

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi dan Ekstraksi Sampel

Sampel limbah buah jeruk kunci (*C. x microcarpa* Bunge) dilakukan pencucian untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Selanjutnya dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan. Dikeringkan dibawah sinar matahari untuk menghindari terjadinya pertumbuhan dan pembusukan jamur yang dapat merubah kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam sampel (Indarto dkk, 2019). Setelah kering sampel diblender menjadi serbuk bertujuan untuk memperluas permukaan kontak dengan pelarut sehingga mempermudah dalam proses ekstraksi (Hafsari dkk, 2015). Proses ekstraksi limbah buah jeruk kunci menggunakan metode maserasi. Prinsip ekstraksi dengan mengekstrak senyawa aktif berdasarkan tingkat kepolaran pelarutnya (*like dissolves like*) (Khopkar, 2008).

Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik (Darwis, 2000). Penggunaan metode maserasi dalam proses ekstraksi dikarenakan metode ini murah, mudah serta alat yang digunakan sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk halus yang telah diayak dengan pengayak berukuran 80 mesh selanjutnya direndam dengan pelarut organik. Semakin lama waktu perendaman akan membuat proses ekstraksi senyawa berlangsung sempurna (Baraja, 2008). Pelarut yang digunakan dalam maserasi *C. x microcarpa* Bunge yaitu etanol 96%. penggunaan pelarut etanol dikarenakan tidak beracun, mudah menguap, dan bersifat polar (Sulistyaningsih, 2009). Maserasi dilakukan 3 x 24 jam untuk memaksimalkan pengambilan senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam sampel. Setiap 1 x 24 jam dilakukan pengadukan. Pengadukan berfungsi untuk menghomogenkan larutan serta mempercepat kontak antara pelarut dan sampel. Selanjutnya dilakukan proses penyaringan dan pemekatan dengan *rotary evaporator*, tujuan pemekatan untuk memisahkan senyawa aktif limbah buah jeruk kunci dengan pelarut. Setelah dihasilkan ekstrak etanol sampel dilakukan beberapa pengujian meliputi pengujian fitokimia, total fenolik, total flavonoid, antioksidan, dan antibakteri.

4.2 Uji Fitokimia

Fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa aktif pada sampel. Beberapa pereaksi digunakan untuk mengidentifikasi senyawa fitokimia seperti alkaloid, saponin, tanin/fenol hidrokuinon, flavonoid, terpenoid, dan steroid. Hasil pengujian fitokimia disajikan pada tabel 4.1:

Tabel 4.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak limbah buah Jeruk Kunci

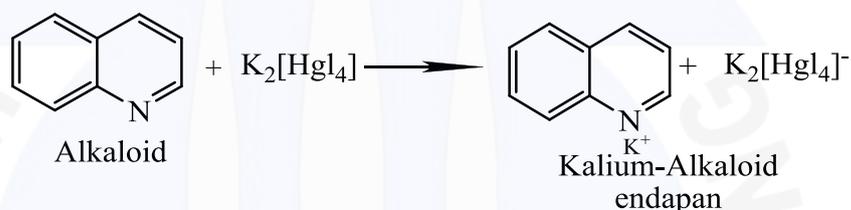
No	Pengujian Fitokimia	Indikator	Hasil	Keterangan
1	Alkaloid			
	a. Pereaksi Mayer	endapan berwarna putih	-	Kuning pucat Tidak ada endapan
	b. Pereaksi Wagner	endapan berwarna coklat	-	Coklat tidak ada endapan
	c. Pereaksi Dragendrof	endapan berwarna merah jingga	-	Kuning pekat tidak ada endapan
2	Saponin	mengandung busa	-	Kuning
3	Fenol hidrokuinon/tanin	Biru kehitaman	+	Biru kehitaman
4	Flavonoid			
	(HCl+Mg)	Jingga	+	Jingga
5	Terpenoid	Merah kecoklatan	+	Merah kecoklatan
6	Steroid	Hijau	+	Hijau

Keterangan :Positif (+) : mengandung senyawa metabolit sekunder
Negatif (-) : tidak mengandung senyawa metabolit sekunder

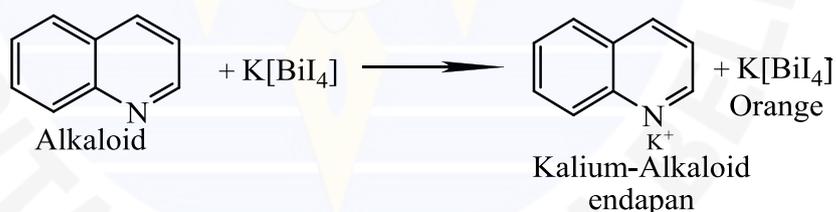
Berdasarkan Tabel 4.1 dari hasil pengujian fitokimia ekstrak etanol sampel limbah buah jeruk kunci mengandung metabolit sekunder terpenoid, Fenol Hidrokuinon/tanin, flavonoid, dan steroid.

a. Identifikasi alkaloid

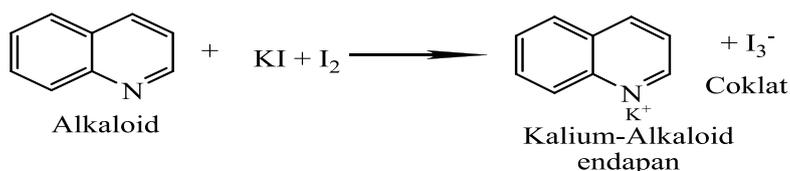
Pada pengujian alkaloid baik uji Wagner, Mayer maupun Dragendroff jika ekstrak mengandung alkaloid ditandai dengan adanya endapan. Pereaksi Wagner ditandai dengan endapan putih, Pereaksi Mayer adanya endapan coklat sedangkan pereaksi Dragendroff adanya endapan jingga. Akan tetapi pada pengujian alkaloid terhadap ekstrak etanol sampel tidak terdapat endapan karena tidak bereaksi dengan pereaksi sehingga dinyatakan bahwa ekstrak tersebut tidak mengandung alkaloid. Sedangkan senyawa alkaloid memiliki ciri khas mempunyai atom nitrogen. Atom nitrogen tersebut yang membuat alkaloid bersifat basa. Reaksi yang terjadi pada alkaloid dengan pereaksi Mayer, Dragendroff, Wagner dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Gambar 4.1 Mekanisme reaksi alkaloid dengan pereaksi Mayer (Marlina dkk, 2005)



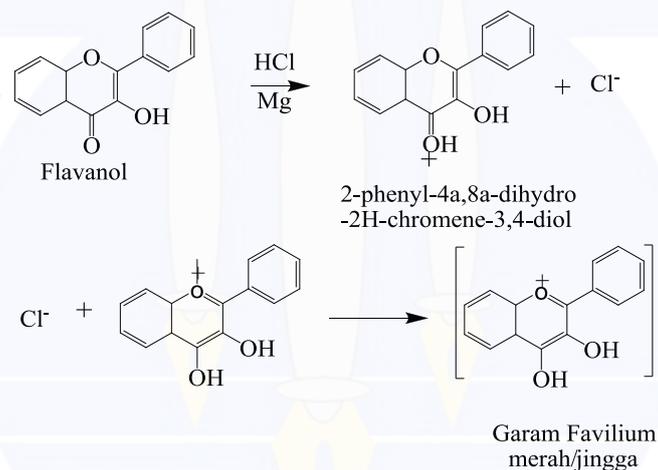
Gambar 4.2 Mekanisme reaksi alkaloid dengan pereaksi Dragendrof (Marlina dkk, 2005)



Gambar 4.3 Mekanisme reaksi alkaloid dengan pereaksi Wagner (Marlina dkk, 2005).

b. Identifikasi Flavonoid

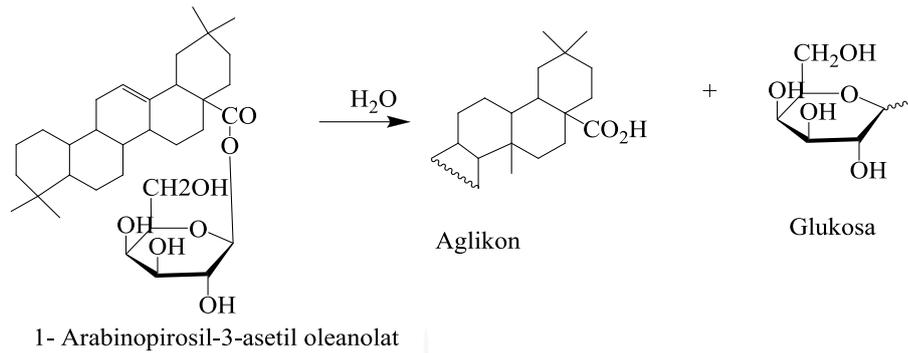
Hasil pengujian fitokimia ekstrak etanol sampel menandakan adanya flavonoid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi jingga atau merah. Umumnya flavonoid larut dalam etanol karena bersifat polar. Etanol digunakan untuk membebaskan flavonoid dari bentuk garamnya. Penambahan klorida pekat untuk memprotonasi flavonoid sehingga terbentuk garam flavonoid. Setelah penambahan bubuk magnesium, terbentuknya warna jingga atau merah adanya kandungan flavonoid akibat terjadinya reduksi oleh HCl dan magnesium (Harbone, 1987). Pada ekstrak etanol sampel terjadi perubahan warna jingga. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol sampel mengandung senyawa flavonoid. Reaksi flavonoid dapat dilihat pada gambar 4.4:



Gambar 4.4 Mekanisme persamaan reaksi flavonoid (Setiabudi dkk, 2017).

c. Identifikasi Saponin

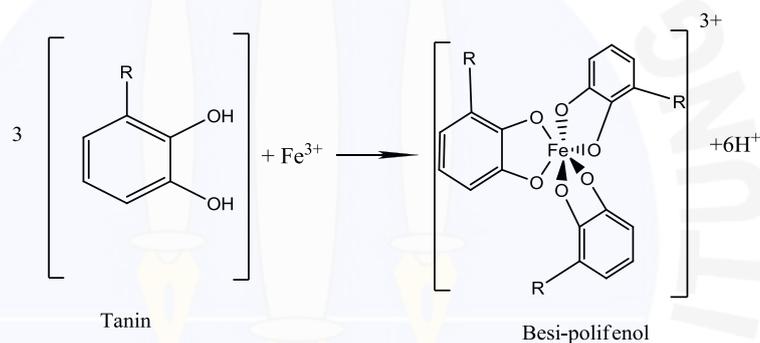
Saponin merupakan zat aktif yang mengandung busa, hasil uji fitokimia menunjukkan hasil negatif karena tidak ada busa stabil yang terbentuk. Saponin memiliki gugus steroid sebagai gugus nonpolar dan gugus glikosil sebagai gugus polar. Kedua gugus tersebut akan menghasilkan misel saat dikocok dengan air. Pada struktur misel gugus polar menghadap keluar sedangkan gugus nonpolar mengarah kedalam, fenomena tersebut yang menghasilkan busa (Sangi dkk, 2008). Reaksi saponin pada gambar 4.5:



Gambar 4.5 Reaksi hidrolisis saponin dalam air (Illing dkk, 2017)

d. Identifikasi Fenol hidrokuinon/tanin

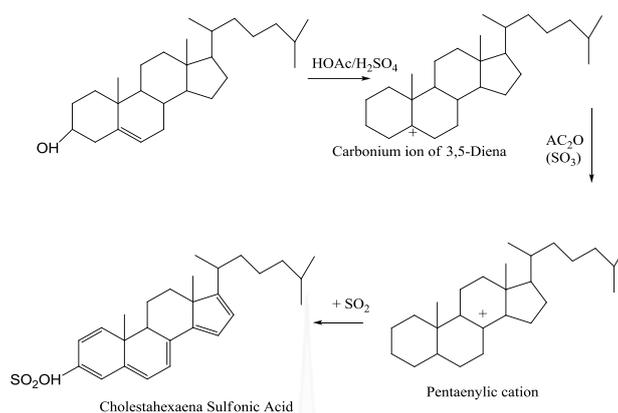
Pengujian kandungan tanin terhadap ekstrak etanol sampel menunjukkan hasil positif dengan ditandai perubahan warna biru kehitaman karena FeCl_3 bereaksi dengan gugus $-\text{OH}$ aromatis (Hayati dkk, 2015). Reaksi tanin dapat dilihat pada gambar 4.6:



Gambar 4.6 Reaksi antara tanin dengan FeCl_3 (Perron dan Brugmaghim, 2009).

e. Identifikasi Terpenoid dan Steroid

Pereaksi Liebermann- Burchard digunakan untuk mengidentifikasi steroid dan terpenoid. Reagen yang digunakan H_2SO_4 dan CH_3COOH (Sangi dkk, 2008). Uji fitokimia ekstrak etanol sampel menunjukkan hasil positif terbentuknya warna merah kecoklatan untuk uji terpenoid dan hijau-biru untuk uji steroid. Asam sulfat dengan pelarut asam asetat glasial berfungsi untuk memprotonasi gugus hidroksi pada steroid atau terpenoid yang akan membentuk warna biru kehijauan (Marlinda, 2012). mekanisme Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada gambar 4.7:



Gambar 4.7 Mekanisme reaksi uji steroid dan terpenoid (Habibi, 2018)

4.2 Penentuan Total Fenolik

Pengujian total fenolik pada ekstrak etanol sampel dilakukan dengan menggunakan metode Folin–Ciocalteu secara spektrofotometri. Prinsip metode ini dengan mengoksidasi gugus fenolik hidroksil. Gugus fenolik hidroksil bereaksi dengan Folin-Ciocalteu membentuk kompleks fostungstat-fosfomolibdat berwarna biru sehingga dapat dideteksi menggunakan spektrofotometri (Hapsari dkk, 2018). Senyawa fenolik dapat bereaksi dengan Folin-Ciocalteu hanya dalam suasana basa agar terbentuknya disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat. Terbentuknya suasana basa karena adanya penambahan Na_2CO_3 (Alfian dan Susanti, 2012). Asam galat yang digunakan sebagai pembanding yaitu senyawa fenol, penggunaan asam galat sebagai standar dikarenakan turunan dari hidrobenzoat yang merupakan asam fenol sederhana berdasarkan ketersediaan substansi murni dan stabil (Rahmawati, 2009). Pembuatan kurva asam galat dengan variasi 20, 60, 100, 150 dan 200 ppm diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm, sehingga diperoleh hasil analisa total fenolik pada tabel 4.2 :

Tabel 4.2 Hasil Pengujian Total Fenolik

Sampel Uji	Absorbansi Sampel	Kandungan Fenolik Total (mg EAG/g)
Ekstrak Limbah Buah Jeruk Kunci	1,444	146,7

Berdasarkan Tabel 4.2 Hasil total fenolik yang terkandung dalam limbah buah jeruk kunci (*C. x microcarpa* Bunge) sebesar 146,7 mg EAG/g ekstrak. Nilai ini jauh lebih besar dibandingkan kandungan fenolik pada ekstrak (*C. reticulata* L.) sebesar 28 mg EAG/g ekstrak (Safdar dkk, 2007). Kadar fenol pada ekstrak etanol daun jeruk siam 32,067 mg EAG/g ekstrak, ekstrak etanol daun jeruk limau 32,317 mg EAG/g ekstrak dan ekstrak etanol daun jeruk keprok Garut 37,35 mg EAG/g ekstrak (Perdana dkk, 2018).

4.3 Penentuan Total Flavonoid

Total flavonoid dinyatakan dalam *Quercetin Equivalent* (QE) dengan menggunakan prinsip $AlCl_3$ (Ukieyanna, 2012). Pengukuran total flavonoid diukur menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis berdasarkan pembentukan kompleks aluminium dengan panjang gelombang maksimum diperoleh 420 nm. Pada pengukuran flavonoid menggunakan standar kuersetin sebagai pembanding dikarenakan salah satu golongan flavonoid (flavonol). Pengukuran standar absorbansi kuersetin dengan variasi konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Penggunaan variasi konsentrasi dikarenakan metode yang digunakan dalam menentukan kadar flavonoid menggunakan persamaan kurva baku, untuk membuat kurva baku terlebih dahulu dibuat variasi konsentrasi untuk mendapatkan persamaan garis lurus yang dapat digunakan untuk menghitung total flavonoid. Sehingga dari hasil analisa tersebut diperoleh hasil total flavonoid yang dapat dilihat pada tabel 4.3:

Tabel 4.3 Hasil Pengujian Total Flavonoid

Sampel Uji	Absorbansi Sampel	Kandungan Flavonoid Total (mg QE/g)
Ekstrak Limbah Buah Jeruk Kunci	0,517	77,2

Berdasarkan Tabel 4.3 Kandungan total flavonoid ekstrak etanol sampel sebesar 77,2 mg QE/g ekstrak yang diperoleh. Nilai ini jauh lebih besar jika dibandingkan dengan genus *Citrus* ekstrak metanol kulit jeruk sambal (*C. microcarpa* Bunge) dengan kadar flavonoid total sebesar 0,3324 mg QE/g (Widyasari dkk, 2020), ekstrak etanol daun jeruk keprok 5,817 mg QE/g, ekstrak

etanol daun siam 6,960 mg QE/g dan ekstrak etanol daun jeruk limau 4,117 mg QE/g (Perdana dkk, 2018).

