

**STANDARISASI SIMPLISIA DAN EKSTRAK KULIT
BUAH LIMAU SUNDAI (*Citrus x aurantiifolia* ‘Sundai’),
PENETAPAN KADAR NOBILETIN, SERTA UJI
ANTIBAKTERI**



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2020**

PERNYATAAN ORISINALITAS DAN PENYERAHAN HAK CIPTA

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Awaliana

No.BP : 1611012029

Judul Skripsi : Standarisasi Simplisia dan Ekstrak Kulit Buah Limau Sundai (*Citrus x aurantiifolia* 'Sundai'), Penetapan Kadar Nobiletin, Serta Uji Antibakteri

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi yang saya tulis merupakan hasil karya saya sendiri, terhindar dari unsur plagiarisme, dan data beserta seluruh isi skripsi tersebut adalah benar adanya.
2. Saya menyerahkan hak cipta dari skripsi tersebut kepada Fakultas Farmasi Universitas Andalas untuk dapat dimanfaatkan dalam kepentingan akademis.

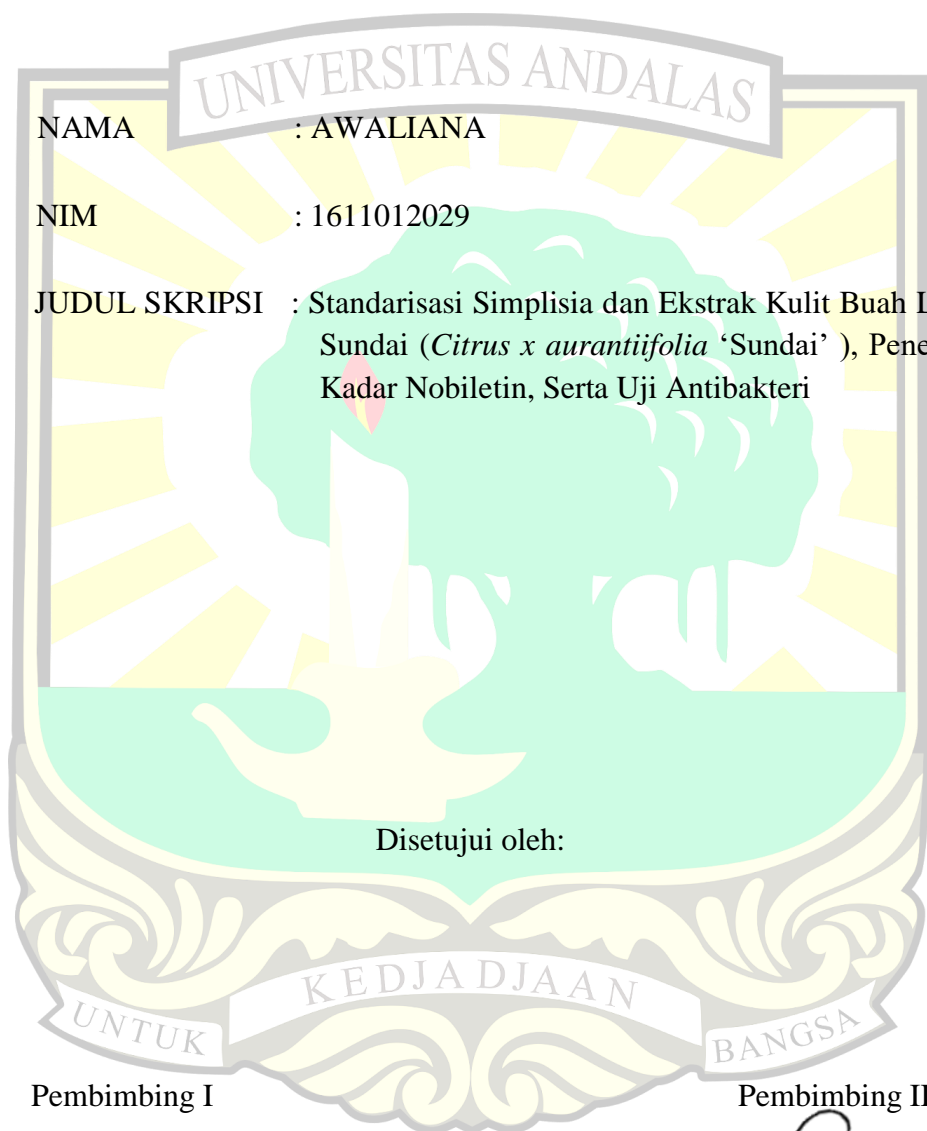
Padang, 18 Desember 2020



Awaliana

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menempuh
Ujian Sarjana Farmasi Program Sarjana (S1) Farmasi pada Fakultas
Farmasi**

Universitas Andalas



NAMA : AWALIANA

NIM : 1611012029

JUDUL SKRIPSI : Standarisasi Simplisia dan Ekstrak Kulit Buah Limau Sundai (*Citrus x aurantiifolia* 'Sundai'), Penetapan Kadar Nobiletin, Serta Uji Antibakteri

Disetujui oleh:

Pembimbing I

Pembimbing II




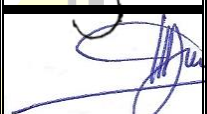

Dr. apt. Elidahanum Husni, M.Si
NIP. 19610918 198903 2 000

Dr. apt. Friardi
NIP. 19800226 201504 1 001

Skripsi ini telah dipertahankan pada Seminar Hasil Penelitian

Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Pada tanggal : 27 Juli 2020

No	Nama	Jabatan	Tanda Tangan
1	Dr. apt. Meri Susanti, M.Farm	Ketua	
2	Dr. apt. Elidahanum Husni	Pembimbing 1	
3	Dr. Apt.Friardi	Pembimbing 2	
4	Prof. Dr. apt. rer.nat. Dian Handayani	Pembahas	
5	Apt. Fithriani Armin, M.Si	Pembahas	



KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alaminn. Puji syukur atas berkah, rahmat dan karunia Allah SWT sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan **judul “Standarisasi Simplisia Dan Ekstrak Kulit Buah Limau Sundai (*Citrus x aurantifolia* ‘sundai’), Serta Uji Aktivitas Antibakteri”**. Shalawat dan juga salam tidak lupa pula penulis sampaikan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membawa manusia dari zaman jahiliyah ke zaman yang penuh ilmu pengetahuan seperti sekarang ini. Skripsi ini disusun dengan tujuan untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam menyelesaikan program pendidikan Strata Satu (S-1) pada Jurusan Farmasi Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari doa, bimbingan, dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Penulis sampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Prof. Dr. apt. Fatma Sri Wahyuni, S.Si sebagai dekan Fakultas Farmasi Universitas Andalas
2. Ibu apt. Lili Fitriani, S.Si, M.Pharm. SC sebagai Ketua Program Studi Sarjana Farmasi
3. Ibu Dr. Elidahanum Husni, Apt selaku Pembimbing 1 dan Bapak Dr. Friardi, Apt selaku Pembimbing 2 yang telah meluangkan waktu, memberi petunjuk, ilmu, nasehat, dan bimbingan selama masa penelitian dan penyusunan skripsi ini.
4. Bapak Prof. Dr. Harrizul Rivai, MS selaku penasehat akademik yang telah mengarahkan, memberikan dorongan dan nasehat kepada penulis.
5. Bapak/Ibu dosen staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Andalas yang telah mendidik dan memberikan ilmu yang bermanfaat kepada penulis selama mengikuti perkuliahan.
6. Ayah dan Bunda, serta keluarga yang selalu memberikan kasih sayang, dorongan, motivasi, dan do'a kepada penulis untuk tetap semangat dalam

menuntut ilmu serta selalu memberikan nasehat untuk menjadi lebih baik. Sungguh keluarga adalah sebaik – baik tempat pulang.

7. Sahabat yang selalu jadi *support system* (Holy, Devina, Fiony, Ocha), dan Oji Daputra. Sungguh sebaik – baik teman adalah teman yang membawa kebaikan.
8. Segenap keluarga besar Laboratorium Biota Sumatra, yang telah memberikan banyak pengalaman dan pembelajaran bagi penulis, terutama kak Ipeh, bang Arif dan Bang Febry. Semoga keluarga akan tetap keluarga.
9. Serta semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu.

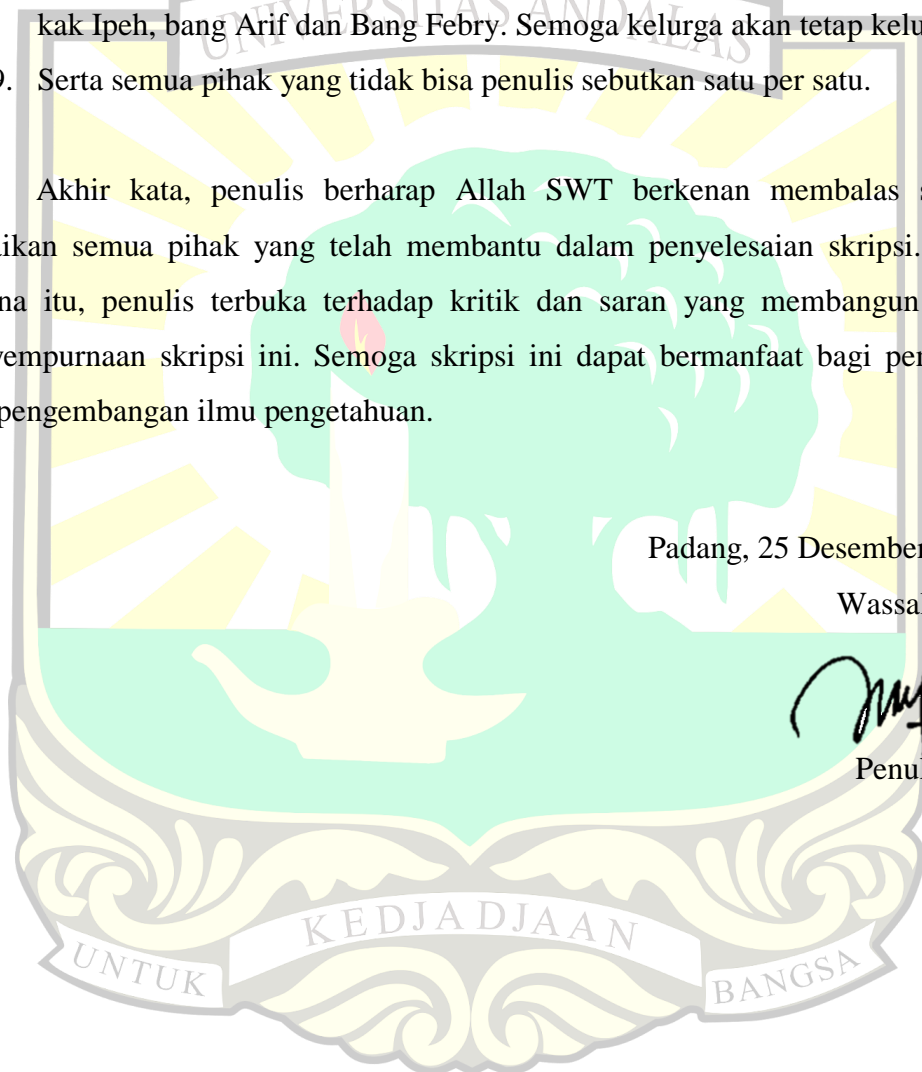
Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi. Oleh karena itu, penulis terbuka terhadap kritik dan saran yang membangun demi penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan pengembangan ilmu pengetahuan.

Padang, 25 Desember 2020

Wassalam



Penulis



ABSTRAK

STANDARISASI SIMPLISIA DAN EKSTRAK KULIT BUAH LIMAU SUNDAI (*Citrus x aurantiifolia* 'sundai'), PENETAPAN KADAR NOBILETIN, SERTA UJI ANTIBAKTERI

Oleh :
AWALIANA
NIM : 1611012029
(Program Studi Sarjana Farmasi)

Produksi buah jeruk di Indonesia sangat tinggi namun penggunaan kulit buah jeruk masih sangat sedikit, padahal kandungan kimia pada kulit jeruk memiliki efektivitas biologis yang lebih tinggi dibandingkan bagian yang bisa dimakan. Salah satu jenis jeruk khas Sumatera Barat yang banyak digunakan sebagai obat tradisional adalah limau sundai (*Citrus x aurantiifolia* 'sundai'), oleh karena itu perlu dilakukan standarisasi ekstrak dan simplisia, penetapan kadar nobiletin serta uji aktivitas antibakteri. Metode standarisasi yang digunakan mengacu pada Farmakope Herbal Indonesia. KLT-Densitometri digunakan untuk penentuan kadar nobiletin, serta uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi. Untuk mendapatkan hasil standarisasi yang baik, limau sundai di ambil dari tiga daerah yaitu Bukittinggi, Pariaman, dan Solok. Dari ketiga daerah tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa makroskopis limau sundai berupa irisan tipis kulit buah dengan permukaan tidak rata dan bau khas, permukaan luar berwarna coklat, dan permukaan bagian dalam berwarna putih kekuningan. Hasil mikroskopis identifikasi fragmen pengenal yang terdapat pada kulit limau sundai berupa rambut penutup, jaringan pengangkut berbentuk tangga, parenkim dengan sel sekresi, kristal oksalat, jaringan parenkim dan stomata. Kadar sari larut air dari simplisia $\leq 24,90$ % dan kadar sari larut etanol $\leq 17,66$ %. Parameter non spesifik berupa susut pengeringan $\leq 5,65$ %, kadar abu total tidak lebih dari 5,14 %, dan kadar abu tidak larut asam $\leq 0,80$ %. Parameter spesifik standarisasi ekstrak berupa ekstrak kental, warna hitam, bau khas, nilai R_f nobiletin 0,75. Rendemen ekstrak $\geq 18,80$ %. Parameter non spesifik ekstrak berupa kadar air $\leq 18,37$ %, kadar abu total $\leq 3,93$ %, dan kadar abu tidak arut asam $\leq 0,268$ %. Kadar nobiletin pada ekstrak kulit limau sundai Pariaman 0,33 %, Solok 0,59 % dan Bukittinggi 0,47 % . Pada uji antibakteri menggunakan metode difusi pada ketiga daerah memiliki aktivitas tergolong sedang pada konsentrasi 20 % dan 15 % .

Kata Kunci : Standardisasi, Kulit limau sundai, *Citrus x aurantiifolia* ('sundai'), penetapan kadar nobiletin, KLT Densitometri , Uji antibakteri

ABSTRACT

STANDARDIZATION EXTRACTS AND SIMPLICIA OF LIMAU SUNDAI PEEL (*Citrus x aurantiifolia* 'sundai'), DETERMINE CONTENT OF NOBILETIN AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST

By:

AWALIANA

Student ID Number : 1611012029
(Bachelor of Pharmacy)

The production of citrus fruits in Indonesia is very high but the use of orange peel is still very small, even though the chemical content in orange peels has more biological reserves than the consumable parts. One type of oranges typical of West Sumatra which is widely used as traditional medicine is lime sundai (*Citrus x aurantiifolia* 'sundai'), therefore it is necessary to standardize extracts and simplicia, determine content of nobiletin and antibacterial activity test. The standardization method was used refer to Farmakope Herbal Indonesia. TLC Densitometry was use to determines content of nobiletin and diffusion method was use to antibacterial activity test. To get a good standardization, the limau sundai was taken from three regions namely Bukittinggi, Pariaman, and Solok. From these three regions, conclusions can be drawn the macroscopic of fruit peel slices was uneven and had distinctive odors. The outer surface is brown, and the inner surface is yellowish white. From the microscopic was identified fragments contained in the limau sundai peels consist of hair covering, ladder-shaped transport, parenchyma with secretion cells, oxalate crystals, parenchyma tissue and stomata. Water soluble extract content of simplicia ≤ 24.90 %, and ethanol soluble extract content ≤ 17.66 %. Non-specific parameters are dry shrinkage ≤ 5.65 %, total ash content ≤ 5.14 %, and acid insoluble ash content ≤ 0.80 %. The specific parameters were crude extract, black , characteristic odor, Rf of nobiletin was 0.75. Rendement extract ≥ 18.80 %. Non-specific parameters of extract were water content ≤ 18.37 %, total ash content ≤ 3.93 %, and non-acidic ash content ≤ 0.27 %. The nobiletin content in the limau sundai extract Pariaman was 0.33 %, Solok 0.59 % and Bukittinggi 0.47 % . In the antibacterial test with diffusion method in three regions have moderate activities as concentrations of 20% and 15%.

