani & Febriawan, 2021). Hasil nilai aktivitas peredaman radikal bebas DPPH diperkuat dengan nilai rendemen yang diperoleh pada ekstrak etanol 96% sebesar 19,22% diikuti ekstrak metanol 13,38% dan aseton 5,82%, dimana ekstrak etanol 96% daun jeruk nipis menghasilkan nilai rendemen paling besar. Oleh karena itu dapat dikorelasikan antara %rendemen dan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH, yaitu semakin besar %rendemen, semakin baik pula aktivitas antioksidannya. Hasil nilai IC_{50} ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis dikategorikan antioksidan yang kuat, karena berdasarkan skrining fitokimia ketiga ekstrak mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu fenolik dan flavonoid, kemudian berdasarkan uji KLT terdapat senyawa kuersetin, didasarkan pada bercak sejajar berwarna kuning dengan nilai Rf ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton sebesar 0,86 pada bercak pertama dan 0,95 bercak kedua yang tidak berbeda jauh dengan nilai Rf standar kuersetin 0,93.

Pada analisis statistik penelitian ini menggunakan uji *One Way* ANOVA untuk membandingkan nilai IC_{50} dari standar kuersetin, ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis. Tujuan uji tersebut dilakukan untuk menentukan apakah terdapat perbedaan signifikasi antar kelompok dengan dua atau lebih data. Sebelum dilakukan uji *One Way* ANOVA, perlu dilakukan dua Langkah yaitu uji normalitas menggunakan uji Shapiro wilk dan uji homogenitas menggunakan uji Levene dengan taraf kepercayaan 95%. Uji normalitas dan homogenitas bertujuan untuk mengetahui data IC_{50} terdistribusi normal dan homogen, yang mana jika hasil signifikansi >0,05 maka data terdistribusi normal dan homogen. Hasil IC_{50} kuersetin, ekstrak etanol 96%, metanol dan aseton daun

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

jeruk nipis menghasilkan data terdistribusi normal dan homogen, kemudian dilanjutkan dengan uji *One Way* ANOVA menunjukkan hasil yang berbeda signifikan antar kelompok yaitu <0,05. Berdasarkan hasil uji dapat disimpulkan bahwa perbedaan jenis pelarut ekstraksi yaitu etanol 96%, metanol dan aseton daun jeruk nipis memberikan pengaruh terhadap aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dengan menghasilkan perbedaan IC_{50} yang berbeda signifikan.

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA