

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Identifikasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Biologi Pembelajaran, Fakultas Sains dan Terapan, Universitas Ahmad Dahlan. Hasilnya menunjukkan bahwa daun jeruk nipis yang dipakai adalah spesies dari *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle (**Lampiran 2**).

2. Pengumpulan sampel

Jumlah daun jeruk nipis yang dipanen dapat dilihat pada tabel 3. Kemudian disortasi basah, dikeringkan, di serbuk haluskan dan diayak. Serbuk yang dihasilkan tersaji pada Tabel 3.

Tabel 3. Berat Daun Jeruk Nipis

Sampel	Berat
Daun jeruk nipis segar	2,220 Kg
Serbuk daun jeruk nipis	800 g

3. Pembuatan ekstrak etanol jeruk nipis

Ekstrak etanol daun jeruk nipis diperoleh dengan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Persentase rendemen yang diperoleh tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Berat Serbuk (g)	Berat Ekstrak Kental (g)	Rendemen (%)	(Depkes RI, 2017)
300	16,2	5,4	>10%

4. Uji kadar kelembapan

Pengukuran kadar kelembapan dilakukan untuk mengetahui jumlah cairan yang terkandung dalam ekstrak menggunakan pengukur kelembapan (*moisture analyzer*) pada suhu 105°C. Hasil pengujian ekstrak etanol daun jeruk nipis dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji Kadar Kelembapan Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Uji Kadar Kelembapan	% Kadar Kelembapan	(Andasari <i>et al.</i> , 2020)
Ekstrak etanol daun jeruk nipis	2,54	<10%

5. Uji Organoleptik

Ekstrak kental daun jeruk nipis diuji organoleptik secara obyektif dengan alat panca indera manusia. Hasil pengamatan uji organoleptik ekstrak etanol daun jeruk nipis di deskripsikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Organoleptik Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Sampel	Organoleptis	Hasil	(Andasari <i>et al.</i> , 2020)
Ekstrak etanol daun jeruk nipis	Warna	Hijau tua	Hijau tua
	Tekstur	Kental	Kental
	Aroma	Khas	Khas

6. Uji Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia bertujuan Untuk mendeteksi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel. Uji ini dilaksanakan pada ekstrak etanol dari daun jeruk nipis. Hasil analisis mengindikasikan bahwa ekstrak etanol daun jeruk nipis mengandung berbagai senyawa flavonoid, fenolik dan tanin seperti pada Tabel 7. Perubahan warna yang terjadi tersaji pada (Lampiran 6).

Tabel 7. Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Golongan senyawa	Hasil pengamatan	(Sari <i>et al.</i> , 2024)
Flavonoid	+ Warna kuning	Warna merah, kuning dan jingga.
Fenolik	+ Warna ungu kehitaman	Warna hijau kehitaman
Saponin	- Buih busa tidak stabil	Buih stabil dalam waktu 8-10 menit.
Tanin	+ Warna hijau kehitaman	Warna biru tua dan hijau kehitaman
Alkaloid	Mayer - Tidak terbentuk	Endapan putih atau kuning

	endapan putih	
	+	
Wagner	Endapan coklat	Endapan coklat
	+	
Dragendorff	Endapan jingga	Endapan jingga

Keterangan:

(+) = Terdeteksi Senyawa

(-) = Tidak terdeteksi golongan senyawa

1. Uji Peredaman Radikal Bebas DPPH

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimal diukur menggunakan spektrofotometer 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 1,306 pada panjang gelombang 517 nm (Lampiran 8), sehingga panjang gelombang tersebut digunakan dalam penelitian ini.

b. Penentuan *Operating Time*

Operating time bertujuan untuk menetapkan durasi ketika sampel uji akan bereaksi dengan senyawa DPPH secara optimal, Waktu yang menunjukkan absorbansi paling stabil dianggap sebagai *operating time*. Hasil *operating time* dicatat pada menit ke-33 sampai 39 yang dapat dilihat pada Lampiran 9.

c. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

Nilai peredaman radikal bebas standar kuersetin, dan hasil ekstrak etanol dari daun jeruk nipis ditampilkan pada Tabel 8 dan Lampiran 7.

Tabel 8. Hasil Rata-Rata Nilai IC₅₀ Standar Kuersetin dan Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Sampel	Rata-rata Nilai IC ₅₀ (ppm) ± SD	Keterangan
Kuersetin	2,212 ± 0,066	Sangat kuat
Ekstrak etanol daun jeruk nipis	69,402 ± 0,153	Kuat

Pengujian kemampuan ekstrak etanol daun dan standar kuersetin dalam menetralkan radikal bebas DPPH menunjukkan hasil bahwa jeruk nipis memiliki nilai IC₅₀ yang berbeda seperti ditunjukkan pada Tabel 8.

2. Analisis data

Nilai IC₅₀ standar kuersetin dan sampel ekstrak etanol daun jeruk nipis selanjutnya dianalisis dengan SPSS (Tabel 9).

Tabel 9. Hasil Uji Statistik Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH Kuersetin dan Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Sampel	Normalitas	<i>P</i> -value Homogenitas	Keterangan
Kuersetin	0,682 ^a		
Ekstrak etanol daun jeruk nipis	0,585 ^a	0,221 ^b	0,000 ^c

Keterangan

a = data terdistribusi normal (*p* value > 0,05)

b = data terdistribusi homogen (*p* value > 0,05)

c = data berbeda signifikan (*p* value < 0,05)

B. Pembahasan

Studi ini menggunakan sampel daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle) yang didapat dari kebun jeruk nipis daerah Sumber Batikan, RT.04, Tlirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Determinasi tanaman dilakukan terlebih dahulu agar tidak terjadi kesalahan dalam penggunaan tanaman (Fikayuniar *et al.*, 2023). Berdasarkan hasil determinasi pada Lampiran 2 telah terbukti jika tanaman yang digunakan yaitu benar tanaman *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle. Penulisan nama ilmiah “Christm.” merujuk pada singkatan dari Christmann, ahli botani yang pertama kali mendeskripsikan spesies ini, sedangkan “Swingle” adalah ahli botani yang

kemudian mengklasifikasikan ulang ke dalam genus Citrus. Daun yang diambil pada jam 08.00- 10.00 WIB dengan tujuan mendapatkan senyawa aktif yang lebih tinggi (Ogunyemi *et al.*, 2019), Sebab apabila pemetikan dilakukan pada siang hari, tanaman telah menjalani proses fotosintesis sehingga menghasilkan senyawa aktif yang akan ditarik tidak optimal (Yuliani & Dienina, 2015).

Daun yang sudah dipanen kemudian di sortasi basah dengan tujuan untuk membersihkan daun dari kotoran yang menempel, selanjutnya daun dicuci dengan air mengucur untuk membersihkan kotoran yang masih tersisa. Daun yang telah kering kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 50°C untuk menjaga senyawa aktif simplisia tetap aman, karena Komponen flavonoid berpotensi rusak jika dipanaskan pada suhu lebih dari 60°C (Sari *et al.*, 2024). Pengeringan dilakukan selama 3 hari dengan parameter apabila diremas sampel mudah hancur. Kemudian digrinder untuk mengecilkan dimensi partikel, di mana semakin kecil dimensinya, maka area permukaannya kontak lebih besar dengan pelarut, sehingga dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi (Setyantoro *et al.*, 2019). Serbuk simplisia lalu disaring dengan saringan 40 mesh agar ukuran partikelnya menjadi seragam sehingga dapat mengoptimalkan proses ekstraksi (Prasetyo *et al.*, 2022).

Simplisia yang sudah diayak kemudian diekstraksi menggunakan *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Metode ini memiliki keunggulan utama meliputi efisiensi yang lebih tinggi, durasi proses yang lebih singkat, serta laju perpindahan massa yang lebih singkat dibandingkan dengan metode ekstraksi konvensional (Setyantoro *et al.*, 2019). Pada penelitian Sari *et al.*, (2024) metode non konvensional yaitu UAE menghasilkan kadar flavonoid total yang lebih besar daripada metode konvensional yaitu maserasi. Proses ekstraksi ini menggunakan etanol 96% karena sifatnya polar, tidak bersifat toksik memiliki penyerapan yang baik, dan kemampuan ekstraksinya tinggi terhadap senyawa seperti flavonoid (Suhendar *et al.*, 2020). Pada penelitian Joangga, (2024) disebutkan bahwa pelarut etanol 96% menghasilkan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH terbaik dibandingkan dengan metanol dan aseton. Suhu yang digunakan mengikuti penelitian Sari *et al.*, (2024) yaitu 50°C, dimana pemilihan suhu tersebut dilakukan untuk menjaga kestabilan kandungan simplisia, khususnya senyawa flavonoid,

yang rentan mengalami degradasi pada suhu lebih dari 60°C (Sari *et al.*, 2024). Ekstrak kental yang sudah diperoleh dihitung nilai rendemennya. Nilai rendemen ekstrak yang diperoleh dalam penelitian ini tidak memenuhi syarat yang diharapkan karena <10%. Salah satu faktor yang memengaruhi rendahnya rendemen adalah kondisi suhu ekstraksi yang digunakan, yaitu 25°C. Pada penelitian yang dilakukan oleh Joangga, (2024), dengan jenis sampel dan pelarut yang sama, namun menggunakan suhu ekstraksi 40°C, diperoleh nilai rendemen yang lebih tinggi daripada penelitian ini. Suhu yang lebih tinggi berperan dalam mempercepat difusi pelarut ke dalam jaringan tanaman dan membantu pemecahan dinding sel, sehingga senyawa metabolit sekunder lebih mudah terlarut dalam pelarut (Ulvia *et al.*, 2025). Ini menandakan bahwa metabolit yang tertarik sedikit karena perhitungan nilai rendemen dilakukan untuk melihat seberapa banyak senyawa metabolit yang tertarik. Semakin besar nilai rendemannya artinya semakin banyak senyawa metabolit sekunder yang diperoleh (Sari *et al.*, 2024).

Selanjutnya, dilakukan pengujian kadar kelembapan untuk menentukan jumlah air yang terkandung dalam ekstrak. Semakin tinggi nilai kelembapan, semakin besar kadar air dalam ekstrak. Kadar air yang tinggi dapat memicu pertumbuhan mikroorganisme, sehingga berpotensi menurunkan kualitas ekstrak, kandungan senyawa aktif dan berpengaruh terhadap daya tahan penyimpanan (Wandira *et al.*, 2023). Diperoleh hasil sebesar 2,54% MC yang berarti memenuhi syarat karena tidak $\geq 10\%$.

Penapisan fitokimia dilakukan pada ekstrak etanol daun jeruk nipis untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekundernya meliputi uji flavonoid, fenolik, saponin, tanin, alkaloid. Hasil pengujian tersebut tertera pada Tabel 7 menunjukkan bahwa ekstrak positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik dan tanin yang sesuai dengan penelitian Andasari *et al.*, (2020). Pada uji flavonoid, sampel menghasilkan warna kuning setelah ditambahkan magnesium dan HCl (Lampiran 6). Reaksi ini disebabkan oleh keberadaan magnesium dan HCl mampu mereduksi inti benzopiron dalam struktur flavonoid (Karlina & Nasution, 2022). Proses reduksi tersebut menghasilkan perubahan warna menjadi kuning,

yang menandakan adanya senyawa flavonoid golongan flavonol seperti epigenin, rutin, dan kuersetin (Indriyani *et al.*, 2023).