Keywords : Standardization, Limau sundai peel fruit, *Citrus x aurantiifolia* ('sundai'), Determine contet of nobiletin, TLC Densitometry, Antibacterial activity

DAFTAR ISI

JUDUL	i
PERNYATAAN ORISINIL DAN PENYERAHAN HAK CIPTA	ii
PENGESAHAN	iii
PERTAHANAN HASIL	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II	5
TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Botani	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Sinonim dan Nama Lain	5
2.1.3 Ekologi dan Penyebaran	5
2.1.4 Morfologi Tumbuhan	6
2.1.5 Kandungan dan Manfaat	6
2.2 Simplisia	8
2.2.1 Pengertian Simplisia	8
2.2.2 Penggunaan Simplisia	8
2.2.3 Jenis Pembuatan Simplisia	8

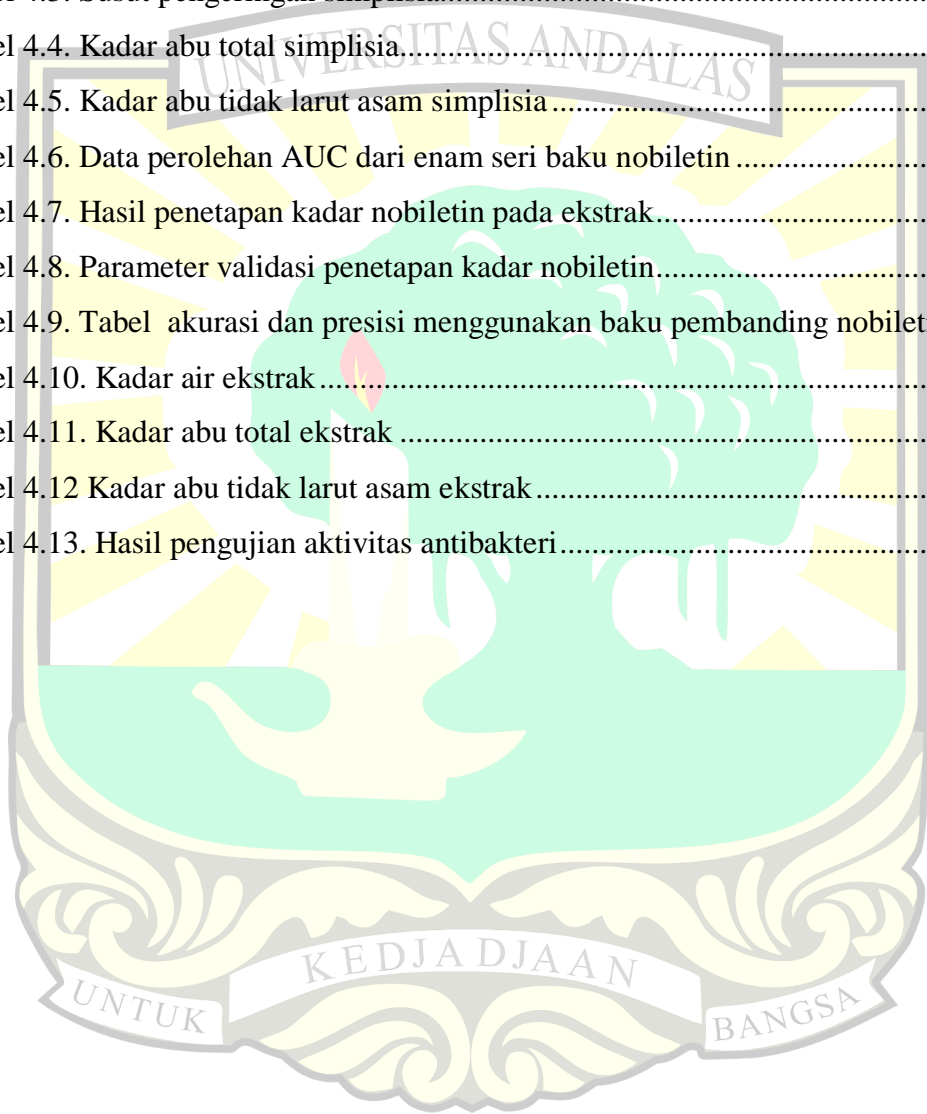
2.2.4	Proses penyiapan simplisia	9
2.3	Ekstraksi	11
2.3.1	Ekstraksi Dengan Cara Dingin	12
2.3.2	Ekstraksi Dengan Cara Panas.....	13
2.4	Standarisasi.....	15
2.4.1	Parameter Spesifik	16
2.4.2	Parameter Non Spesifik.....	16
2.5	Kromatografi	17
2.5.1	Metode pemisahan Kromatografi.....	17
2.5.2	Klasifikasi Kromatografi.....	18
2.5.3	Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	19
2.5.4	KLT - Densitometri.....	23
2.5	Spektrofotometri (40)	24
2.6	Flavonoid.....	25
2.6.1	Flavanon Pada Jeruk	27
2.6.2	Flavon Pada Jeruk	29
2.6.3	Polymethoxylated Flavon Pada Jeruk	30
2.7	Uji Antibakteri.....	31
2.7.1	Penggolongan antibiotika :	31
2.7.2	Metode Uji Aktivitas Antibakteri.....	33
2.7.3	Bakteri uji.....	34
BAB III	37
METODA PENELITIAN	37
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian	37
3.2	Alat dan Bahan	37
3.3	Prosedur Kerja	38
3.3.1	Pengambilan Sampel.....	38
3.3.2	Identifikasi Sampel.....	38
3.3.3	Penyiapan Sampel	38
3.3.4	Perhitungan Randemen	39
3.3.5	Standardisasi Simplisia	39

3.3.6	Standardisasi Ekstrak	41
3.3.7	Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metoda Difusi Agar	43
BAB IV	46
HASIL DAN PEMBAHASAN	46
4.1	Identitas Sampel	46
4.2	Standardisasi Simplisia.....	46
4.2.1	Parameter Spesifik	46
4.2.2	Parameter Non Spesifik.....	49
4.3	Standarisasi Ekstrak.....	51
4.3.1	Parameter Spesifik	52
4.3.2	Parameter Non Spesifik.....	58
4.4	Aktivitas Antibakteri Ekstrak.....	60
BAB V	63
KESIMPULAN DAN SARAN	63
1.1	Kesimpulan.....	63
5.2	Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA	65



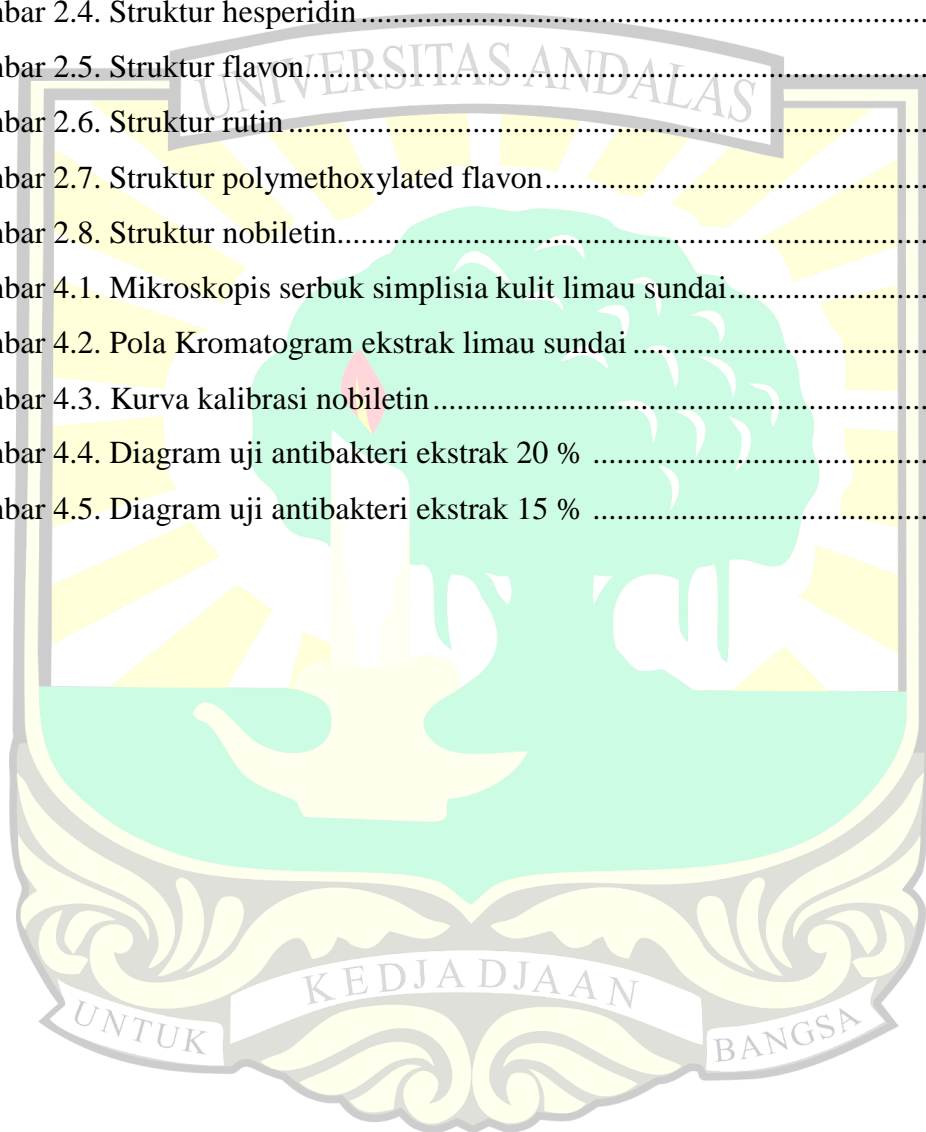
DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Kadar sari larut air pada simplisia.....	48
Tabel 4.2. Kadar sari larut etanol pada simplisia.....	48
Tabel 4.3. Susut pengeringan simplisia.....	49
Tabel 4.4. Kadar abu total simplisia.....	50
Tabel 4.5. Kadar abu tidak larut asam simplisia.....	50
Tabel 4.6. Data perolehan AUC dari enam seri baku nobiletin.....	54
Tabel 4.7. Hasil penetapan kadar nobiletin pada ekstrak.....	55
Tabel 4.8. Parameter validasi penetapan kadar nobiletin.....	55
Tabel 4.9. Tabel akurasi dan presisi menggunakan baku pembanding nobiletin.....	57
Tabel 4.10. Kadar air ekstrak.....	58
Tabel 4.11. Kadar abu total ekstrak.....	59
Tabel 4.12 Kadar abu tidak larut asam ekstrak.....	59
Tabel 4.13. Hasil pengujian aktivitas antibakteri.....	60



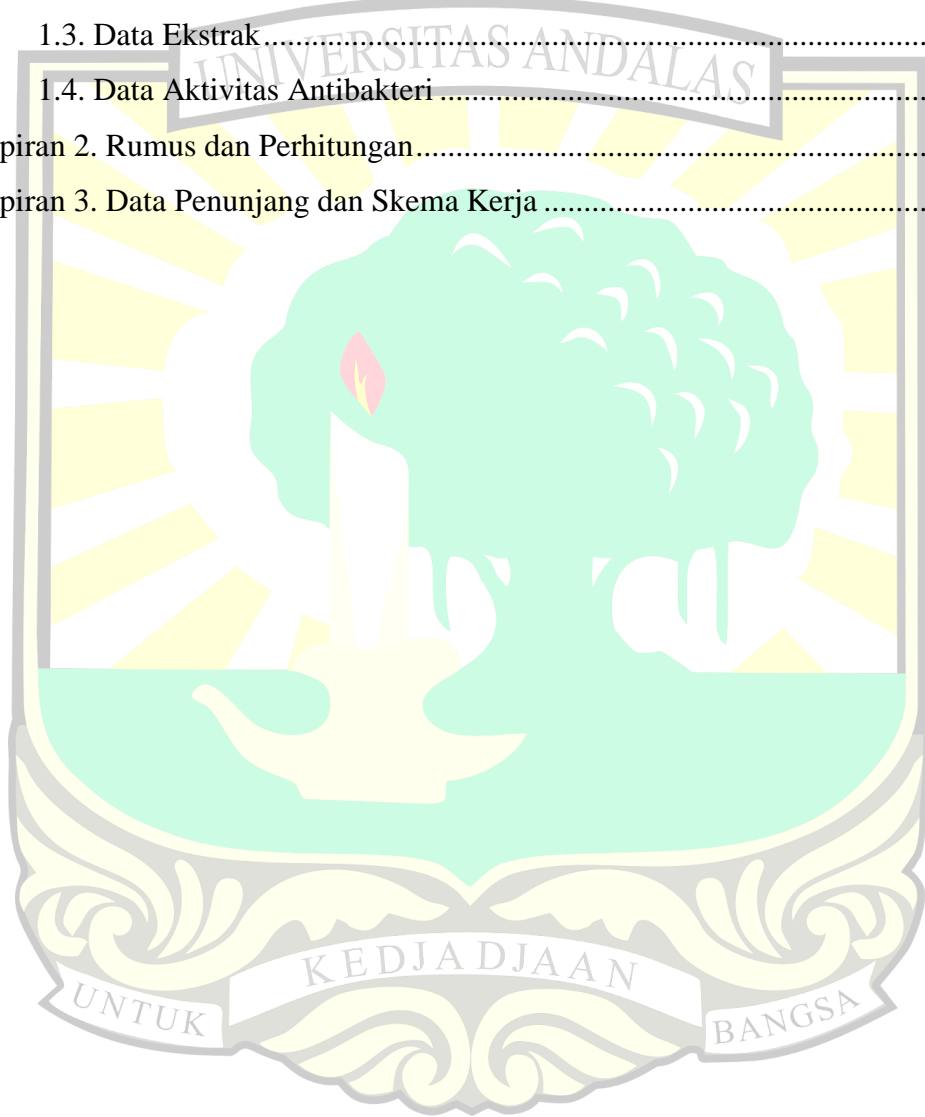
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Buah limau sundai.....	6
Gambar 2.2. Kerangka flavonoid.....	25
Gambar 2.3. Struktur flavanon.....	27
Gambar 2.4. Struktur hesperidin.....	28
Gambar 2.5. Struktur flavon.....	29
Gambar 2.6. Struktur rutin.....	29
Gambar 2.7. Struktur polymethoxylated flavon.....	30
Gambar 2.8. Struktur nobiletin.....	30
Gambar 4.1. Mikroskopis serbuk simplisia kulit limau sundai.....	47
Gambar 4.2. Pola Kromatogram ekstrak limau sundai.....	52
Gambar 4.3. Kurva kalibrasi nobiletin.....	54
Gambar 4.4. Diagram uji antibakteri ekstrak 20 %.....	61
Gambar 4.5. Diagram uji antibakteri ekstrak 15 %.....	61



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Penelitian.....	72
1.1 Identifikasi Tanaman.....	72
1.2. Data Simplisia	78
1.3. Data Ekstrak.....	75
1.4. Data Aktivitas Antibakteri	77
Lampiran 2. Rumus dan Perhitungan.....	78
Lampiran 3. Data Penunjang dan Skema Kerja	81



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan obat berbasis bahan alam saat ini berkembang pesat di semua kalangan masyarakat. Selain karena harga yang lebih terjangkau, obat berbasis bahan alam relatif lebih aman dibandingkan dengan obat sintetik (1). Salah satu bahan alam yang paling sering digunakan sebagai obat adalah tumbuhan. Tanaman obat sendiri memiliki ribuan jenis spesies. Dari total sekitar 40.000 jenis tumbuh-tumbuhan obat yang telah dikenal di dunia, 30.000-nya disinyalir berada di Indonesia. Jumlah tersebut mewakili 90% dari tanaman obat yang terdapat di wilayah Asia. Dari jumlah tersebut, 25% diantaranya atau sekitar 7.500 jenis sudah diketahui memiliki khasiat. Namun hanya 1.200 jenis tanaman yang sudah dimanfaatkan untuk bahan baku obat-obatan herbal atau jamu (2).

Diantara tanaman obat yang ada di Indonesia, jeruk merupakan tanaman obat dengan produksi yang tinggi. Jeruk mempunyai peranan penting di pasaran dunia maupun dalam negeri, baik dalam bentuk segar maupun olahannya. Berdasarkan data Food and Agriculture Organization (FAO), prospek perkembangan jeruk Indonesia di kancah ASEAN cukup baik mengingat Indonesia merupakan negara dengan luas panen dan produksi terbesar untuk jeruk di ASEAN (3). Daging buah jeruk merupakan bagian yang paling banyak digunakan, baik itu dikonsumsi langsung (jeruk manis), dibuat jus (jeruk kasturi), pengawet (jeruk nipis) serta daunnya sebagai bumbu masakan (jeruk purut) (4). Penggunaan kulit buah jeruk masih sangat sedikit, padahal kandungan kimia pada kulit jeruk memiliki efektivitas biologis yang lebih tinggi dibandingkan bagian yang bisa dimakan. Senyawa polifenol merupakan metabolit sekunder dari jeruk yang banyak mengandung senyawa aktif biologis, seperti anti-inflamasi, anti-mikroba, kardioprotektif, neuroprotektif, anti-adipogenesis, anti-diabetes, hepatoprotektif dll (5).

Senyawa polifenol yang biasanya terdapat pada buah jeruk adalah flavonoid seperti flavanon aglikon (hesperitin, naringenin), flavon aglikon (acacetin, quercetin, diosmetin), polymethoxyflavon (quercetogetin, nobiletin tangeretin), flavanone-O-glikosida (hesperidin, naringin, narirutin, neohesperidin), dan flavone-C- dan flavone-Cglucosida (5). Setiap tanaman memiliki kadar dan komposisi yang berbeda, sehingga dalam pemanfaatannya sebagai bahan baku obat perlu dilakukan karakterisasi dan standarisasi baik ekstrak maupun simplisianya termasuk jeruk. Salah satu jeruk yang khas dan banyak dimanfaatkan di Sumatera Barat namun belum ada standarisasinya di Farmakope Herbal Indonesia adalah limau sundai, maka perlu dilakukan standarisasi agar penggunaannya sebagai bahan baku obat dapat dikembangkan lagi. Untuk standarisasi sampel di ambil dari tiga daerah yaitu Pariaman, Bukittinggi, dan Solok.

Limau sundai merupakan persilangan dari *Citrus aurantifolia* dengan *Citrus hystrix*. Hasil identifikasi yang di peroleh dari Herbarium Universitas Andalas (ANDA) mengatakan limau sundai memiliki karakteristik campuran dari kedua induknya, dengan karakteristik jeruk nipis lebih mendominasi. Data terkait limau sundai sangat minim, namun dalam peninjauan ulang marga *Citrus* di kawasan Madura oleh Arifin Surya, perasan limau sundai dimanfaatkan masyarakat sekitar secara tradisional sebagai obat batuk dan bumbu masakan (6), Harrumi Novita juga melaporkan bahwa daun limau sundai digunakan sebagai obat tradisional di daerah Solok Sumatera Barat (7). Karena ketersediaan limau sundai yang cukup banyak di Sumatera Barat dan minimnya data terkait limau sundai dengan pemanfaatan yang luas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian ini. Pada umumnya kelompok jeruk-jerukan memiliki kandungan flavonoid yang cukup besar dan memiliki bioaktivitas. Salah satu flavonoid tersebut adalah nobiletin (8).

Nobiletin merupakan flavonoid golongan metoksi flavon yang memiliki aktifitas sebagai antikarsinogenik, antiinflamasi, antidiabetes (9), anti kanker, antivirus (8), antibakteri (10). Salah satu bagian penting dari standarisasi adalah penetapan kadar, dan salah satu senyawa yang berkemungkinan besar terdapat

pada limau sundai adalah nobiletin, maka dirasa perlu untuk menentukan seberapa besar kadar nobiletin pada ekstrak kulit limau sundai. Penetapan kadar nobiletin menggunakan metode KLT – Densitometri sesuai dengan ketentuan yang tertera pada Farmakope Herbal Indonesia.

Flavonoid yang terkandung di dalam jeruk pada umumnya memiliki aktivitas antimikroba, karena itu perlu dilakukan pengujian pada ekstrak kulit limau sundai untuk mengetahui seberapa besar efek antibakterinya. Metode yang digunakan adalah metode difusi dengan bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana parameter spesifik dan non spesifik simplisia dan ekstrak limau sundai ?
2. Berapa kadar nobiletin pada ekstrak kulit buah limau sundai ?
3. Bagaimana aktivitas antibakteri dari ekstrak kulit buah limau sundai dari masing – masing daerah ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui apakah karakter spesifik serta nonspesifik simplisia dan ekstrak dari kulit buah limau sundai dari masing-masing daerah.
2. Untuk mengetahui seberapa besar kadar nobiletin pada ekstrak kulit buah limau sundai
3. Untuk mengetahui aktifitas antibakteri dari ekstrak kulit buah limau sundai

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

- 1.. Mengaplikasikan ilmu peneliti yang telah didapatkan selama perkuliahan.

2. Sebagai sumber informasi ilmiah mengenai standarisasi simplisia dan ekstrak kulit buah limau sundai, kadar nobiletin ekstrak serta aktivitas antibakteri.
3. Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam upaya pengembangan bahan obat dari kulit buah limau sundai.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani

2.1.1 Klasifikasi

Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Spermatophyta
Sub divisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledonae
Ordo	:	Rutales
Keluarga	:	Rutaceae
Genus	:	Citrus (11)
Spesies	:	<i>Citrus x aurantifolia</i> 'Sundai' (7).

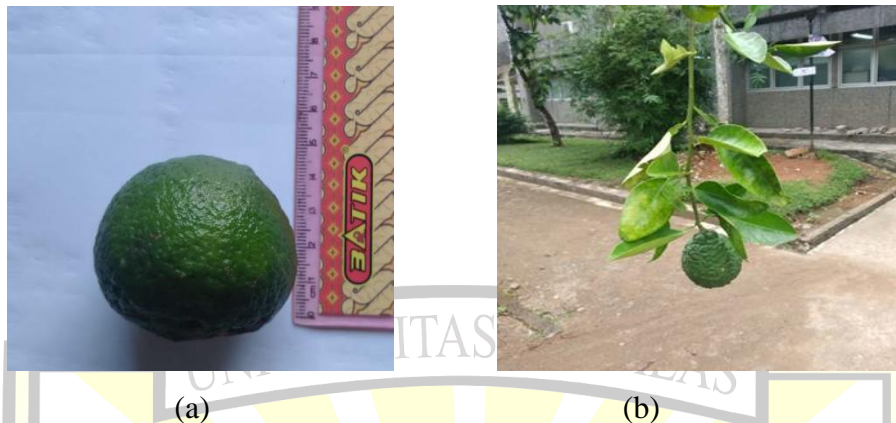
2.1.2 Sinonim dan Nama Lain

- Asal : Jeruk ini merupakan hasil persilangan dari *Citrus aurantifolia* dengan *Citrus hystrix*.
- Nama lokal : *Jherruk peccel*, *jherruk nipis* (Madura), jeruk nipis (Indonesia) (6), sedangkan di Solok Sumatera Barat jeruk ini dikenal dengan limau sundai (7), limau sundai juga memiliki kemiripan dengan jeruk kuit di Kalimantan dan asam jungga di Sumatera Utara (12,13).

2.1.3 Ekologi dan Penyebaran

Bangkalan (Jaddih, Kamal), Sampang (Sampang, Camplong), Pamekasan (Mandi-laras, Panaguan) dan Kangean (Duko) Madura (6), Sumatera Barat pada umumnya (7).

2.1.4 Morfologi Tumbuhan



Gambar 2.1. Buah limau sundai

Bentuk perdu, daun majemuk berpinak, daun 1, sayap tangkai daun memita-melanset sungsang, helaian menjorong-membundar telur, $3,5-11 \times 2,2 - 6,7$ cm, pangkal membaji atau membundar, ujung menumpul-membundar atau meruncing dan tepi berpucisan. Kuncup bunga membulat telur sungsang, mahkota bagian luar putih, benang sari 24–25, berpautan dan tangkai sari memita. Buah membulat telur, berukuran sedang, diameter 3,9–4,5 cm, pericarp hijau kekuningan saat masak, melekat pada endocarp, lokul buah 9–11, vesikula pulpa kuning kehijauan dan masam. Biji 3–5 per lokul, membulat telur, kotiledon putih susu (6), seperti pada gambar 2.1.

2.1.5 Kandungan Kimia dan Manfaat

2.1.5.1 Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

Kulit buah jeruk nipis banyak mengandung banyak mengandung senyawa diantaranya adalah minyak atsiri. Minyak atsiri yang terdapat pada kulit jeruk nipis yaitu limonen (33,33%), β -pinen (15,85%), sitral (10,54%), neral (7,94%), γ – *terpinen* (6,80%), α farnesen (4,14%), α -bergamoten (3,38%), β -bisabolen (3,05%), α -terpineol (2,98%), linalol (2,45%), sabinen (1,81%), β -elemen (1,74%), nerol (1,52%), α -pinen (1,25%), geranil asetat (1,23%), 4- terpinol (1,17%), neril asetat (0,56%) dan trans- β osimen (0,26%) (14). Selain minyak atsiri kulit buah jeruk nipis juga mengandung senyawa fenolik lebih tepatnya senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid yang terdapat pada kulit buah jeruk ini adalah

hesperidin, naringin, neohesperidin dan nobeletin. Kandungan flavonoid dan minyak atsiri yang tinggi berperan penting sebagai antioksidan, antibakteri, antimalaria, dan juga berperan sebagai antipiretik (15). Dalam penelitian Wulandari juga disebutkan bahwa senyawa naringenin memiliki sifat antikarsinogenesis dan antitumorigenesis (16).

Sementara itu perasan jeruk nipis mengandung, asam sitrat, asam amino, minyak atsiri, damar, glikosida, asam sitrun, lemak, kalsium, fosfor, besi, belerang vitamin B1 dan C. Kandungan Gizi dalam 100 gram buah jeruk nipis mengandung vitamin C sebesar 27 miligram, kalsium 40 miligram, fosfor 22 miligram, hidrat arang 12,4 gram, vitamin B1 0,04 miligram, zat besi 0,6 miligram, lemak 0,1 gram, kalori 37 gram, protein 0,8 gram dan mengandung air 86 gram (17). Kandungan asam organik yang terkandung dalam jeruk nipis menyebabkan PH lingkungan menurun sehingga menghambat pertumbuhan bakteri yg tak tahan asam. Sedangkan saponin berperan dalam menurunkan tegangan permukaan dan meningkatkan permeabilitas dinding sel bakteri yang dapat menyebabkan lisis (18). Dari uji fitokimia daun jeruk nipis memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, glikosida, saponin, steroid, fenol, terpenoid dan tannin, yang memiliki aktivitas antibakteri (19).

2.1.5.2 Jeruk Purut (*Citrus hystix*)

Daun jeruk purut mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin dan saponin. Ekstrak dari daun jeruk nipis ini memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antimikroba, dan antiinflamasi (20). Daun jeruk purut juga mengandung banyak senyawa minyak atsiri adalah limonene, trans-ocimene, β -terpinene, ρ -cymene, terpinolene, copaene, linalool, β -cubebene, isopulegol, caryophyllene, citronellyl acetate, citronellol, geranyl acetate, δ -cadinene yang memiliki efektivitas antioksidan dan antibakteri yang juga baik (21). Sementara itu kulit jeruk purut mengandung minyak atsiri berupa limonene, mirsen, linalool, oktanal, decanal, sitronelol, neral, geraniol, valensen, sinensial dan sinensial. Sitronelol dan geraniol yang memiliki aktivitas repellent (pengusir nyamuk) dan sisanya memiliki efek antioksidan (22). Ekstrak dari kulit jeruk purut mengandung tannin, saponin, flavonoid serta kumarin yang memiliki aktivitas sebagai anti fungi (23).

2.2 Simplisia

2.2.1 Pengertian Simplisia

Dalam buku “Materia Medika Indonesia” simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga kecuali dinyatakan lain, dan berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibedakan atas simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan (24).

Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh dan eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau dengan cara tertentu dikeluarkan dari isinya dan belum berupa senyawa kimia murni (24). Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni (25). Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia yang berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (25).

2.2.2 Penggunaan Simplisia

Penggunaan simplisia dalam bentuk kefarmasian yaitu (24) :

1. Siap dipakai dalam bentuk serbuk halus untuk diseduh sebelum diminum (jamu).
2. Siap dipakai untuk dicacah dan digodok sebagai jamu godokan (infus).
3. Diproses selanjutnya untuk dijadikan produk sediaan farmasi lain yang umumnya melalui proses ekstraksi, separasi dan pemurnian, yaitu menjadi ekstrak, fraksi atau bahan isolat senyawa murni.

2.2.3 Jenis Pembuatan Simplisia

Proses pembuatan simplisia terdiri dari beberapa jenis, yaitu (26):

1. Simplisia yang dibuat dengan cara pengeringan

Pengeringan dilakukan dalam waktu yang tidak lama dan suhu yang tidak terlalu tinggi karena akan mengakibatkan perubahan kimia kandungan senyawa aktifnya. Sebab itu perlu diatur perajangannya sehingga tebal irisan pada saat pengeringan tidak mengalami perubahan.

2. Simplisia yang dibuat dengan proses fermentasi

Proses ini dilakukan dengan seksama agar proses ini tidak berkelanjutan kearah yang tidak diinginkan.

3. Simplisia yang dibuat dengan proses khusus

Pembuatan simplisia berupa dengan cara penyulingan, pengentalan eksudat, pengeringan sari air dan proses khusus lainnya.

4. Simplisia yang pembuatannya memerlukan air

Pati, talk, dan sebagainya pada proses pembuatannya memerlukan air. Air yang digunakan harus bebas dari cemaran pestisida, patogen, logam berat, dll.

2.2.4 Proses penyiapan simplisia

A. Simplisia Segar

Proses penyiapan simplisia segar yang akan dibuat ekstrak meliputi :

1. Sortasi basah

Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran atau bahan asing lainnya dari simplisia. Misalnya simplisia yang dibuat dari akar suatu tumbuhan obat harus bebas dari bahan asing seperti tanah, kerikil, rumput, batang, daun, akar yang telah rusak maupun organ tumbuhan lain (27).

2. Pencucian

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih, seperti air dari mata air, sumur, atau air ledeng. Pencucian bahan simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam air, hendaknya dilakukan dalam waktu yang sesingkat mungkin. Pada simplisia akar, batang atau buah dapat pula dilakukan pengupasan kulit luarnya untuk mengurangi jumlah mikroba awal karena mikroba biasanya terdapat pada permukaan bahan simplisia (27).

3. Penirisan

Penirisan dilakukan untuk mengurangi jumlah air bilasan yang masih menempel pada simplisia dan agar pengotor yang masih terdapat dalam air bilasan cucian ikut terbuang (27).

4. Perajangan

Perajangan diperlukan untuk memperluas permukaan bahan sehingga mempermudah proses ekstraksi. Beberapa jenis simplisia memerlukan perajangan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan. Apabila terlalu tebal maka proses pengeringan akan terlalu lama dan kemungkinan dapat membusuk atau berjamur. Perajangan yang terlalu tipis akan berakibat rusaknya kandungan kimia karena oksidasi atau reduksi. Semakin tipis bahan yang akan dikeringkan, semakin cepat penguapan air, sehingga mempercepat waktu pengeringan. Akan tetapi irisan yang terlalu tipis juga dapat menyebabkan berkurangnya atau hilangnya zat berkhasiat yang mudah menguap, sehingga mempengaruhi komposisi, bau dan rasa yang diinginkan. Oleh karena itu, bahan simplisia seperti temulawak, temu giring, jahe, kencur dan bahan sejenis lainnya, perajangan yang terlalu tipis dihindari untuk mencegah berkurangnya kadar minyak atsiri, kecuali jika minyak atsiri tidak diharapkan tertinggal di dalam simplisia tersebut. Jika simplisia segar disari tanpa pengeringan lebih dahulu, dapat dilakukan pamarutan. Ini adalah untuk memudahkan dan memaksimalkan proses penyarian (27).

B. Simplisia Kering

Penyiapan simplisia kering dapat dilakukan dengan cara (25) :

1. Proses pengeringan simplisia dari bahan segar

Proses pengeringan yang baik dapat dilakukan dengan cara oven dengan suhu tidak lebih dari 60°C dan pengeringan di bawah sinar matahari tidak langsung.

2. Sortasi kering

Sortasi kering dilakukan untuk memisahkan kotoran, bahan organik asing, dan simplisia yang rusak akibat proses sebelumnya. Sortasi kering ini juga dilakukan untuk memilih simplisia kering yang bermutu baik.

3. Pencucian simplisia kering

Jika simplisia diperoleh dari pemasok dalam keadaan kering dan dianggap masih kotor maka dilakukan pencucian dan pengeringan kembali.

4. Penyerbukan

Proses awal pembuatan ekstrak adalah tahapan pembuatan serbuk simplisia kering. Dari simplisia dibuat serbuk simplisia dengan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak dengan dasar beberapa hal sebagai berikut yaitu makin halus serbuk simplisia, proses ekstraksi makin efektif dan efisien. Namun, makin halus serbuk, maka makin rumit secara teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi. Selama penggunaan peralatan penyerbukan dimana ada gerakan dan interaksi dengan benda keras, maka akan timbul panas yang dapat berpengaruh pada senyawa kandungan.

2.3 Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (24). Ekstrak cair adalah sediaan cair simplisia nabati, yang mengandung etanol sebagai pelarut atau sebagai pengawet atau sebagai pelarut dan pengawet. Jika tidak dinyatakan lain pada masing-masing monografi, tiap ml ekstrak mengandung bahan aktif dari 1 g simplisia yang memenuhi syarat (24).

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut cair. Proses ekstraksi secara umum dapat dilakukan dengan cara maserasi, perkolasi, refluks, ekstraksi dengan alat soxhlet, digesti, infusa dan dekok (28). Tujuan dari ekstraksi adalah untuk memisahkan komponen – komponen yang diinginkan dari suatu tanaman sehingga didapatkan senyawa aktif dengan kemurnian tinggi. Proses ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya jenis pelarut, perbandingan pelarut dengan bahan ekstraksi, suhu, tekanan dan waktu ekstraksi serta komponen bioaktif tumbuhan. Jika kondisi suhu dan temperatur sama, maka jenis pelarut dan komponen senyawa kimia yang terdapat pada tanaman adalah dua faktor penting yang menentukan keberhasilan proses ekstraksi (29).

Metoda ekstraksi dengan menggunakan pelarut ada 2 cara, yaitu cara dingin dan cara panas.

2.3.1 Ekstraksi Dengan Cara Dingin

1. Maserasi

Metode maserasi dapat mengekstraksi senyawa aktif dengan baik melalui perendaman tanpa pemanasan sehingga dapat menghindari kerusakan komponen senyawa yang labil dan tidak tahan panas. Pada sistem perendaman ini pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel yang mengandung zat aktif. Maka zat aktif yang terdapat dalam sel akan larut dalam pelarut. Pelarut yang dipakai adalah air atau pelarut organik. Keuntungan dari maserasi adalah pengerjaan dan peralatannya mudah dan sederhana. Sedangkan kekurangannya antara lain waktu yang diperlukan untuk mengekstraksi bahan cukup lama, penyarian kurang sempurna, pelarut yang digunakan jumlahnya banyak. Masukkan 1 bagian simplisia ke dalam maserator, tambahkan 10 bagian penyari dan rendam selama 6 jam sambil sekali-kali diaduk, kemudian diamkan hingga 24 jam. Pisahkan maserat dengan separator dan ulangi proses 2 kali dengan jumlah dan jenis pelarut yang sama, kemudian kumpulkan semua maserat. Jika maserasi dilakukan dengan pelarut air maka tambahkan etanol minimal 10%, selain sebagai pengawet, juga untuk memudahkan penguapan maserat (24).

2. Perkolasi

Perkolasi merupakan teknik yang paling sering digunakan untuk mengekstrak bahan aktif dari bagian tanaman dalam penyediaan tinktur dan ekstrak cair (25). Sebuah perkolator, biasanya berupa silinder yang sempit dan panjang dengan kedua ujungnya berbentuk kerucut yang terbuka. Bagian tanaman yang akan diekstrak dibasahi dengan sejumlah pelarut yang sesuai dan dibiarkan selama kurang lebih 4 jam dalam tangki tertutup. Selanjutnya, bagian tanaman ini dimasukkan ke dalam perkolator dan bagian atas perkolator ditutup. Sejumlah pelarut biasanya ditambahkan hingga membentuk lapisan tipis di bagian tanaman yang akan diekstrak. Bagian tanaman ini dibiarkan mengalami maserasi selama 24 jam dalam perkolator tertutup. Setelah itu, cairan hasil perkolasi dibiarkan keluar dari perkolator dengan membuka bagian pengeluaran (tutup bawah)

perkolator. Sejumlah pelarut ditambahkan lagi (seperti membilas) sesuai dengan kebutuhan hingga cairan ekstrak yang diperoleh menjadi kurang lebih tiga per empat dari volume yang diinginkan dalam produk akhir. Ampas ditekan/dipress, dan cairan yang diperoleh ditambahkan ke dalam cairan ekstrak. Selanjutnya, sejumlah pelarut ditambahkan lagi ke dalam cairan ekstrak untuk memperoleh ekstrak dengan volume yang diinginkan. Campuran ekstrak yang diperoleh dijernihkan dengan penyaringan atau sedimentasi dengan dilanjutkan dengan dekantasi (25).