4.4 Penentuan Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol sampel menggunakan metode DPPH. DPPH merupakan salah satu metode konvensional dan telah lama digunakan untuk menentukan aktivitas senyawa antioksidan (Utomo dkk, 2008). Selain itu, metode ini mudah, cepat dan sensitif untuk menguji aktivitas antioksidan dari ekstrak tanaman menggunakan DPPH secara spektrofotometer (Pourmorad dkk, 2006). Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol sampel dengan metode DPPH dilakukan pada panjang gelombang maksimum yang didapat yaitu 517 nm. Hasil pengujian antioksidan ditunjukkan pada tabel 4.4:

Tabel 4.4 Hasil Pengujian Antioksidan

Sampel Uji	IC ₅₀ (µg/mL)	Keterangan
Ekstrak Limbah Buah Jeruk Kunci	171,92	Sedang

Berdasarkan Tabel 4.4 Diperoleh nilai IC₅₀ ekstrak limbah buah jeruk kunci sebesar 171,92 µg/mL. Nilai IC₅₀ dari ekstrak limbah buah jeruk kunci dikategorikan sebagai aktivitas antioksidan sedang dengan nilai IC₅₀ > 50 µg/mL. Akan tetapi jika dibandingkan dengan spesies lain dalam genus *Citrus* di peroleh aktivitas antioksidan ekstrak limbah buah jeruk kunci jauh lebih kuat dibandingkan dengan fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle) dengan IC₅₀ sebesar 382,65 µg/mL yang dikategorikan sebagai antioksidan rendah (Triana, 2013), ekstrak etanol daun jeruk limau dan ekstrak etanol daun jeruk keprok Garut dengan nilai IC₅₀ 207,963 mg/L dan 263,838 mg/L (Perdana dkk, 2018).

Menurut Harbone (1987) rendahnya aktivitas antioksidan kemungkinan disebabkan oleh senyawa fenolik yang masih berikatan dengan gugus glikosida. Dikarenakan golongan senyawa fenolik sangat berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan. Serta senyawa flavonoid yang masih dalam bentuk ekstrak kemungkinan masih berikatan dengan gugus glikosida yang berikatan dengan

flavonoid sehingga dapat menurunkan aktivitas antioksidan. Menurut Fukumoto dan Mazza (2000) peningkatan aktivitas antioksidan dengan menambahkan gugus hidroksi dan akan mengalami penurunan dengan bertambahnya gugus slikosida.

4.5 Penentuan Aktivitas Antibakteri

Pengujian antibakteri bertujuan untuk mengetahui kekuatan daya hambat ekstrak etanol sampel terhadap pertumbuhan bakteri *P.acnes* menggunakan metode difusi cakram. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol sampel terhadap pertumbuhan bakteri *P.acnes*. Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri adalah nutrien agar. Nutrien agar merupakan media yang umum untuk menumbuhkan bakteri. Dalam pengujian aktivitas antibakteri menggunakan akuades sebagai kontrol negatif dan antibiotik klindamisin sebagai kontrol positif. Kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui pengaruh pelarut dalam membunuh dan menghambat bakteri sedangkan antibiotik klindamisin merupakan antibiotik yang efektif terhadap bakteri anaerob (Elliott dkk, 2013). Untuk membentuk aktivitas antibakteri ekstrak dengan melakukan pengukuran zona bening (jernih) yang terbentuk disekitar kertas cakram. Zona bening yang terbentuk disebut zona hambat. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong. Berdasarkan hasil penelitian uji daya hambat yang dilakukan pada ekstrak etanol sampel didapatkan hasil pada tabel 4.5 :