Uji senyawa fenolik-tanin dilakukan dengan menambahkan larutan FeCl_3 1%. Reagen ini berfungsi untuk mendeteksi adanya gugus fenol dalam sampel (Widiawati & Qodri, 2023). Reaksi antara FeCl_3 dengan gugus fenol menghasilkan kompleks berwarna hijau kehitaman (Qomaliyah *et al.*, 2023). Perubahan warna tersebut menunjukkan hasil positif, yang dapat dilihat pada Lampiran 6, dan menandakan keberadaan tanin golongan terhidrolisis yang umumnya tersusun atas asam galat atau turunannya (Suciati, 2017).

Hasil uji saponin dinyatakan negatif karena tidak terbentuk buih stabil. Perbedaan dengan penelitian Sari *et al.*, (2024) diduga berasal dari perbedaan prosedur (ketiadaan penambahan HCl untuk stabilisasi buih), pengaruh pelarut (residu etanol yang menurunkan tegangan permukaan), serta konsentrasi saponin yang rendah akibat kondisi ekstraksi yang kurang optimal.

Identifikasi senyawa terpenoid dilakukan dengan penambahan pereaksi Bouchardat. Hasil pengujian memperlihatkan perubahan warna menjadi jingga kecokelatan (Lampiran 6), yang menunjukkan respon positif terhadap keberadaan terpenoid dalam ekstrak. Perubahan warna tersebut disebabkan oleh terjadinya proses oksidasi pada senyawa terpenoid sehingga terbentuk ikatan rangkap terkonjugasi (Sari *et al.*, 2024). Dan menandakan terpenoid golongan d-limonene, β -pinene, γ -terpinene, dan citral (Spadaro *et al.*, 2012).

Deteksi alkaloid dilakukan menggunakan tiga reagen, yakni Mayer, Dragendorff, dan Wagner. Reagen Wagner mengandung kalium iodida dan iodin. Senyawa alkaloid akan membentuk ikatan koordinasi kovalen antara ion K^+ dari kalium iodida dengan atom N pada alkaloid, menghasilkan endapan kompleks kalium-alkaloid yang berwarna coklat (Erwan & Parbuntari, 2023). Hasil uji ini dinyatakan positif dapat dilihat pada Lampiran 6 dengan munculnya endapan coklat. Hal ini sesuai dengan laporan penelitian sebelumnya bahwa daun jeruk nipis mengandung alkaloid feniletilamin seperti sinefrin, tiramin, dan oktopamin, yang memiliki atom nitrogen dalam strukturnya sehingga dapat berinteraksi dengan pereaksi Wagner (Loizzo *et al.*, 2012).

Reaksi antara alkaloid dan pereaksi Dragendorff melibatkan substitusi pada ligan, di mana atom nitrogen memiliki pasangan elektron bebas dan berinteraksi dengan kalium tetraiodobismut sehingga terbentuk endapan berwarna jingga (Erwan & Parbuntari, 2023). Hasil pengujian dengan reagen Dragendorff dan Wagner untuk identifikasi alkaloid menunjukkan bahwa ekstrak mengandung alkaloid secara positif. Keberadaan alkaloid seperti oktopamin dan sinefrin yang pernah teridentifikasi pada spesies Citrus mendukung hasil ini, karena senyawa-senyawa tersebut memiliki gugus amina yang reaktif terhadap pereaksi Dragendorff (Percy *et al.*, 2010).

Pada uji Mayer, keberadaan alkaloid dikenali melalui terbentuknya endapan berwarna putih, yang merupakan kompleks kalium-alkaloid. Alkaloid mengandung atom nitrogen yang memiliki elektron bebas yang memungkinkan pembentukan ikatan kovalen koordinat dengan ion logam. Saat diuji dengan pereaksi Mayer, atom nitrogen dalam alkaloid bereaksi dengan ion K^+ dari kalium tetraiodomercurat (II), menghasilkan kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Uji ini dinyatakan negatif karena tidak terbentuk endapan putih hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak etanol daun jeruk nipis tidak mengandung alkaloid dengan basa kuat dalam jumlah memadai (Ali *et al.*, 2018). Pada penelitian ini, hasil uji alkaloid dinyatakan positif karena dua dari tiga reagen yang digunakan menunjukkan terbentuknya endapan disertai perubahan warna.