2.3.2 Ekstraksi Dengan Cara Panas

1. Digesti

Digesti adalah cara maserasi dengan menggunakan pemanasan pada suhu $40 - 50^{\circ}$. Cara maserasi ini hanya dapat dilakukan untuk simplisia yang zat aktifnya tahan terhadap pemanasan. Dengan pemanasan akan diperoleh keuntungan antara lain yaitu kekentalan pelarut berkurang, yang dapat mengakibatkan berkurangnya lapisan-lapisan batas, daya melarutkan cairan penyari akan meningkat, sehingga pemanasan tersebut mempunyai pengaruh yang sama dengan pengadukan, koefisien difusi berbanding lurus dengan suhu absolut dan berbanding terbalik dengan kekentalan, hingga kenaikan suhu akan berpengaruh pada kecepatan difusi. Umumnya kelarutan zat aktif akan meningkat bila suhu dinaikkan. Jika cairan penyari mudah menguap pada suhu yang digunakan, maka perlu dilengkapi dengan pendingin balik, sehingga cairan penyari yang menguap akan kembali ke dalam bejana. Digesti digunakan untuk simplisia yang zat aktifnya tahan terhadap proses pemanasan. Pelarut yang digunakan adalah air atau pelarut organik. Keuntungan dari digesti adalah penyariannya lebih sempurna dibandingkan maserasi karena dibantu dengan proses pemanasan (27).

2. Soxhlet

Pada teknik ekstraksi ini, bagian tanaman yang sudah digiling halus dimasukkan ke dalam kantong berpori (thimble) yang terbuat dari kertas saring yang kuat dan dimasukkan ke dalam alat soxhlet untuk dilakukan ekstraksi. Pelarut yang ada dalam labu akan dipanaskan dan uapnya akan mengembun pada

kondenser. Embunan pelarut ini akan merayap turun menuju kantong berpori yang berisi bagian tanaman yang akan diekstrak. Kontak antara embunan pelarut dan bagian tanaman ini menyebabkan bahan aktif terekstraksi. Ketika ketinggian cairan dalam tempat ekstraksi meningkat hingga mencaapai puncak kapiler maka cairan dalam tempat ekstraksi akan tersedot mengalir ke labu selanjutnya (30).

Proses ini berlangsung secara terus-menerus (kontinyu) dan dijalankan sampai tetesan pelarut dari pipa kapiler tidak lagi meninggalkan residu ketika diuapkan. Keuntungan dari proses ini jika dibandingkan dengan proses-proses yang telah dijelaskan sebelumnya adalah dapat mengekstrak bahan aktif dengan lebih banyak walaupun menggunakan pelarut yang lebih sedikit. Hal ini sangat menguntungkan jika ditinjau dari segi kebutuhan energi, waktu dan ekonomi. Pada skala kecil, proses ini hanya dijalankan secara batch. Namun, proses ini akan lebih ekonomis jika dioperasikan secara kontinyu dengan skala menengah atau besar (30).

3. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali (sirkulasi) sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (25).

4. Infundasi

Infundasi adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infusa tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 90°C) selama waktu tertentu (15 menit). Hasil yang diperoleh berupa cairan infus yaitu sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C . Pembuatan campur simplisia dengan derajat halus yang sesuai dalam panci dengan air secukupnya, panaskan di atas tangas air selama 15 menit mulai suhu 90°C sambil sekali-sekali diaduk. Saring selagi panas melalui kain flanel, tambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume infus yang dikehendaki (25).

5. Dekokta

Pada maserasi metode dekokta, bagian tanaman yang berupa batang, kulit kayu, cabang, ranting, rimpang atau akar direbus dalam air mendidih dengan volume dan selama waktu tertentu kemudian didinginkan dan ditekan atau disaring untuk memisahkan cairan ekstrak dari ampasnya. Proses ini sesuai untuk mengekstrak bahan bioaktif yang dapat larut dalam air dan tahan terhadap panas. Rasio antara massa bagian tanaman dengan volume air biasanya 1:4 atau 1:16. Selama proses perebusan terjadi penguapan air perebus secara terus menerus, sehingga volume cairan ekstrak yang diperoleh biasanya hanya seperempat dari volume semula. Ekstrak yang pekat ini selanjutnya disaring dan segera digunakan atau diproses lebih lanjut (30).

6. Destilasi uap

Destilasi uap adalah ekstraksi untuk senyawa yang mudah menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian (25).

2.4 Standarisasi

Standarisasi adalah serangkaian parameter, prosedur dan cara pengukuran yang hasilnya merupakan unsur-unsur terkait seperti paradigma mutu yang memenuhi standar dan jaminan stabilitas obat (31). Standarisasi simplisia dan ekstrak secara kualitatif meliputi parameter non spesifik dan parameter spesifik ekstrak (32). Parameter spesifik dan non spesifik ekstrak yang terstandar mampu menunjukkan kualitas ekstrak tersebut dalam hal kandungan bahan aktif, dan kadar air. Parameter yang ditetapkan akan mampu menjadi acuan nasional dalam pembuatan baku bagi industri obat tradisional ataupun obat bahan alam lainnya (31).

Standarisasi dilakukan sebagai upaya peningkatan mutu dan keamanan produk yang diharapkan dapat lebih meningkatkan kepercayaan terhadap manfaat obat yang berasal dari bahan alam (33).

Parameter standarisasi ekstrak :

2.4.1 Parameter Spesifik

Identitas ekstrak meliputi deskripsi tata nama, nama ekstrak (generik, dagang dan paten), nama lain tumbuhan (sistematika botani), bagian tumbuhan yang digunakan (rimpang, daun dan sebagainya) dan nama Indonesia tumbuhan. Penetapan organoleptis ekstrak meliputi penggunaan panca indera mendeskripsikan bentuk, warna, bau dan rasa, guna pengenalan awal yang sederhana se-objektif mungkin. Penentuan kadar senyawa terlarut dalam pelarut tertentu (air dan etanol) dengan cara melarutkan ekstrak dengan pelarut (alkohol/air) untuk ditentukan jumlah larutan yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetrik. Identifikasi kandungan kimia ekstrak (24).

2.4.2 Parameter Non Spesifik

a. Susut Pengerinan

Merupakan gambaran batasan maksimal atau rentang besarnya senyawa yang hilang dalam proses pengeringan (24)

b. Kadar Air

Merupakan gambaran batasan maksimal atau rentang besarnya kadar air dalam bahan (24)

c. Kadar Abu total

Merupakan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak (34).

d. Kadar Abu tidak larut asam

Merupakan gambaran adanya kontaminasi mineral atau logam yang tidak larut asam dalam produk seperti silikat dalam pasir, perak, timbal, merkuri dan lain lain (34).

2.5 Kromatografi

2.5.1 Metode pemisahan Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia (analit) yang berdasarkan pada perbedaan migrasi/ distribusi masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam (*stationary phase*) dibawah pengaruh fase gerak (*mobile phase*), fase gerak dapat berupa gas atau zat cair dan fasa diam dapat berupa zat cair atau zat padat (35).

Metode pemisahan pada kromatografi sangat tergantung dari jenis fase diam yang digunakan. Jenis fase diam yang digunakan menentukan interaksi yang terjadi antara analit dengan fase diam dan fase gerak. Metode pemisahan pada kromatografi terbagi menjadi (36):

a. Pemisahan berdasarkan polaritas

Metode pemisahan berdasarkan polaritas, senyawa-senyawa terpisah karena perbedaan polaritas. Afinitas analit terhadap fase diam dan fase gerak tergantung kedekatan polaritas analit terhadap fase diam dan fase gerak (*like dissolve like*). Analit akan cenderung larut dalam fase dengan polaritas sama. Analit akan berpartisi diantara dua fase yaitu fase padat-cair dan fase cair-cair. Ketika analit berpartisi antara fase padat dan cair faktor utama pemisahan adalah adsorpsi. Sedangkan bila analit berpartisi antara fase cair dan fase cair, faktor utama pemisahan adalah kelarutan. Prinsip pemisahan dimana analit terpisah karena afinitas terhadap fase padat dan fase cair biasa disebut dengan adsorpsi dan metode kromatografinya biasa disebut kromatografi adsorpsi. Sedangkan prinsip pemisahan dimana analit terpisah karena afinitas terhadap fase cair dan fase cair disebut dengan partisi dan metode kromatografinya biasa disebut kromatografi cair (36).

b. Pemisahan berdasarkan muatan ion

Pemisahan berdasarkan muatan ion dipengaruhi oleh jumlah ionisasi senyawa, PH lingkungan dan keberadaan ion lain. Pemisahan yang disebabkan oleh kompetisi senyawa-senyawa dalam sampel dengan sisi resin yang bermuatan sehingga terjadi penggabungan ion-ion dengan muatan yang berlawanan disebut kromatografi penukar ion. Pemisahan yang terjadi karena perbedaan arah dan

kecepatan pergerakan senyawa-senyawa dalam sampel karena perbedaan jenis dan intensitas muatan ion dalam medan listrik disebut elektroforesis (36).

c. Pemisahan berdasarkan ukuran molekul

Ukuran molekul suatu senyawa mempengaruhi difusi senyawa-senyawa melewati pori-pori fase diam. Pemisahan terjadi karena perbedaan difusi senyawa-senyawa melewati pori-pori fase diam dengan ukuran pori-pori yang bervariasi. Senyawa dengan ukuran molekul besar hanya berdifusi ke dalam pori-pori fase diam yang berukuran besar, sedangkan senyawa dengan ukuran molekul kecil akan berdifusi ke dalam semua pori-pori fase diam, sehingga terjadi perbedaan kecepatan pergerakan molekul melewati fase diam. Senyawa dengan ukuran molekul besar memiliki kecepatan yang lebih besar dibanding senyawa dengan ukuran molekul kecil. Metode pemisahan ini biasa disebut dengan kromatografi permeasi gel (36).

d. Pemisahan berdasarkan bentukan spesifik

Pemisahan senyawa berdasarkan bentukan yang spesifik melibatkan ikatan kompleks yang spesifik antara senyawa sampel dengan fase diam. Ikatan ini sangat selektif seperti ikatan antara antigen dan antibodi atau ikatan antara enzim dengan substrat. Pemisahan ini biasa disebut dengan kromatografi afinitas. Fase diam KLT dengan sorben yang memiliki bentukan spesifik dengan selektifitas tinggi dalam bentuk lempeng siap pakai belum tersedia dipasaran (36).

2.5.2 Klasifikasi Kromatografi

Berdasarkan jenis fasa gerak yang digunakan, ada 2 (dua) klasifikasi dalam kromatografi, yaitu ; kromatografi gas dan kromatografi cairan. Pada kromatografi gas fasa geraknya berupa gas, sedangkan pada kromatografi cairan, fasa geraknya berbentuk cairan. Pada kromatografi gas, fasa diam ditempatkan di dalam sebuah kolom. Fasa diam ini dapat berupa suatu padatan atau suatu cairan yang didukung oleh butir-butir halus zat pendukung (36).

Berdasarkan fasa diam yaitu kromatografi gas padat (*Gas Solid Chromatography/GSC*) dan kromatografi gas-cair (*Gas Liquid Chromatography/GLC*). Pada kromatografi cairan, fasa diam dapat ditempatkan dalam sebuah kolom, maupun dibuat sebagai lapisan tipis diatas plat dari gelas

atau aluminium. Teknik ini disebut sebagai kromatografi lapisan tipis (*Thin Layer Chromatography/TLC*). Pada kromatografi cairan, sepotong kertas dapat digunakan sebagai fasa diam. Teknik ini dikenal sebagai kromatografi kertas. Kromatografi lapisan tipis dan kromatografi kertas diklasifikasikan sebagai kromatografi planar (datar) untuk membedakannya dari kromatografi yang menggunakan fasa diam di dalam sebuah kolom. Teknik kromatografi cairan dengan fasa diam di dalam kolom dikenal sebagai kromatografi cair-padat (*Liquid Solid Chromatography/LSC*) dan kromatografi cair-cair (*Liquid Liquid Chromatography/LLC*), tergantung dari fasa diamnya, suatu padatan atau cairan. Berdasarkan interaksi kromatografi dikenal kromatografi adsorpsi, partisi, kromatografi penukar ion dan kromatografi permeasi gel (37).

2.5.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT adalah yang metode kromatografi paling sederhana yang banyak digunakan. Peralatan dan bahan yang dibutuhkan untuk melaksanakan pemisahan dan analisis sampel dengan metode KLT cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup (*chamber*) yang berisi pelarut dan lempeng KLT. Dengan optimasi metode dan menggunakan instrumen komersial yang tersedia, pemisahan yang efisien dan kuantifikasi yang akurat dapat dicapai. Kromatografi planar juga dapat digunakan untuk pemisahan skala preparatif yaitu dengan menggunakan lempeng, peralatan, dan teknik khusus (36).

Pelaksanaan analisis dengan KLT diawali dengan menotolkan alikuot kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT), untuk membentuk zona awal. Kemudian sampel dikeringkan. Ujung fase diam yang terdapat zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal ataupun campuran dua sampai empat pelarut murni) di dalam *chamber*. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, campuran komponen-komponen sampel bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam. Hal ini disebut dengan pengembangan kromatogram. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan, fase diam diambil, fase gerak yang terjebak dalam lempeng dikeringkan, dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung (visual) atau di bawah sinar ultraviolet (UV) baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi

penampak noda yang cocok. Perbedaan migrasi merupakan hasil dari perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen dalam fase diam dan fase gerak (36).

Mekanisme pemisahan mempengaruhi kecepatan migrasi. Kecepatan migrasi komponen sampel tergantung pada sifat fisika kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel. Retensi dan selektivitas kromatografi juga ditentukan oleh interaksi antara fase diam, fase gerak dan komponen sampel yang berupa ikatan hidrogen, pasangan elektron donor atau pasangan elektron-akseptor (transfer karge), ikatan ionion, ikatan ion-dipol, dan ikatan van der waals (36).

Tahapan Metode Analisis KLT (36):

1. Preparasi sampel

Sebelum melakukan preparasi sampel terlebih dahulu ditentukan jenis sampel dan sifat fisika kimia analit yang akan dianalisis. Jenis sampel terbagi menjadi :

a. Sampel larutan jernih

Preparasi sampel larutan jernih lebih mudah dibandingkan jenis sampel yang lain yaitu dengan mengencerkan sampel dengan pelarut yang sesuai yaitu yang mudah menguap yang dapat melarutkan sampel dan sebisa mungkin sedikit melarutkan matrik. Pelarut pada metode KLT sebaiknya menggunakan pelarut yang mudah menguap karena akan memudahkan penguapan pelarut saat aplikasi (penotolan) sampel.

b. Sampel larutan keruh

Preparasi larutan keruh dilakukan dengan mengekstraksi analit dengan pelarut yang dapat melarutkan analit dengan cara manual (dikocok) atau menggunakan alat yaitu vorteks atau *ultrasonic degaser*. Penarikan analit dengan cara ekstraksi harus dipastikan bahwa analit sudah terekstraksi sempurna. Pemastian kesempurnaan ekstraksi dapat dilakukan dengan cara ekstraksi berulang atau dengan menganalisis sisa (ampas) hasil ekstraksi.

c. Sampel semisolid (setengah padat)

Preparasi sampel semisolid dilakukan dengan cara penghancuran sampel dengan cara digerus atau diblender. Sampel yang telah dihancurkan diekstraksi dengan pelarut yang dapat melarutkan analit dengan cara manual (dikocok) atau menggunakan alat dengan menggunakan vorteks atau *ultrasonic degaser*.

d. Sampel padat.

Preparasi sampel padat dilakukan dengan cara menyerbuk sampel dengan cara digerus atau diblender. Serbuk diekstraksi dengan pelarut yang dapat melarutkan analit dengan cara manual (dikocok) atau menggunakan alat yaitu vorteks atau *ultrasonic degaser*.

2. Penanganan Lempeng KLT

Sebelum menggunakan lempeng KLT, pastikan dulu jenis lempeng yang digunakan (dapat dilihat di macam sorben) sehingga tidak terjadi kesalahan penanganan lempeng. Lempeng KLT bersifat rapuh dan harus ditangani dengan benar mulai dari pembukaan kemasan sampai ke tahap dokumentasi.

3. Penanganan Eluen

Pemilihan eluen merupakan faktor yang paling berpengaruh pada sistem KLT. Eluen dapat terdiri dari satu pelarut atau campuran dua sampai enam pelarut. Campuran pelarut harus saling sampur dan tidak ada tanda-tanda kekeruhan.

Fungsi eluen dalam KLT :

- Untuk melarutkan campuran zat
- Untuk mengangkat atau membawa komponen yang akan dipisahkan melewati sorben fase diam sehingga noda memiliki R_f dalam rentang yang dipersyaratkan
- Untuk memberikan selektivitas yang memadai untuk campuran senyawa yang akan dipisahkan.

Eluen juga harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

- Memiliki kemurnian yang cukup,
- Stabil,
- Memiliki viskositas rendah,
- Memiliki partisi isothermal yang linier,
- Tekanan uap yang tidak terlalu rendah atau tidak terlalu tinggi,
- Toksisitas serendah mungkin.

Pemilihan eluen yang cocok dapat dilakukan melalui tahapan optimasi eluen. Optimasi eluen diawali dengan menentukan sifat fisika kimia analit yang akan dianalisis dan jenis sorben fase diam yang digunakan.

4. Penanganan Chamber

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam penanganan chamber adalah kondisi chamber dan jenis chamber. Chamber harus dipastikan dalam kondisi bersih (bebas dari kotoran) dan kering (bebas dari adanya air). Adanya kotoran dan air dalam chamber akan mengganggu kromatogram yang dihasilkan dan mempengaruhi pemisahan KLT.