Tabel 4.5 Hasil pengamatan zona hambat terhadap *P.acnes*

Konsentrasi Ekstrak	Diameter Zona Hambat		Rata-rata (mm)	Keterangan
	1	2		
20%	8,88	11,75	20,63	Sangat kuat
40%	12,13	11,31	23,44	Sangat kuat
60%	15,11	15,37	30,48	Sangat kuat
80%	15,35	16,37	31,72	Sangat kuat
100%	16,51	16,94	33,45	Sangat Kuat
Klindamisin (+)	30,35	30,35	30,35	Sangat kuat
Akuades (-)	0	0	0	0

Keterangan + Kontrol positif
- Kontrol negatif

Berdasarkan Tabel 4.5 dapat diketahui rerata zona hambat yang terbentuk dari variasi konsentrasi ekstrak etanol sampel pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P. acne* dengan kategori sangat kuat. Dari data penelitian tersebut menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol sampel, maka semakin tinggi pula rerata zona hambat yang terbentuk. Penelitian yang dilakukan oleh (Ariyani dkk, 2018) dari genus *Citrus* pada ekstrak etanol kulit limau kuit (*Citrus hystrix* Dc) terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dengan zona hambat optimum pada konsentrasi 100% dengan zona hambat sebesar 10,67 mm dan 14 mm. Kontrol positif memiliki daya hambat bakteri yang sangat kuat, kontrol negatif tidak memiliki daya hambat bakteri, hal ini dikarenakan akuades tidak mempunyai sifat antibakteri terhadap bakteri *P. acnes*. Ekstrak etanol sampel mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. acnes* karena mempunyai daya antibakteri. Kekuatan daya hambat ekstrak etanol sampel terhadap bakteri *P. acnes* dari konsentrasi rendah sudah menunjukkan daya hambat yang besar, sehingga ekstrak tersebut bisa dijadikan sebagai obat antibakteri. Besarnya daya antibakteri ekstrak etanol sampel kemungkinan disebabkan adanya sistem kerja yang sinergis antara senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol sampel seperti flavonoid, fenolik, terpenoid, steroid dan tanin.

Mekanisme penghambatan flavonoid sebagai antibakteri dengan menghambat metabolisme energi dengan cara menghambat penggunaan oksigen, melalui perpindahan bakteri yang berperan dalam aktivitas mikroba dan protein ekstraseluler, serta mencegah pembentukan energi sitoplasma. Menghalangi sintesis asam nukleat dihambat melalui pembentukan ikatan hidrogen pada cincin A dan B flavonoid, sehingga pembentukan RNA dan DNA dihalangi. Membatasi fungsi membran sel melalui pembentukan senyawa kompleks dari protein ekstraseluler pada flavonoid sehingga menyebabkan membran sel rusak dan senyawa intraseluler keluar (Hendra 2011 dalam Rijayanti 2014). Mekanisme fenolik dalam menghambat bakteri dengan meningkatkan permeabilitas membran sitoplasma sehingga terjadinya koagulasi sitoplasma dan bocornya komponen intraseluler yang menyebabkan terjadi lisis atau mati (Sufriyanto, 2005). Kandungan fenolik yang terkandung dalam ekstrak etanol limbah buah jeruk

kunci sebesar 146,7 mg EAG/g menyebabkan besarnya pengaruh daya hambat terhadap aktivitas antibakteri yang sangat kuat.

Terpenoid bekerja sebagai antibakteri dengan merusak membran oleh senyawa lipofilik. Terpenoid dapat bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri dengan membentuk ikatan polimer yang kuat dan merusak porin, serta mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri. Menyebabkan sel bakteri kekurangan nutrisi dan menyebabkan kematian pada bakteri (Cowan, 1999). Steroid sebagai antibakteri menghancurkan membran lemak dan terjadinya kerusakan (bocor) pada liposom (Madduluri dkk, 2013). Membran fosfolipid berinteraksi dengan steroid dapat menurunkan integritas membran dan terganggunya membran sel morfologi yang mengakibatkan lisis dan rapuhnya sel (Ahmed, 2007). Senyawa tanin bekerja sebagai antibakteri karena memiliki mekanisme mendenaturasi dan menggumpalkan protein (Yulia, 2006). Tanin berikatan dengan protein dan membentuk ion H^+ dan menyebabkan pH menjadi asam sehingga protein terdenaturasi. Pada kondisi asam bisa mengaktifkan enzim pada bakteri dan menyebabkan metabolisme terganggu dan kerusakan sel bahkan menyebabkan lisis (mati).