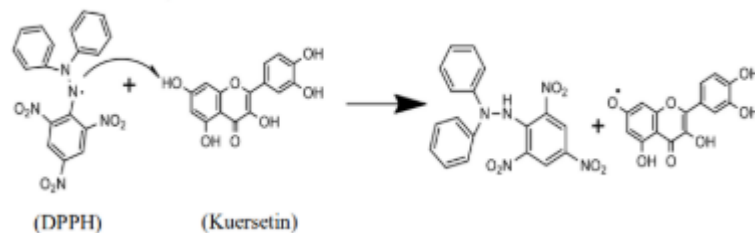
Uji kuantitatif aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dengan standar kuersetin, ekstrak etanol daun jeruk nipis menggunakan DPPH 0,1 mM dengan metode spektrofotometer UV-Vis. Pemilihan DPPH karena penggunaannya yang sederhana, cepat, mudah dan memerlukan sedikit sampel (Wulansari, 2018). Prinsip kerja Uji DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dipakai untuk mengukur aktivitas antioksidan berdasarkan kemampuannya mereduksi radikal bebas DPPH berwarna ungu menjadi bentuk tereduksi berwarna kuning, yang diukur pada panjang gelombang maksimum.

Panjang gelombang maksimum ditentukan untuk mengetahui λ yang memberikan serapan tertinggi oleh larutan DPPH. Penentuan ini dilakukan dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang 400–

800 nm. Hasil pengukuran memperlihatkan λ maksimum pada 517 nm, sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Bahun *et al.*, (2025) yang juga menggunakan λ 517 nm. Panjang gelombang maksimum ini kemudian digunakan sebagai dasar dalam penentuan *operating time* serta pengukuran absorbansi sampel pada uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH.

Operating time dilakukan guna mengetahui waktu stabil yang diperlukan senyawa uji untuk bereaksi dengan senyawa DPPH (Maulidya *et al.*, 2023). Penentuan ini didasarkan ketika absorbansi antara sampel dan DPPH menunjukkan kestabilan (Patria & Soegihardjo, 2014). *Operating time* diukur setiap satu menit sekali selama satu jam dengan panjang gelombang maksimum 517 nm dengan hasil stabil dari menit ke-33 sampai ke-39. didapatkan waktu pertama kali stabil Adalah menit ke-33 maka hasil *operating time* adalah menit ke-33, maka mendekati seperti penelitian yang sudah dilakukan oleh Fatmawati, (2025) yaitu 30 menit. Hasil ini kemudian digunakan pada pengukuran absorbansi sampel.

Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH pada penelitian ini terlebih dahulu dibuat larutan pembanding yaitu kuersetin. Senyawa ini dipilih karena termasuk dalam flavonoid golongan flavonol yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan tinggi (Sari & Triyasmono, 2017). Selain itu, senyawa kuersetin juga dilaporkan terkandung dalam ekstrak daun jeruk nipis, sehingga dapat digunakan sebagai pembanding dalam uji aktivitas antioksidan (Sari *et al.*, 2024). DPPH memiliki mekanisme bahwa senyawa antioksidan akan melepaskan atom hidrogen kepada radikal bebas DPPH, mengubahnya menjadi bentuk tereduksi yang tidak bersifat radikal. Pada kondisi ini, DPPH mengalami kehilangan warna ungunya. Perubahan warna tersebut juga disertai oleh berkurangnya nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang diukur dengan spektrofotometer (Puspitasari & Ningsih, 2016).