5. Aplikasi Sampel

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Sebagaimana dalam prosedur kromatografi yang lain, jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Aplikasi sampel pada sorben lempeng KLT dapat dilakukan secara manual dengan peralatan sederhana dan dapat juga dengan peralatan otomatis. Semakin tepat posisi penotolan dan kecepatan penotolan semakin baik kromatogram yang dihasilkan. Aplikasi sampel secara otomatis dapat memperbaiki kualitas penotolan sampel.

6. Evaluasi Noda

Evaluasi lempeng KLT dapat dilakukan secara langsung maupun dengan instrumen. Untuk noda yang berwarna evaluasi noda dapat dilakukan dengan visualisasi langsung pada lempeng KLT dengan menggunakan cahaya matahari, atau dapat dibantu dengan menggunakan lampu UV yang memberikan pencahayaan pada panjang gelombang tertentu.

Untuk noda yang tidak berwarna beberapa jenis visualisasi dari zona kromatografi diperlukan untuk mengevaluasi noda hasil kromatografi. Sebagian besar senyawa akan menyerap sinar UV atau sinar tampak atau fluoresensi tetapi beberapa senyawa membutuhkan visualisasi yang sesuai untuk mengamati noda hasil kromatografi. Visualisasi dapat dilakukan dengan cara penyemprotan atau pencelupan ke dalam pereaksi penampak noda.

2.5.4 KLT - Densitometri

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) - Densitometer (*TLC Scanner*) merupakan instrumen pengukur densitas bercak hasil pemisahan kromatografi lapis tipis. Instrumen dilengkapi dengan suatu perangkat optik, sumber cahaya dan detektor seperti halnya spektrofotometer (38)

Keuntungan utama analisis secara KLT-densitometri adalah memerlukan waktu lebih singkat dan lebih murah biaya operasionalnya dibandingkan KCKT serta metode pemisahannya lebih sederhana dan mampu menghasilkan pemisahan yang akurat untuk senyawa-senyawa yang tidak volatil dengan konsentrasi sangat kecil (dalam satuan mikro/semimikro) (39). Metode densitometer ada dua yaitu metode reflektan (remisi) dan transmitan. Metode reflektan bisa digunakan pada rentang spektral UV/Vis, fluoresensi dan peredaman fluoresensi. Spektral visual (400-800 nm) menggunakan lampu halogen dan tungsten, sedangkan pada spektral UV (190-400 nm) menggunakan lampu deuterium dan xenon. Untuk spektral fluoresensi digunakan lampu merkuri (36).

Densitometri merupakan metode analisis instrumental penentuan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT. Metode ini biasa disebut metode KLT Densitometri. Penentuan kualitatif analit KLT-Densitometri dilakukan dengan cara membandingkan nilai R_f analit dan standar. Dari noda analit yang memiliki R_f sama dengan standar diidentifikasi kemurnian analit dengan cara membandingkan spektrum densitometri analit dan standar. Sedangkan penentuan kuantitatif analit dilakukan dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standart pada fase diam yang diketahui konsentrasinya atau menghitung densitas noda analit dan membandingkannya dengan densitas noda standar (36).

Interaksi radiasi elektromagnetik (REM) merupakan intensitas cahaya yang mengenai molekul senyawa dalam noda. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada fase diam KLT menentukan intensitas cahaya yang diabsorpsi, ditransmisi, dipantulkan (refleksi) oleh noda analit dari intensitas REM semula. Apabila pada fase diam tidak ada noda, maka cahaya yang jatuh akan dipantulkan kembali. Tetapi jika cahaya tersebut dijatuhkan pada pelat yang terdapat noda dari

suatu senyawa, maka sebagian cahaya akan diserap dan intensitas yang dipantulkan akan berbeda dengan intensitas cahaya yang datang (36).

Sumber radiasi yang digunakan dapat dipilih yaitu sinar UV (lampu deuterium), sinar VIS (lampu tungsten) dan sinar fluoresensi (lampu merkuri). Sinar yang dipancarkan berupa sinar polikromatik masuk melewati celah monokromator. Didalam monokromator sinar didispersikan menjadi sinar monokromatik dengan teknik grating. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih keluar melalui celah keluar monokromator. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih dipantulkan melalui cermin sehingga mengenai objek (lempeng KLT). Sinar yang datang dapat direfleksikan maupun diteruskan. Sinar yang direfleksikan atau diteruskan ditangkap oleh pengganda foton (photomultiplier) berfungsi menggandakan sinar yang datang sehingga dihasilkan elektron yang terbaca oleh sistem computer sebagai data output (36).

2.5 Spektrofotometri (40)

Spektrofotometer UV-Vis adalah pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diabsorpsi oleh sampel. Sinar ultraviolet dan cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk mempromosikan elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Spektroskopi UV-Vis biasanya digunakan untuk molekul dan ion anorganik atau kompleks di dalam larutan. Spektrum UV-Vis mempunyai bentuk yang lebar dan hanya sedikit informasi tentang struktur yang bisa didapatkan dari spectrum ini. Tetapi spektrum ini sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer. Sinar ultraviolet berada pada panjang gelombang 200-400 nm sedangkan sinar tampak berada pada panjang gelombang 400-800 nm.

Sebagai sumber cahaya biasanya digunakan lampu hidrogen atau deuterium untuk pengukuran UV dan lampu tungsten untuk pengukuran pada cahaya tampak. Panjang gelombang dari sumber cahaya akan dibagi oleh pemisah panjang gelombang (*wavelength separator*) seperti prisma atau monokromator.

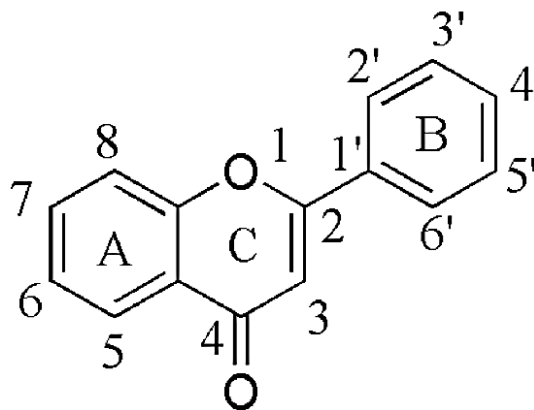
Spektrum didapatkan dengan cara scanning oleh wavelength separator sedangkan pengukuran kuantitatif bisa dibuat dari spektrum atau pada panjang gelombang tertentu.

Beberapa istilah penting dalam spektrofotometri :

- Kromofor; merupakan gugus tak jenuh (pada ikatan kovalen) yang bertanggung jawab terhadap terjadinya absorpsi elektronik (misalnya C=C, C=O, dan NO₂).
- Auksokrom; merupakan gugus jenuh dengan adanya elektron bebas (tidak terikat), dimana jika gugus ini bergabung dengan kromofor, akan mempengaruhi panjang gelombang dan intensitas absorban.
- Pergeseran Batokromik; merupakan pergeseran absorban ke daerah panjang gelombang yang lebih panjang karena adanya substitusi atau efek pelarut.
- Pergeseran Hipsokromik; merupakan pergeseran absorban ke daerah panjang gelombang yang lebih pendek karena adanya substitusi atau efek pelarut.
- Efek Hiperkromik; merupakan peningkatan intensitas absorban.
- Efek Hipokromik; merupakan penurunan intensitas absorban.

2.6 Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa yang tersebar secara luas di alam. Flavonoid memiliki bioaktivitas sebagai anti-virus / bakteri, anti-inflamasi, kardioprotektif, anti diabetes, anti kanker, anti penuaan dan lainnya. Hingga saat ini, lebih dari 9000 flavonoid telah teridentifikasi dengan kadar dan bioaktivitas yang spesifik (41).



Gambar 2.2. Kerangka flavonoid (41)

Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa phenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆ (Gambar 2). Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi, cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub-sub kelompoknya. Sistem penomoran digunakan untuk membedakan posisi karbon di sekitar molekulnya (42). Flavonoid merupakan senyawa polar, maka flavonoid akan larut baik dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilformamida dan lain-lain. Karena flavonoid terikat dalam bentuk glikosida maka campuran pelarut tersebut diatas dengan air merupakan pelarut yang baik untuk flavonoid glikosida. Sedangkan dalam bentuk aglikon seperti flavon, flavonol, flavanon lebih mudah larut dalam pelarut kloroform dan eter (43).

Secara tradisional, flavonoid diklasifikasikan dengan tingkat oksidasi, annularitas cincin C, dan sambungan posisi cincin B. Klasifikasi flavonoid diantaranya :

1. Flavonol dan Flavon

Flavonol banyak tersebar dalam tumbuhan baik sebagai pigmen antosianin dalam petal maupun dalam daun tumbuhan tingkat tinggi. Flavonol umumnya terdapat dalam bentuk glikosida dalam bentuk umum seperti kaemferol, kuersetin dan mirisetin. Rutin adalah jenis glikosida kuersetin yang paling banyak ditemui. Perbedaan antara flavon dan flavonol adalah pada flavon tidak ditemukannya gugus hidroksil pada atom C-3. Flavon yang sering dijumpai adalah apigenin dan luteolin (43).

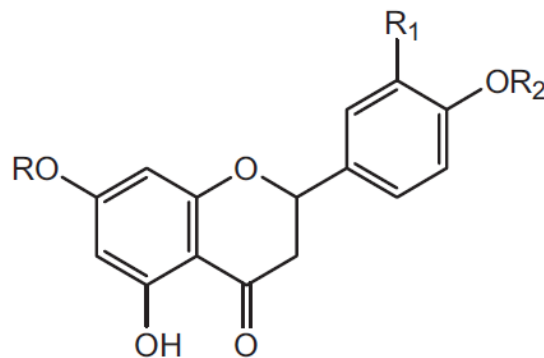
2. Flavanon

Flavanon adalah senyawa yang tanberwarna yang tak dapat dideteksi pada pemeriksaan kromatografi kecuali bila menggunakan penyemprot kromogen. Flavanon dan Calkon adalah dua jenis flavonoid yang isomerik dan jenis yang satu mudah diubah menjadi jenis yang lain. Falvanon biasanya lebih mudah terbentuk dalam suasana asam sedangkan kalkon lebih mudah didapatkan dalam suasana basa. 7-O-methylnaringenin juga dikenal sebagai sakuranetin adalah flavanon kiral yang ada dalam nasi (*Oryza sativa* L.) (43).

3. Isoflavon

Isoflavonoid adalah subgrup flavonoid yang sangat khas yang terjadi secara signifikan pada kedelai dan tanaman polong lainnya. Mereka ditemukan memainkan peran penting sebagai prekursor perkembangan phytoalexin selama interaksi mikro tanaman. Beberapa isoflavon seperti daidzein memberikan warna biru muda dengan sinar UV bila diuapi amonia tapi genistein tampak seperti bercak lemayung pudar yang dengan amonia berubah menjadi coklat pudar (43).

2.6.1 Flavanon Pada Jeruk



Gambar 2.3. Struktur Flavanon (44)

Keterangan :

Eriocitrin (ERC) : R= rutinose, R₁= OH, R₂= H

Neoeriocitrin (NER) : R= neohesperidose, R₁=OH, R₂= H

Narrirutin (NRT) : R= rutinose, R₁= R₂= H

Naringin (NRG) : R=neohesperidose , R₁=R₂=H

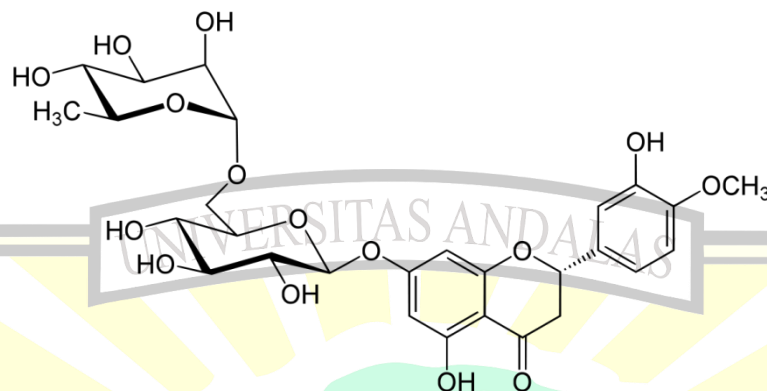
Hesperidin (HSP) : R=rutinose, R₁=OH, R₂=Me

Neohesperidin (NHP) : R=neohesperidose, R₁=OH, R₂=Me

Neoponcirin (NPO) : R=rutinose, R₁=H, R₂=Me

Poncirin (PON) : R=neohesperidose, R₁=H, R₂=Me (44).

Hesperidin

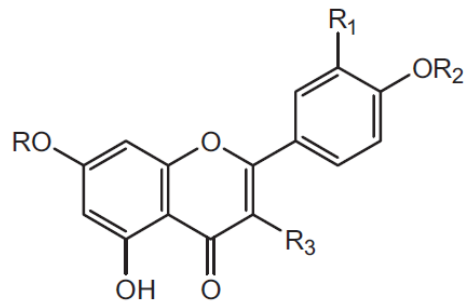


Gambar 4. Struktur Hesperidin (45)

Berat molekul : 610,57 Da
Rumus Molekul : C₂₈H₃₄O₁₅
Nama IUPAC : (2S)-5-hidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-2,3-dihydrochromen-4-one.

Secara kimia, hesperidin merupakan flavonoid jenis flavon yang terdiri dari aglikon (bentuk kekurangan gula), hesperitin, dan gula rutinosa (hesperetin-7-rutinosa) (46). Hesperidin memiliki aktivitas antimikroba, antikarsinogenik, perlindungan terhadap sinar UV, proteksi radiasi (47), meningkatkan tonus vena, analgesik, menurunkan lipid darah, untuk pengobatan wasir, mengatasi insufisiensi vena kronis (48), sebagai antioksidan dan antiinflamasi dengan dosis (100, 200 mg/Kg) (45), anti kanker, serta anti mikroba (49). Bersama dengan vitamin C, hesperidin dapat mengatasi gangguan aliran darah, misalnya *hot flashes* pada kasus *menopause*, melakukan perbaikan pada kram kaki, mengatasi pendarahan hidung dan kecenderungan kulit menjadi memar (50).

2.6.2 Flavon Pada Jeruk

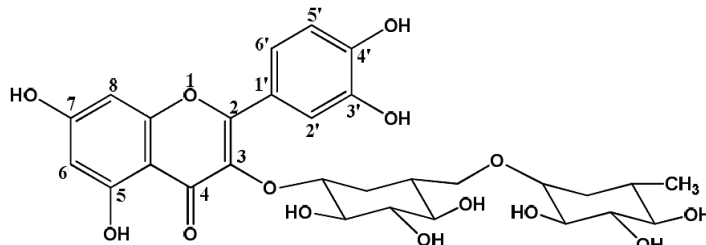


Gambar 2.5. Struktur Flavon

Keterangan :

- Rutin (RTN) : R= H, R₁= OH, R₂= H, R₃ = O-rutinose
Isorhoifolin (IRF) : R= rutinose, R₁= R₂= R₃ = H
Rhoifolin (RFN) : R= neohesperidose, R₁= R₂= R₃ = H
Diosmin (DSM) : R= rutinose, R₁=OH, R₂= Me, R₃ = H
Neodismin (NDM) : R= neohesperidose, R₁=OH, R₂= Me, R₃ = H(44).

Rutin



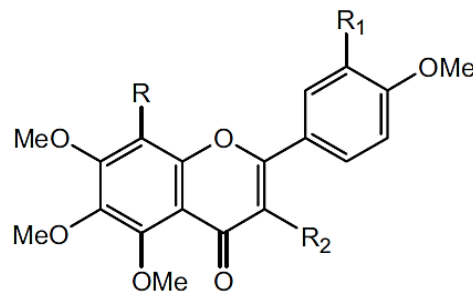
Gambar 2.6. Struktur Rutin (51)

- Berat molekul : 610,57 Da
Rumus Molekul : C₂₈H₃₄O₁₅ (52)
Nama Lain : 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rhamnoglucoside (53).

Rutin adalah flavonoid milik subkelas flavonol yang memiliki disakarida (glukosa + rhamnose) terkait ke posisi 3 dari cincin pyran. Itu ditemukan dalam banyak sumber makanan seperti bawang, anggur, soba, kacang-kacangan, apel, tomat, serta minuman seperti anggur merah dan teh hitam (54). Rutin dapat dengan mudah terdegradasi oleh hidrolisis menjadi aglikonnya yaitu quersetin.

Kelarutan senyawa rutin diberbagai pelarut telah banyak dilakukan, rutin lebih larut dalam etanol murni dibandingkan dengan etanol:air (50:50) (55). Aktivitas farmakologis rutin termasuk: anti alergi, anti-inflamasi dan pelebaran darah pembuluh, anti-kanker, anti-bakteri dan anti-virus. Secara klinis untuk pengobatan purpura alergi dan berbagai peningkatan kerapuhan kapiler yang disebabkan oleh gangguan pendarahan, juga digunakan untuk mengobati tekanan darah tinggi dan bronkitis pikun (51).

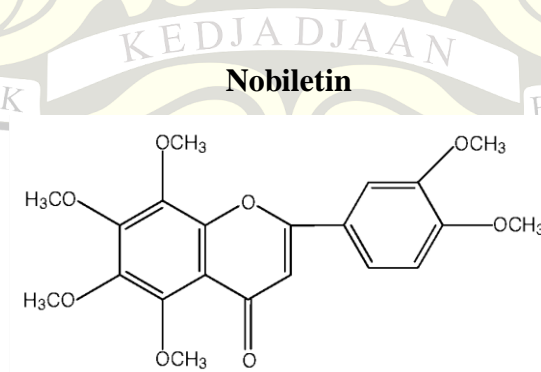
2.6.3 Polymethoxylated Flavon Pada Jeruk



Gambar 7. Struktur Polymethoxylated flavon

Keterangan :

Sinensetin (SNT)	: R= H, R ₁ = OMe, R ₂ = H
Nobiletin (NOB)	: R= R ₁ = OMe, R ₂ = H
Tangeretin (TNG)	: R= OMe, R ₁ = R ₂ = H
Heptamethoxy flavone (HPM)	: R= R ₁ =R ₂ = OMe (44)



Gambar 8. Struktur Nobiletin (56)

Berat molekul : 402.39 Da (57)
Rumus Molekul : C₂₁H₂₂O₈
Nama Lain : 5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone (57)
Kelarutan : 0.5 mg/ml dalam 1:1 larutan of DMF:PBS (pH 7.2), 0.3 mg/ml dalam EtOH, 10 mg/ml dalam DMSO, 15 mg/ml dalam DMF (58).