Gambar 6. Mekanisme Reaksi DPPH dan Kuersetin

Dari hasil pengukuran reaksi antara DPPH dengan standar dan sampel akan menghasilkan nilai absorbansi. Nilai tersebut digunakan untuk menghitung persen inhibisi, yang menggambarkan kemampuan antioksidan menghambat radikal bebas. Kemudian diregresi linier dengan seri konsentrasi sebagai nilai x dan nilai y adalah %inhibisi hingga didapatkan parameter kurva yang baik dapat dilihat dari nilai r. Jika nilai r mendekati 1/-1 yang menunjukkan hubungan yang berkorelasi lurus yakni semakin tinggi konsentrasi maka semakin kuat dalam menghambat radikal bebas. Setelah didapatkan nilai a b r, dihitung menggunakan persamaan regresi linier ($y=bx+a$) dengan nilai y adalah 50 dan didapat nilai IC_{50} .

Hasil pengujian menunjukkan nilai IC_{50} kuersetin sebesar 2,212 ppm, sehingga dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat (< 50 ppm). Hasil ini sejalan dengan penelitian Maulidya *et al.*, (2023) mendapatkan nilai IC_{50} yang termasuk kategori sangat kuat. Pengujian ekstrak etanol dari daun jeruk nipis yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 69,402 ppm, yang termasuk kategori antioksidan kuat (50–100 ppm). Berdasarkan data tersebut, kuersetin menunjukkan kemampuan antioksidan yang lebih kuat daripada ekstrak etanol dari daun jeruk nipis. Perbedaan ini terjadi karena ekstrak etanol daun jeruk nipis masih mengandung campuran berbagai senyawa, sedangkan kuersetin merupakan senyawa murni tunggal yang telah terbukti menunjukkan kemampuan antioksidan yang sangat tinggi (Djamaluddin *et al.*, 2024).

Data nilai IC_{50} dihitung nilai standar deviasi (SD) dan koefisien variasi (CV) digunakan untuk menilai presisi data. SD yang kecil menunjukkan hasil uji homogen, sedangkan CV yang rendah (umumnya <5% untuk spektrofotometri) menandakan variasi antar data rendah dan metode analisis presisi (Wang *et al.*, 2024). Pada penelitian ini, SD dan CV yang diperoleh masih berada dalam batas

yang dipersyaratkan, sehingga hasil pengukuran dapat dikatakan presisi dan memenuhi kriteria validitas metode analisis.

Data perolehan nilai IC_{50} ekstrak etanol daun jeruk nipis dan kuersetin dianalisis dengan aplikasi SPSS versi 25. Langkah yang pertama ialah uji normalitas memakai *shapiro-wilk* karena data yang digunakan <50 data. Hasil uji normalitas dengan pembandingan kuersetin yaitu 0,585 maka data tersebut dapat dinyatakan normal karena $p > 0,05$. Pengujian berikutnya yaitu uji homogenitas dengan *levene Statistic* yang bertujuan untuk mengetahui apakah dua sampel atau lebih diperoleh dari populasi yang mempunyai varians yang sama. Hasil uji *Levene Test* yang diperoleh yaitu 0,212 sehingga dapat dinyatakan homogen karena nilai $p > 0,05$. Data yang memiliki distribusi normal dan keseragaman varians kemudian diuji *T-test Independent* untuk menunjukkan apakah sampel yang tidak berhubungan mempunyai perbedaan signifikan. Hasil yang didapat yaitu ada perbedaan yang signifikan dalam peredaman radikal bebas DPPH antara kuersetin dan ekstrak etanol daun jeruk nipis karena $p < 0,05$.

Pada penelitian ini, ekstrak etanol daun jeruk nipis memiliki aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Ini sesuai dengan penelitian yang dilaksanakan oleh Joangga (2024), yanuary (2021) & Ulfa (2024) yang juga menyatakan bahwa daun jeruk nipis memiliki zat antioksidan yang kuat dan berada dalam kategori yang sama, yaitu antioksidan kuat.