Nobiletin adalah salah satu senyawa polymethoxyflavones (PMF) tidak beracun yang diisolasi dari buah jeruk. Struktur Kristal pada nobiletin menunjukkan bahwa kromen dan cincin arene hampir di bidang yang sama. Atom-atom C dari dua metoksi kelompok di cincin arene juga berada di bidang yang sama, sedangkan atom C dari empat kelompok metoksi yang terhubung ke cincin kromen tidak paralel. Karakteristik konformal struktur kiral ini ditunjukkan oleh rotasi ikatan kovalen antara arene dan cincin chromene dan konformasi dari kelompok metoksi. Keaktifan suatu senyawa tergantung pada strukturnya dan metabolismenya. Tanpa bagian glikosida, NOB mudah diserap, karena sifat lipofiliknya yang tinggi dan permeabilitas yang tinggi yang menunjukkan mekanisme spesifik (57). Nobiletin memiliki efektivitas sebagai anti virus, antiinflamasi (8), antikolesterol (59,60), antibakteri (10), antidiabetes, neuroprotektif, serta anti teratogenik dan anti kanker (57).

2.7 Uji Antibakteri

Antibiotika adalah bahan kimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan atau mematikan mikroorganisme (61).

2.7.1 Penggolongan antibiotika :

1. Berdasarkan spektrum aktivitasnya (61)

Berdasarkan spektrum aktivitasnya, antibiotika dibagi menjadi dua yaitu antibiotika spektrum luas dan antibiotika spektrum sempit. Antibiotika spektrum luas merupakan antibiotika yang efektif terhadap bakteri gram positif dan gram negatif.

- a. Adapun obat-obat yang tergolong dalam antibiotika spektrum luas diantaranya adalah tetrasiklin, amfenikol, aminoglikosida, makrolida, rifampisin, ampisilin, amoksisilin, bakampisilin, karbenisilin, hetasilin, pivampisilin, sulbenisilin, tikarsilin, dan sebagian sefalosporin. Adapun antibiotika spektrum sempit merupakan antibiotika yang efektif hanya pada bakteri gram positif atau bakteri gram negatif saja.
 - b. Antibiotika yang efektif terhadap bakteri gram negatif yakni kolistin, polimiksin B sulfat, sulfomisin.
 - c. Antibiotika yang efektif terhadap *mycobacteriaceae* yakni streptomisin, kanamisin, sikloserin, rifampisin, viomisin, kapreomisin.
 - d. Antibiotika yang efektif terhadap jamur yakni griseofulvin, nistatin, amfoterisin B dan kandisidin.
 - e. Antibiotika yang aktif terhadap neoplasma (antikanker) yakni aktinomisin, bleomisin, daunorubisin, doksorubisin, mitomisin, mitramisin.
2. Berdasarkan mekanisme kerja (61)
- a. Antibiotika yang menghambat sintesa dinding sel bakteri, contohnya penisilin, sefalosporin, karbapenem, vankomisin, basitrasin, fosfomisin dan isoniazid.
 - b. Antibiotika yang bekerja langsung pada membran sel bakteri, mempengaruhi permeabilitas membran dan menyebabkan kebocoran sel, contohnya polimiksin dan daptomisin.
 - c. Antibiotika yang menghambat pembentukan DNA/RNA, contohnya kuinolon dan rifampin.
 - d. Antibiotika yang menghambat pembentukan protein pada ribosom, contohnya eritromisin, klindamisin, sinercyd, pleuromutilin yang aktif pada ribosom sub unit 50S, aminoglikosida, gentamisin, streptomisin, tetrasiklin, glycylicyclin aktif pada ribosom sub unit 30S dan linezolid yang aktif baik pada ribosom 50S dan 30S.
 - e. Antibiotika yang menghambat sintesa asam folat di dalam sitoplasma contohnya sulfonamida dan trimetoprim.

3. Berdasarkan struktur kimianya (61)

Penggolongan antibiotika berdasarkan struktur kimianya dibagi menjadi enam kelompok yakni :

- a. Antibiotika β laktam
- b. Aminoglikosida
- c. Tetrasiklin
- d. Polipeptida
- e. Makrolida
- f. Linkomisin
- g. Lain-lain

2.7.2 Metode Uji Aktivitas Antibakteri

1. Metode Dilusi

Metode dilusi terdiri dari dua teknik pengerjaan, yaitu teknik dilusi perbenihan cair dan teknik dilusi agar yang bertujuan untuk penentuan aktivitas antimikroba secara kuantitatif, antimikroba dilarutkan kedalam media agar atau kaldu, yang kemudian ditanami bakteri yang akan dites. Setelah diinkubasi semalam, konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut dengan MIC (*minimal inhibitory concentration*). Nilai MIC dapat pula dibandingkan dengan konsentrasi obat yang didapat di serum dan cairan tubuh lainnya untuk mendapatkan perkiraan respon klinik (62).

a. Dilusi perbenihan cair

Dilusi perbenihan cair terdiri dari makrodilusi dan mikrodilusi. Pada prinsipnya pengerjaannya sama hanya berbeda dalam volume. Untuk makrodilusi volume yang digunakan lebih dari 1 ml, sedangkan mikrodilusi volume yang digunakan 0,05 ml sampai 0,1 ml. Antimikroba yang digunakan disediakan pada berbagai macam pengenceran biasanya dalam satuan $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi bervariasi tergantung jenis dan sifat antibiotik, misalnya sefotaksim untuk uji kepekaan terhadap *Streptococcus pneumoniae*, pengenceran tidak melebihi 2 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan untuk *Escherichia coli* pengenceran dilakukan pada 16 $\mu\text{g/ml}$ atau lebih. Secara umum untuk penentuan MIC, pengenceran antimikroba dilakukan penurunan konsentrasi setengahnya misalnya mulai dari

16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 µg/ml konsentrasi terendah yang menunjukkan hambatan pertumbuhan dengan jelas baik dilihat secara visual atau alat semiotomatis dan otomatis, disebut dengan konsentrasi daya hambat minimum/MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) (62).

b. Dilusi agar

Pada teknik dilusi agar, antibiotik sesuai dengan pengenceran akan ditambahkan ke dalam agar, sehingga akan memerlukan perbenihan agar sesuai jumlah pengenceran ditambah satu perbenihan agar untuk kontrol tanpa penambahan antibiotik, konsentrasi terendah antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri merupakan MIC antibiotik yang diuji. Salah satu kelebihan metode agar dilusi untuk penentuan MIC *Neisseria gonorrhoeae* yang tidak dapat tumbuh pada teknik dilusi perbenihan cair (62).

2. Metode Difusi

Cakram kertas, yang telah dibubuhkan sejumlah tertentu antimikroba, ditempatkan pada media yang telah ditanami organisme yang akan diuji secara merata. Tingginya difusi dari cakram dan pertumbuhan organisme uji dihambat penyebarannya sepanjang difusi antimikroba (terbentuk zona jernih disekitar cakram), sehingga bakteri tersebut merupakan bakteri yang sensitif terhadap antimikroba. Ada hubungan persamaan yang hampir linear (berbanding lurus) antara log MIC, seperti yang diukur oleh metode dilusi dan diameter zona daya hambat pada metode difusi (62).

2.7.3 Bakteri uji

1. *Staphylococcus aureus*

Bakteri berbentuk menyerupai bola dengan garis tengah $\pm 1 \mu\text{m}$ tersusun dalam kelompok-kelompok tidak teratur (menyerupai buah anggur), dapat pula tersusun empat-empat (tetrad), membentuk rantai (3-4 sel), berpasangan atau satu-satu. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk kokus. *Staphylococcus* mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik dan merupakan substansi penting di dalam struktur dinding sel. Peptidoglikan merupakan suatu polimer polisakarida yang mengandung subunit-subunit yang tergabung, merupakan eksoskeleton yang kaku pada dinding sel. Peptidoglikan

dirusak oleh asam kuat atau lisozim. Hal tersebut penting dalam patogenesis infeksi, yaitu merangsang pembentukan interleukin-1 (pirogen endogen) dan antibodi opsonik, juga dapat menjadi penarik kimia (kemotaktan) leukosit polimorfonuklear, mempunyai aktifitas mirip endotoksin dan mengaktifkan komplemen (63). Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi kulit ringan, keracunan makanan sampai dengan infeksi sistemik. Infeksi kulit yang biasanya disebabkan oleh *S. aureus* yaitu impetigo, selulitis, folikulitis, abses, dan yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, infeksi saluran kemih, dan endokarditis. *Staphylococcus aureus* juga merupakan penyebab utama sindrom syok toksik (64).

2. *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *Pseudomonas* memiliki karakteristik seperti, gram negatif, berbentuk batang (rods) atau kokus (coccus), aerob obligat, motil mempunyai flagel polar. Bakteri ini, oksidase positif, katalase positif, nonfermenter dan tumbuh dengan baik pada suhu 4°C atau dibawah 43°C. *Pseudomonas* banyak ditemukan pada tanah, tanaman dan air. Beberapa spesies *Pseudomonas* seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas stutzeri* dan lain-lain (44). Bakteri ini banyak menginfeksi penderita di rumah sakit dengan predisposisi tertentu. *P.aeruginosa* mempunyai fili tipe IV yang berfungsi sebagai adhesin untuk mengikat sel host. *P.aeruginosa* dapat melakukan adhesi dan kolonisasi pada bermacam-macam tipe sel dari epitel sel bukal, paru, ginjal dan sel endotel (45).

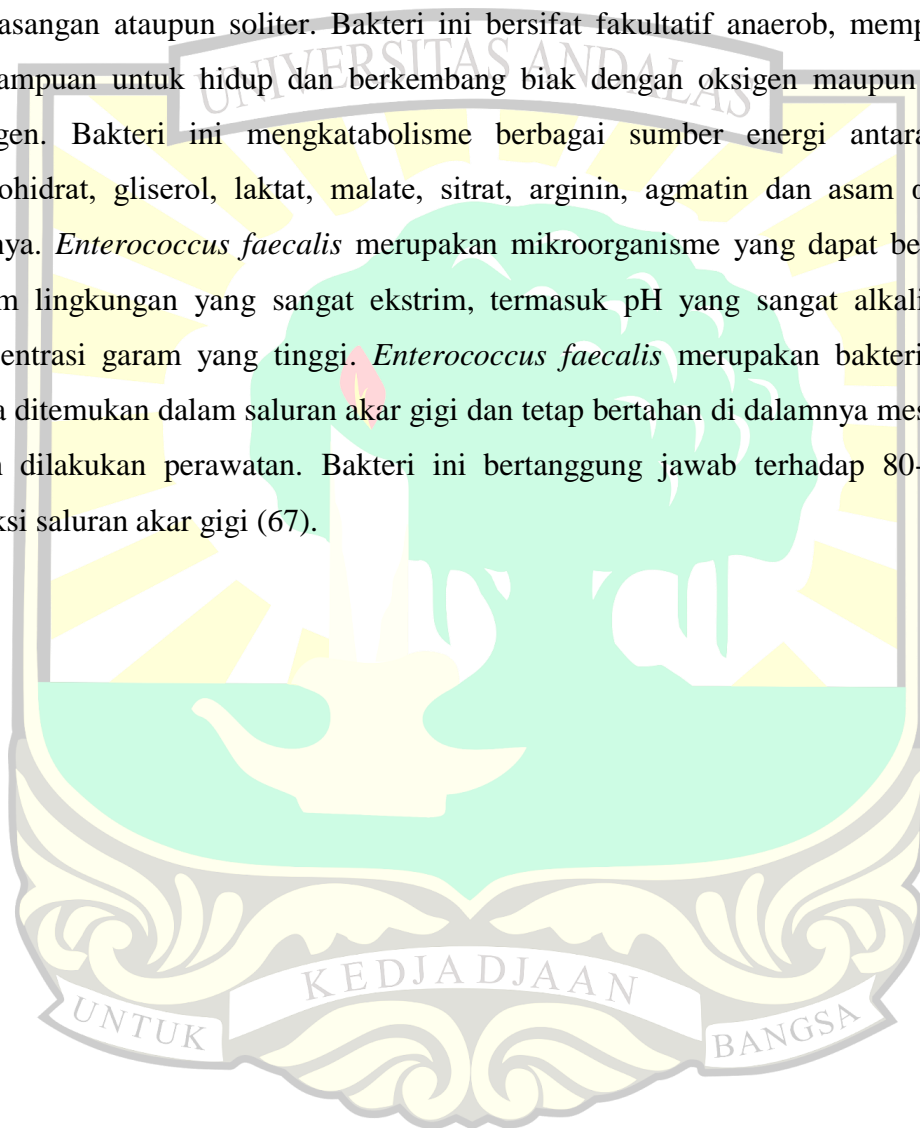
3. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek, tumbuh baik pada Mac Conkey Agar (MCA) dengan koloni berbentuk bulat dan cembung, bersifat memfermentasikan laktosa. *Escherichia coli* memiliki panjang sekitar 2 µm, diameter 0,7 µm, lebar 0,4-0,7 µm, dan bersifat anaerob fakultatif. *Escherichia coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (65). *E.coli* adalah kuman oportunistis yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Sifatnya unik karena merupakan flora normal namun dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare pada anak, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi

pada jaringan tubuh lain di luar usus. Bakteri *E.coli* yang berada di dalam usus besar manusia berfungsi untuk menekan pertumbuhan bakteri jahat, dia juga membantu dalam proses pencernaan (66).

4. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis merupakan bakteri kokus gram positif berbentuk ovoid berdiameter antara 0,5 – 1 um yang dapat berkoloni secara rantai, berpasangan ataupun soliter. Bakteri ini bersifat fakultatif anaerob, mempunyai kemampuan untuk hidup dan berkembang biak dengan oksigen maupun tanpa oksigen. Bakteri ini mengkatabolisme berbagai sumber energi antara lain karbohidrat, gliserol, laktat, malate, sitrat, arginin, agmatin dan asam α keto lainnya. *Enterococcus faecalis* merupakan mikroorganisme yang dapat bertahan dalam lingkungan yang sangat ekstrim, termasuk pH yang sangat alkalis dan konsentrasi garam yang tinggi. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri yang biasa ditemukan dalam saluran akar gigi dan tetap bertahan di dalamnya meskipun telah dilakukan perawatan. Bakteri ini bertanggung jawab terhadap 80-90 % infeksi saluran akar gigi (67).



BAB III

METODA PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus 2019 hingga Juli 2020 di Laboratorium Biota Sumatera dan Laboratorium Sentral Farmasi Universitas Andalas.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan untuk pengerjaan standardisasi, ekstraksi, penetapan kadar nobiletin, dan uji antibakteri adalah peralatan *rotary evaporator* (Buchi[®]), sonikator, timbangan analitik, tabung reaksi, kurs, cawan penguap, desikator, bejana kromatografi, alumunium foil, mikroskop, cover dan kaca objek, kertas saring (WhatmanTM), lampu UV 254 dan 366 nm, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu[®]), blender, oven (Memmert[®]), furnace (1500 furnace Barnstead thermolyne[®]), pipet mikro (Biokit proline[®]), pinset, *Laminar Air Flow* (LAF) (Biobase[®]), kertas cakram, autotoklaf (All American[®]), *TLC Scanner*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, jarum ose, jangka sorong, cawan petri, benang jagung, batang, kapas, kain kasa, vortex (Etech[®]), plastik wrap, lampu spiritus, botol semprot, alat gelas standar laboratorium lainnya.

3.2.2 Bahan

Kulit buah segar limau sundai, pelarut etanol (Merck[®]), aquades, nobiletin, asam klorida, kloroform (Merck[®]), toluen (Merck[®]), kloralhidrat, etil asetat, silika gel, *Nutrient Agar* (NA) (Merck[®]), NaCl fisiologis, larutan *Mc Farland*, Dimetil sulfoksida (DMSO), aquadest steril, sitroborat, NaCl fisiologis steril.

3.2.3 Mikroba Uji

Mikroba yang digunakan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, dan

Pseudomonas auruginosa ATCC 27853. Diperoleh dari stok di Laboratorium Biota Sumatera Universitas Andalas, Padang.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Pengambilan Sampel

Buah limau sundai diambil dari tiga wilayah penghasil yang berbeda yaitu Kota Pariaman, Bukittinggi dan Kota Solok Sumatera Barat.

3.3.2 Identifikasi Sampel

Identifikasi tanaman dilakukan untuk memastikan jenis tanaman yang digunakan untuk penelitian. Identifikasi dilakukan di Herbarium Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas.

3.3.3 Penyiapan Sampel

3.3.3.1 Penyiapan Simplisia

Sampel yang digunakan adalah kulit buah segar limau sundai berupa bagian lapisan terluar dari buah hingga bagian yang bersentuhan dengan daging buah. Penyiapan simplisia kulit buah limau sundai dilakukan dengan cara sortasi basah untuk memisahkan kotoran atau bahan-bahan asing. Kemudian dilakukan proses pengeringan menggunakan oven dengan suhu sekitar 45°C selama lebih kurang 2 hari. Selanjutnya sampel kering diserbukkan dengan menggunakan mesin penggiling (blender).

3.3.3.2 Penyiapan Ekstrak

Serbuk simplisia kulit buah limau sundai diekstraksi dengan metoda maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Etanol ditambahkan dengan perbandingan 1: 10 dengan simpisia (24). Selama 6 jam pertama sampel sekali-kali diaduk, kemudian didiamkan hingga 18 jam. Maserat disaring dengan kertas saring. Proses penyarian diulangi sekurang-kurangnya dua kali dengan menggunakan pelarut yang sama. Semua maserat dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

3.3.4 Perhitungan Randemen

Randemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara randemen dengan bobot simplisia yang digunakan (68).

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Berat sampel yang digunakan (g)}} \times 100\%$$

3.3.5 Standardisasi Simplisia

3.3.5.1 Parameter Spesifik

a. Pemeriksaan Makroskopik

Menggunakan panca indra untuk mendeskripsikan bentuk, warna dan bau.

b. Pemeriksaan Secara Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik untuk mengidentifikasi fragmen pengenal serbuk simplisia dengan menggunakan mikroskop. Pemeriksaan mikroskopik menggunakan pereaksi aquadest dan kloralhidrat dengan perbesaran 400x.

c. Penetapan Kadar Sari Larut Air

Serbuk simplisia sebanyak lebih kurang 5 g yang telah dikeringkan di udara. Dimasukkan ke dalam labu tersumbat, tambahkan 100 mL air jenuh kloroform, kocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan biarkan selama 18 jam. Kemudian saring dan uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditara pada suhu 105°C hingga bobot tetap (33).

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{\text{Berat sari air (g)}}{\text{Berat serbuk simplisia (g)}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

d. Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Serbuk simplisia sebanyak lebih kurang 5 g yang telah dikeringkan di udara. Masukkan ke dalam labu tersumbat, tambahkan 100 mL etanol, kocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan biarkan selama 18 jam. Kemudian saring dan uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditara pada suhu 105°C hingga bobot tetap (33).

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{\text{Berat sari etanol (g)}}{\text{Berat serbuk simplisia (g)}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

3.5.5.2 Parameter Non Spesifik

a. Susut Pengerinan

Serbuk simplisia sebanyak 1-2 g dimasukkan ke dalam botol timbang yang telah ditara. Ratakan serbuk simplisia yang berada dalam botol dengan ketebalan 5-10 mm kemudian ditimbang . Lalu dikeringkan pada suhu 105°C dalam keadaan wadah terbuka dengan menggunakan oven hingga bobot tetap. Dinyatakan bobot tetap apabila penimbangan dua kali berturut-turut setelah dikeringkan atau dipijar selama satu jam tidak lebih dari 0,25% (33).

$$\text{Susut pengerinan} = \frac{(\text{Berat sebelum pengeringan} - \text{Berat sesudah pengeringan})(g)}{\text{Berat sebelum pengeringan}(g)} \times 100\%$$

b. Penetapan Kadar Abu Total

Serbuk simplisia sebanyak 2-3 g dimasukkan ke dalam kurs yang telah ditara, kemudian pijar sampel sampai arang habis. Jika arang tidak bisa dihilangkan, cuci dengan air panas dan saring dengan kertas saring bebas abu. Filtrat dan kertas saring masukan dalam kurs yang sama, kemudian pijar dengan suhu 800±25⁰C hingga bobot tetap. Dinginkan dalam desikator dengan keadaan wadah tertutup dan timbang abu yang telah di peroleh dari pemijaran. Kadar abu dinyatakan dalam %b/b (33).

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{Berat abu (g)}}{\text{Berat awal simplisia}(g)} \times 100\%$$

c. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit. Kumpulkan bagian yang tidak larut asam, saring menggunakan kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijar abu dengan suhu 800±25⁰C hingga bobot tetap. Kadar abu tidak larut asam dinyatakan dalam %b/b (33).

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{Berat abu tidak larut asam (g)}}{\text{Berat awal serbuk simplisia (g)}} \times 100\%$$

3.3.6 Standardisasi Ekstrak

3.3.6.1 Parameter Spesifik

a. Pemeriksaan Organoleptik

Menggunakan panca indra untuk mendeskripsikan bentuk, warna, dan rasa dari ekstrak (68).

b. Pola Kromatogram

Bahan yang digunakan pada pengerjaan ini yaitu lempeng silika gel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam, larutan uji berupa ekstrak yang dilarutkan dengan metanol. Untuk larutan perbandingan digunakan nobiletin yang dilarutkan dalam etil asetat, lalu dielusi dengan fase gerak kloroform : etil asetat (7 : 3), dan beberapa tetes asam format. Deteksi dilakukan dibawah lampu UV 254 dan 365 nm, dan dengan bantuan pereaksi semprot yang sesuai untuk deteksi senyawa flavonoid yaitu sitro borat, warna atau fluoresensi yang terbentuk adalah fluoresensi kuning kuning kehijauan dibawah sinar UV 365 nm. Kemudian dilanjutkan pemanasan 100⁰C selama 1-5 menit, setelah itu diamati dibawah sinar UV 365 nm berfluoresensi kuning-kuning kehijauan. Kemudian ditentukan nilai Rf-nya untuk setiap noda yang tampak (69).

c. Penentuan Kadar Nobiletin

1. Validasi Penetapan Kadar Nobiletin

Validasi metode penetapan kadar nobiletin berupa akurasi, presisi, linearitas, LOD dan LOQ

a. Uji akurasi

Penetapan akurasi ditotolkan pada plat KLT, dielusi dengan fase gerak yang optimal diukur pengulangan 3 kali. Nilai yang dihitung adalah perolehan kembali.

b. Uji presisi

Uji presisi menggunakan tiga konsentrasi yang menggunakan tiga konsentrasi yaitu 6,25; 25; dan 100 µg/ml. Lalu dihitung % RSD

c. Linearitas

Nilai linearitas yang baik adalah $r > 0,99$

d. Uji batas deteksi (LoD) dan Uji batas kuantisasi (LoQ)

Persamaan LoD dan LoQ. $LoD=3,3 SD/slope$ $LoQ=10SD/slope$ (70).

2. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Lakukan pengerjaan KLT pada pembanding yang dibuat dalam konsentrasi 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 ($\mu\text{g/ml}$) ditotol dengan volume masing-masing 1 μl . Kemudian, plat KLT *discan* menggunakan densitometer dengan panjang gelombang serapan maksimum serapan nobiletin yaitu 324 nm. Kurva antara konsentrasi dan AUC yang terbentuk harus linear ($r > 0,99$) dan tentukan persamaan regresinya.

3. Penetapan Kadar Nobiletin

Plat KLT yang telah dielusi sampel dengan konsentrasi 1% dan pembanding *discan* menggunakan densitometer pada panjang gelombang serapan maksimum nobiletin. Maka didapatkan data luas histogram dari senyawa nobiletin pada larutan uji (y). Data luas histogram dari senyawa uji dimasukkan kedalam persamaan regresi $y = a + bx$. Dengan demikian kadar senyawa (x) dapat ditentukan.

3.3.6.2 Parameter non spesifik

a. Penetapan Kadar Abu Total

Ekstrak sebanyak 2-3 g dimasukkan ke dalam kurs yang telah ditara, kemudian pijar sampel sampai arang habis. Jika arang tidak bisa dihilangkan, cuci dengan air panas dan saring dengan kertas saring bebas abu. Filtrat dan kertas saring masukan dalam kurs yang sama, kemudian pijar dengan suhu $800 \pm 25^{\circ}\text{C}$ hingga bobot tetap. Dinginkan dalam desikator dengan keadaan wadah tertutup dan timbang abu yang telah di peroleh dari pemijaran. Kadar abu dinyatakan dalam %b/b (33).

$$\text{Kadar abu} = \frac{\text{Berat abu (g)}}{\text{Berat awal ekstrak (g)}} \times 100\%$$

b. Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit. Kumpulkan bagian yang tidak larut asam, saring menggunakan kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijar abu dengan suhu $800 \pm 25^{\circ}\text{C}$ hingga bobot tetap. Kadar abu tidak larut asam dinyatakan dalam %b/b (33).

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{\text{Berat abu tidak larut asam (g)}}{\text{Berat awal ekstrak (g)}} \times 100\%$$

c. Penetapan Kadar Air

Ekstrak yang diperkirakan mengandung 1-4 mL air ditimbang lalu dimasukkan ke dalam labu kering. Untuk zat yang dapat menyebabkan gejolak mendadak saat mendidih tambahkan batu didih. Masukkan sekitar 200 mL toluen jenuh air ke dalam labu, pasang rangkaian alat. Panaskan labu hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, atur penyulingan lebih kurang 2 tetes per detik hingga sebagian besar air tersuling dan naikan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes per detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam kondensor dicuci dengan toluen jenuh air sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluen jenuh air. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dinginkan tabung penerima hingga suhu ruang. Jika ada tetes air yang melekat, gosok tabung pendingin dan tabung penerima dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluen jenuh air hingga tetesan air turun. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam %v/b (33).

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{Volume air (ml)}}{\text{Berat ekstrak (g)}} \times 100\%$$

3.3.7 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metoda Difusi Agar

Tahapan yang dilakukan (68):

3.3.7.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat gelas, kertas cakram, *cotton bud* yang dimasukkan ke dalam botol infus disterilkan di dalam otoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama

15 menit. Pinset dan jarum inokulum disterilkan dengan cara *flambier* pada nyala lampu spiritus selama 20 detik. Lemari aseptis dibersihkan dari debu dan disemprot dengan etanol 70% serta LAF yang telah dibersihkan dengan menyalakan lampu UV-nya selama 15-30 menit.

3.3.7.2 Pembuatan Media Nutrient Agar

Serbuk NA sebanyak 20 g dilarutkan dengan 1 L aquadest dalam Erlenmeyer, kemudian dipanaskan diatas *hot plate* menggunakan *magnetic stirrer* sampai terbentuk larutan jernih. Selanjutnya, disterilisasi di dalam otoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

3.3.7.3 Peremajaan Mikroba Uji

Mikroba uji dan stok kultur murni ditanam pada media agar miring NA, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C.

3.3.7.4 Pembuatan Suspensi Mikroba Uji

Sebanyak satu ose mikroba uji diambil dari biakan murni dan disuspensikan ke dalam NaCl fisiologis steril, kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Kekeruhan suspensi dibandingkan menggunakan standar 0,5% *Mc-Farland* pada latar belakang hitam dan cahaya terang. Standar kekeruhan 0,5% *Mc-Farland* dibuat dengan cara menambahkan 99,5% mL H₂SO₄ 1% ke dalam 0,5 mL larutan BaCl₂ 1,175%.

3.3.7.5 Pembuatan Larutan Sampel Uji

Ekstrak uji dilarutkan dengan larutan DMSO dengan konsentrasi 15 dan 20 (% b/v).

3.3.7.6 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Sebanyak 100 µL suspensi mikroba uji dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian ditambahkan media NA secukupnya hingga menutupi permukaan bawah cawan petri lalu dihomogenkan. Setelah media padat diletakan *blank disc* steril yang telah ditetaskan 10 µL larutan uji. Untuk kontrol positif digunakan kloramfenikol. Sedangkan kontrol negatif digunakan blank disc steril yang ditetesi

DMSO sebanyak 10 μ L. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 18-24 jam. Aktivitas antibakteri dinyatakan positif apabila terdapat daerah hambatan berupa zona bening di sekitar *blank disc*. Daerah hambatan diukur menggunakan jangka sorong. Pengujian ini dilakukan menggunakan sistem triplo atau pengulangan sebanyak tiga kali.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identitas Sampel

Nama Simplisia : Limau sundai

Nama Latin : *Citrus x aurantifolia 'sundai'*

Bagian Tanaman : Kulit buah.

4.2 Standardisasi Simplisia

4.2.1 Parameter Spesifik

a. Makroskopis

Bentuk : Berupa irisan tipis kulit buah dengan permukaan tidak rata

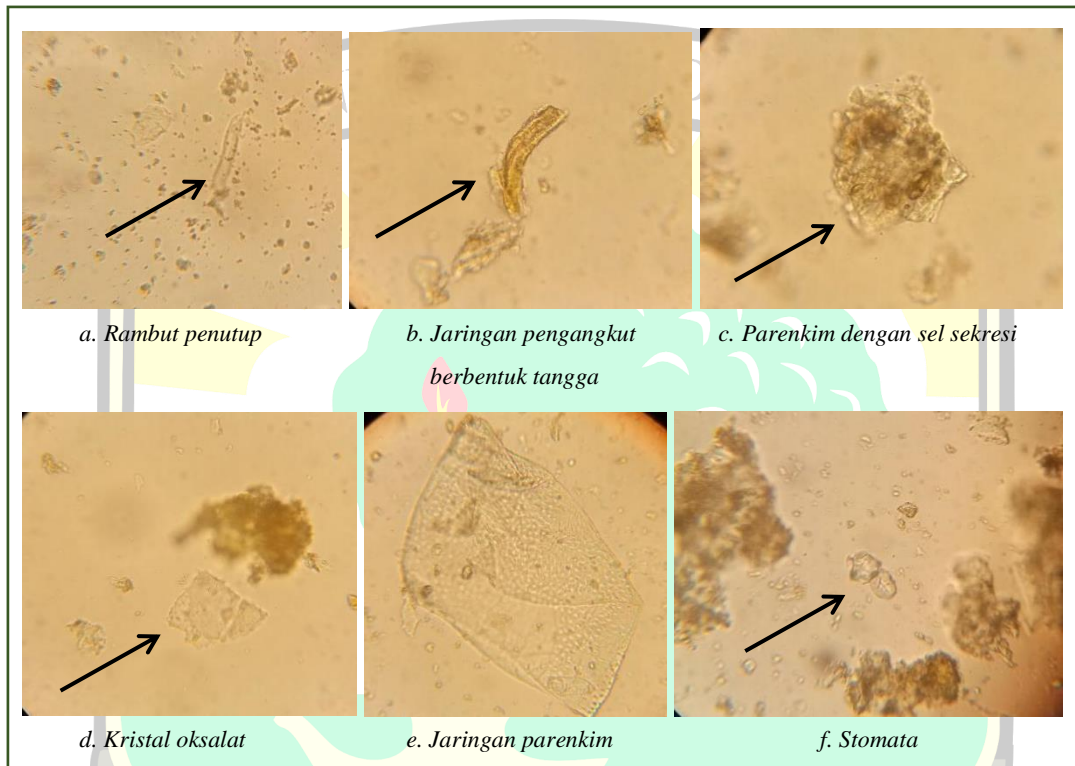
Bau : Bau khas

Warna : Permukaan luar berwarna coklat, permukaan bagian dalam berwarna putih kekuningan.

Pengamatan makroskopis yang dilakukan pada simplisia berupa bentuk, bau, dan warna dari simplisia. Proses penyiapan simplisia sangat mempengaruhi kualitas simplisia. Tahapan pertama yang dilakukan dalam penyiapan simplisia yaitu sampel dari ketiga daerah disortasi basah untuk memisahkan buah limau sundai dengan kotoran atau bahan asing. Lalu limau sundai dikupas untuk memisahkan bagian kulit dengan bagian dagingnya. Selanjutnya kulit buah limau sundai di cuci dengan waktu singkat dan dirajang. Perajangan yang terlalu tipis dapat menyebabkan hilangnya zat yang berkhasiat yang mudah menguap, sedangkan perajangan yang terlalu tebal dapat memperlambat proses pengeringan dan memberikan peluang untuk tumbuhnya jamur pada simplisia, oleh karena itu simplisia dirajang tidak terlalu tebal dan tipis (24). Setelah itu kulit limau sundai di oven dengan suhu 45°C selama dua hari, setelah proses pengeringan simplisia harus disimpan di plastik kedap udara agar tidak lembab dan menurunkan kualitas simplisia.

b. Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis berupa fragmen pengenal dari simplisia limau sundai yang telah dihaluskan. Serbuk simplisia diamati menggunakan reagen kloralhidrat dengan perbesaran 400x.



Gambar 4.1. Mikroskopis serbuk simplisia kulit limau sundai

Seperti yang terlihat di gambar 4.1, fragmen pengenal yang terdapat pada kulit limau sundai berupa rambut penutup, jaringan pengangkut berbentuk tangga, parenkim dengan sel sekresi, kristal oksalat, jaringan parenkim dan stomata. Fragmen pengenal tersebut berupa diantaranya juga terdapat pada spesies *Citrus* lainnya, seperti *Citrus aurantiifolia* (33), *Citrus jambhiri* Lush (71), *Citrus micocarpa* Bunge (68).

c. Kadar sari larut air

Tabel 4.1. Kadar sari larut air pada simplisia

Daerah	Kadar Sari Larut Air (%)	Standar Deviasi (%)
Pariaman	24,8965	0,4528
Bukittinggi	23,1338	0,6790
Solok	23,1183	0,5848

Penetapan kadar sari larut air menggambarkan jumlah kandungan senyawa dalam simplisia yang bersifat polar atau memiliki kepolaran yang mirip dengan air. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap hingga berbentuk ekstrak, lalu dipanaskan dengan oven selama 105°C hingga perubahan bobot tidak lebih dari 0,25 %. Pelarut yang digunakan adalah air jenuh kloroform, kloroform berfungsi untuk menarik pengotor yang bersifat non polar, sehingga senyawa yang tersari dalam air merupakan senyawa polar yang bebas pengotor. Dari data yang terdapat pada tabel 1 menunjukkan bahwa kadar sari larut air di Pariaman sebesar $24,8965 \pm 0,4528$ %, Bukittinggi $23,1338 \pm 0,6790$ % dan Solok sebesar $23,1183 \pm 0,5848$ %. Dari data ketiga sampel tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa kadar sari larut air pada simplisia kulit limau sundai tidak kurang dari $23,1183 \pm 0,5848$ %

d. Kadar sari larut etanol

Tabel 4.2. Kadar sari larut etanol pada simplisia

Daerah	Kadar Sari Larut Etanol (%)	Standar Deviasi (%)
Pariaman	17,6578	0,2117
Bukittinggi	15,6999	0,9569
Solok	16,7662	0,7029

Penetapan kadar sari larut etanol menggambarkan banyaknya senyawa yang larut di dalam etanol. Dari segi pengerjaan, penetapan kadar sari larut etanol hampir sama dengan penetapan kadar air . Dari tabel 4.2 dapat dilihat bahwa kadar sari larut etanol lebih kecil dibandingkan dengan air, hal ini menunjukkan

senyawa dalam kulit limau sundai lebih banyak mengandung senyawa yg polar dibandingkan semipolar – non polar. Kadar sari di Pariaman sebesar $17,6578 \pm 0,2117 \%$, Bukittinggi $15,6999 \pm 0,9569\%$, dan solok $16,7662 \pm 0,7029\%$.

Dari data yang di dapat dari ketiga daerah dapat disimpulkan bahwa kadar sari larut etanlo pada simplisia kulit limau sundai tidak kurang dari $15,6999 \pm 0,9569\%$,

4.2.2 Parameter Non Spesifik

a. Susut Pengeringan

Tabel 4.3. Susut Pengeringan Simplisia

Daerah	Susut Pengeringan (%)	Standar Deviasi (%)
Pariaman	5,4498	0,6940
Bukittinggi	4,8339	0,2817
Solok	5,6526	0,7951

Susut pengeringan merupakan salah satu parameter non spesifik yang bertujuan untuk memberikan batasan maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Parameter susut pengeringan pada dasarnya adalah pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C sampai berat konstan. Susut pengeringan dalam beberapa kondisi kerap disama artikan dengan kadar air, dengan syarat sampel yang digunakan tidak mengandung zat yang mudah menguap seperti minyak atsiri, metode ini di sebut metode gravimetri. Namun karena kulit jeruk pada umumnya dan limau sundai pada khususnya memiliki kandungan zat yang mudah menguap maka susut pengeringan pada simplisia kulit limau sundai ini hanya menggambarkan besar senyawa yang hilang dalam proses pemanasan saja dan tidak menggambarkan kadar air dari simpisia. Dalam tabel 4.3 dapat dilihat bahwa nilai susut pengeringan terbesar terdapat pada simplisia asal Solok sebesar $5,6526 \pm 0,7951\%$, lalu Pariaman sebesar $5,4498 \pm 0,6940\%$, dan simplisia Bukittinggi sebesar $4,8339 \pm 0,2817\%$. Nilai susut pengeringan akan mempengaruhi waktu simpan dari simplisia, semakin kecil nilainya maka kemungkinan zat seperti air dan zat yg mudah menguap juga sedikit sehingga pertumbuhan mikroorganisme saat proses penyimpanan dapat dihindari. Dari data ketiga daerah , dapat disimpulkan bahawa

susut pengeringan simplisia kulit limau sundai tidak lebih dari $5,6526 \pm 0,7951\%$.

b. Abu Total

Tabel 4.4. Kadar Abu Total Simplisia

Daerah	Kadar Abu Total (%)	Standar Deviasi (%)
Pariaman	4,2349	0,0836
Bukittinggi	4,9600	0,4285
Solok	5,1376	0,0413

Penetapan kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal. Ekstrak dipanaskan pada suhu tinggi hingga senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, hingga tersisa unsur mineral dan unsur anorganik saja. Karena pembaran sempurna senyawa organik akan menghasilkan CO_2 dan H_2O , sementara senyawa anorganik akan menghasilkan abu. Proses pembakaran ini disebut dengan pemijaran, yang menggunakan alat furnace dengan suhu yang sangat tinggi yaitu 800°C . Abu adalah oksida logam yang merupakan residu atau sisa pembakaran. Penetapan kadar abu bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa anorganik total dalam bentuk oksida logamnya (72). Kertas saring yang digunakan pada pengerjaan kadar abu adalah kertas saring Whatman no.40. Kertas Whatman memiliki kadar abu yang relatif kecil sehingga jika dipijarkan kembali bersama abu simplisia tidak akan memberikan pengaruh yang berarti, sementara kertas saring biasa jika dipijarkan akan menyisakan abu, hal ini akan mempengaruhi keakuratan data. Dari data ketiga daerah dalam tabel 4.4 dapat disimpulkan bahwa kadar abu total pada kulit buah limau sundai tidak lebih dari $4,2349 \pm 0,0836\%$.

c. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Tabel 4.5. Kadar Abu Tidak Larut Asam Simplisia

Daerah	Kadar Abu Tidak Larut Asam (%)	Standar Deviasi (%)
Pariaman	0,7224	0,0351
Bukittinggi	0,7630	0,0660
Solok	0,8041	0,1186

Kadar abu tidak larut asam mencerminkan adanya kontaminasi mineral atau logam yang tidak larut asam dalam simplisia. Kadar abu tidak larut asam merupakan salah satu kriteria dalam menentukan tingkat kebersihan dalam proses pengolahan suatu produk. Abu tidak larut asam dicerminkan oleh adanya kontaminasi mineral atau logam yang tidak larut asam dalam suatu produk. Kadar tidak larut dalam asam biasanya mengandung silikat yang berasal dari tanah, lingkungan atau pasir. Jumlah kotoran, tanah, tanah liat dan unsur logam Ag, Pb dan Hg (72). Proses pengerjaan penentuan kadar abu tidak larut asam ini adalah lanjutan dari penentuan kadar abu total. Sisa kadar abu total dididihkan dengan HCl encer selama 5 menit lalu disaring dengan kertas saring Whatman, lalu bagian yang tidak larut asam beserta kertas saring dipijar hingga bobot konstan. Sama halnya dengan kadar abu total pada kadar abu tidak larut asam, nilai kadar abu simplisia tidak larut asam yang berasal dari Solok memiliki nilai yg tinggi dibandingkan dari dua daerah lainnya (tabel 4.5), hal ini dapat disebabkan karena proses penyortiran yang kurang baik. Dari data ketiga daerah dalam tabel 4.5 dapat disimpulkan bahwa kadar abu tidak larut asam pada kulit buah limau sundai tidak lebih dari $0,7224 \pm 0,0351\%$.

4.3 Standarisasi Ekstrak

Proses ekstraksi dari simplisia menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Pemilihan maserasi sebagai metode ekstraksi yang digunakan didasari dari sifat beberapa senyawa yang diduga terkandung di dalam kulit limau sundai yang tidak stabil pada suhu tinggi sehingga penggunaan metode ekstraksi panas dianggap kurang tepat. Selain itu metode maserasi juga tidak membutuhkan peralatan yang rumit dan mudah dalam pengerjaannya. Proses maserasi dihentikan ketika filtrat yang dihasilkan sudah jernih, hal ini mengindikasikan simplisia sudah terekstrak dengan sempurna oleh pelarut. Maserat yang terkumpul kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator. Penggunaan etanol 70% sebagai larutan penyari karena memiliki kemampuan menyari senyawa pada rentang polaritas yang lebar mulai dari senyawa polar hingga non polar, tidak toksik dibanding dengan pelarut organik yang lain, lebih mudah diuapkan dibanding air, tidak mudah ditumbuhi mikroba dan relatif murah. Rendemen yang diperoleh

dengan berat 400 gram simplisia kering dari ketiga daerah yaitu Pariaman : 21.0781 % , Bukittinggi : 20.8302% , Solok : 18.8044%.

4.3.1 Parameter Spesifik

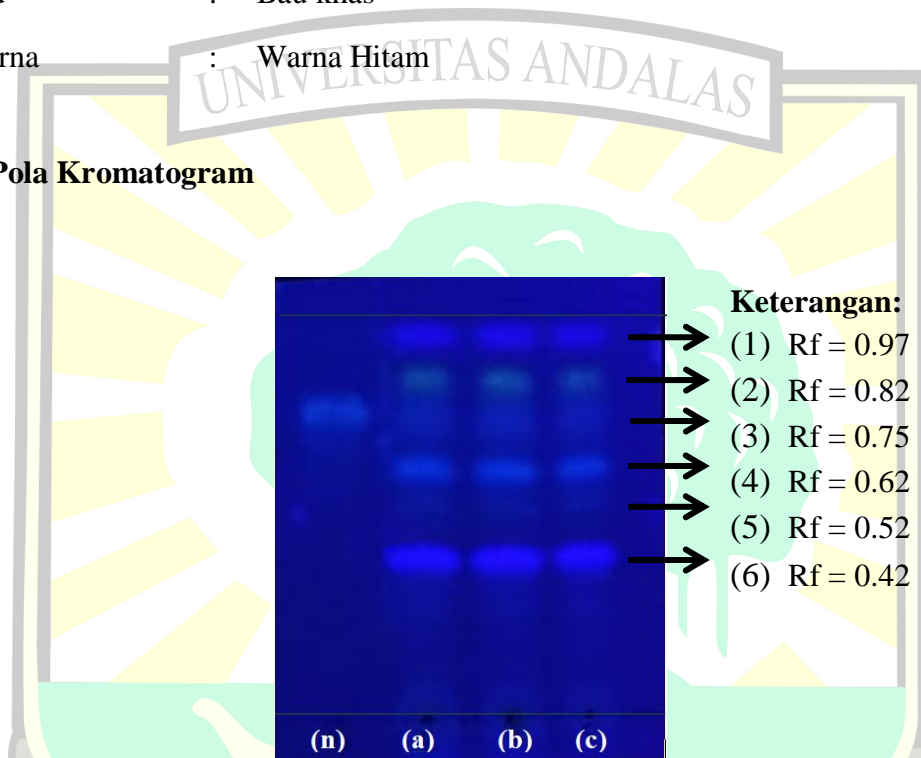
a. Organoleptis Ekstrak

Bentuk : Ekstrak kental

Bau : Bau khas

Warna : Warna Hitam

b. Pola Kromatogram



Gambar 4.2. Pola Kromatogram ekstrak kulit limau sundai

Keterangan : (n) nobiletin, ekstrak etanol kulit buah limau sundai : (a) Bukittinggi; (b) Pariaman; (c) Solok, dengan eluen Kloroform : Etil asetat (7:3), dan penampak noda sitroborat

Profil KLT merupakan salah satu parameter spesifik yang penting untuk ekstrak. Profil KLT dapat menggambarkan komponen senyawa yang terdapat dalam ekstrak. Pada gambar 4.2 merupakan profil KLT dari ekstrak etanol kulit buah limau sundai dengan pembanding nobiletin yang menggunakan eluen kloroform : etil asetat (7:3) dan beberapa tetes asam format. Eluen tersebut digunakan karena senyawa yang terdapat pada ekstrak bersifat semi polar dan non polar, seperti nobiletin. Sedangkan perbandingan 7:3 di pilih karena pada perbandingan tersebut pemisahan antar noda pada KLT terlihat jelas. Penambahan

asam format pada eluen berfungsi untuk meminimalisir tailing pada saat elusi senyawa. Dengan penambahan asam akan mengurangi interaksi antara gugus fenol yang ada pada flavonoid dengan gugus silanol pada fase diam silica gel (73) Penampak noda yang digunakan adalah sitroborat, yang merupakan penampak spesifik golongan flavonoid. Setelah di elusi dan dikeringkan, plat KLT disemprot dengan penampak noda sitroborat (5 gram asam sitrat dan 5 gram asam borat dalam 100 ml etanol) lalu dipanaskan dalam oven dengan suhu 105⁰C, dan diamati di bawah uv 365 nm (33).

c. Penetapan Kadar Nobiletin

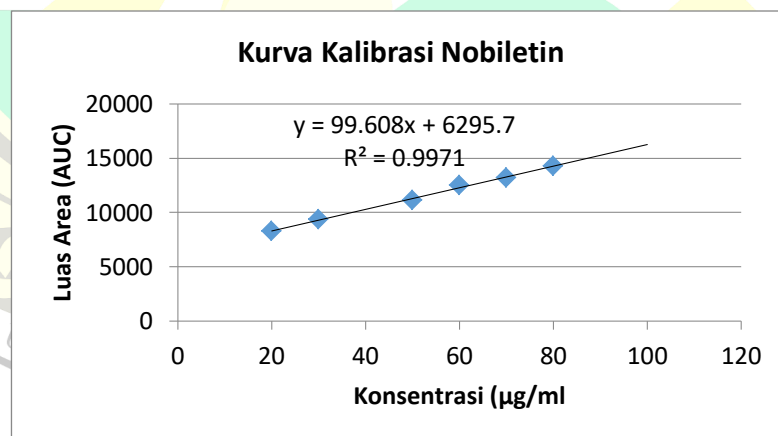
Nobiletin merupakan flavonoid kelompok flavon yang memiliki 6 metoksi pada kerangka flavonoidnya. Nobiletin merupakan flavon tanpa bagian glikosida, NOB mudah diserap, karena sifat lipofilik dan permeabilitasnya yang tinggi dan menunjukkan mekanisme spesifik (57). Nobiletin memiliki efektivitas sebagai anti virus, antiinflamasi (8), antikolesterol (59,60), antibakteri (10), antidiabetes, neuroprotektif, serta anti teratogenik dan anti kanker (57). Untuk menentukan kemurnian dan kadar dari nobiletin dapat menggunakan HPLC dan KLT Densitometri.

Pada penelitian kali ini penetapan kadar nobiletin menggunakan KLT Densitometri. Untuk preparasi sampel berupa 50 mg ekstrak dilarutkan dengan metanol 5 ml dalam labu ukur, sehingga konsentrasi akhirnya sebesar 10.000. Pembanding berupa 5 mg nobiletin dilarutkan dengan metanol 5 ml, sehingga konsentrasinya 1000 µg/ml, lalu dilakukan pengenceran sehingga di dapat konsentrasi 20 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml dan 80 µg/ml. Eluen yang digunakan adalah kloroform : etil (7 :3) lalu ditambahkan beberapa tetes asam format. Volume sampel yang ditotolkan sebesar 1 µl, dengan pengulangan sebanyak tiga kali pada tiap konsentrasi (triplo). Penotolan dilakukan dari konsentrasi kecil ke konsentrasi besar agar data yang di dapat lebih akurat. Setelah proses pentotolan, plat dikeringkan terlebih dahulu baru dielusi di dalam bejana yang berisi eluen dan sudah dalam keadaan jenuh. Plat kemudian discan menggunakan TLC Scanner dengan panjang gelombang maksimum nobiletin 334 nm (56).

AUC dari nobiletin (tabel 6) kemudian diplot sehingga di dapat persamaan regresi yang linier. Menurut AOAC persamaan regresi dikatakan linier jika koefisien korelasinya $> 0,99$ (74). Koefisien korelasi nobiletin yang didapatkan sebesar 0,9971 (gambar 4.3) dan memenuhi kriteria yang ditentukan.

Tabel 4.6. Data Perolehan AUC dari Enam Seri Baku Nobiletin

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	AUC			Rata – rata AUC
	1	2	3	
20	8259	8289,1	8161,1	8236,4
30	9335,7	9392,8	9371,4	9366,6333
50	11130,4	10887,5	10868,6	10962,1666
60	12486	12783,8	12683,4	12651,0666
70	13192,2	13221,3	13292,9	13235,4666
80	14249,4	14132,3	14197,5	14193,0666



Gambar 4.3. Kurva kalibrasi nobiletin

Persamaan regresi yang di dapat dari kurva kalibrasi ($Y = 99,609X + 6295,7$) dapat digunakan untuk menentukan kadar nobiletin pada ekstrak. Data AUC pada tabel 4.6 merupakan Y dan kadar yang ingin diketahui adalah X. Dari hasil perhitungan tersebut dapat diketahui bahwasanya kadar nobiletin pada ekstrak kulit limau sundai asal Bukittinggi sebesar 0,4670 %, Pariaman 0,3331 %

dan Solok sebesar 0,5870%. Perbedaan kadar nobiletin dipengaruhi unsur hara tanah tempat tanaman tumbuh, iklim dan cuaca masing – masing daerah yang berbeda.

Tabel 4.7. Hasil penetapan kadar nobiletin pada ekstrak

Ekstrak	Luas Area (AUC)			Rata – Rata	Kadar Nobiletin (µg)	Kadar Nobiletin (%)
	1	2	3			
Bukittinggi	10946,9	10894,1	11001,8	10947,6	46,7020	0,4670
Pariaman	9607,9	9605	9627,7	9613,5333	33,3039	0,3331
Solok	12323,7	11374,8	12729,6	12142,7	58,7001	0,5870

Penetapan kadar dari nobiletin merupakan bagian standarisasi ekstrak, oleh karena itu metode yang digunakan juga harus terstandar. Salah satu cara untuk memastikan metode yang digunakan tepat adalah validasi. Validasi yang dilakukan pada penetapan kadar nobiletin antara lain linearitas, akurasi, presisi, LOD dan LOQ.

Tabel 4.8. Parameter validasi penetapan kadar nobiletin

Parameter	Ketentuan	Hasil
Linieritas	Koefesien korelasi > 0,99 (74)	Persamaan regresi $Y = 99,609X + 6295,7$ $r = 0.9971$
LOD (<i>Limit Of Detection</i>)	3,3 x SD / slope	5,2686 µg
LOQ (<i>Limit Of Quantification</i>)	10 x SD / slope	15.9654 µg
Presisi dalam satu hari (<i>intra day precision</i>)	3 konsentrasi baku yang dibuat triplo , Untuk kadar senyawa kecil RSD < 15 % (75)	Konsentrasi 20 µg/ml : Kadar 19,4834 µg, RSD 3,4485 % Konsentrasi 50 µg/ml : Kadar 46,8483 µg, RSD 3,1287% Konsentrasi 80 µg/ml : Kadar 79,2845 µg, RSD 0,7430%

Akurasi baku	Data diambil minimal tiga konsentrasi dengan pengulangan sebanyak tiga kali, dan dihitung sebagai persentasi perolehan kembali (76) Perolehan Kembali untuk konsentrasi 0,01 % adalah 85 – 110 % (74)	Konsentrasi 20 µg/ml Perolehan Kembali : 97,4169 % Konsentrasi 50 µg/ml Perolehan Kembali : 93,6966 % Konsentrasi 80 µg/ml Perolehan Kembali : 99,1056 %
--------------	--	---

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung proporsional dengan presentasi analit pada kisaran yang diberikan. Linearitas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x) (76). Respon pada kurva kalibrasi berupa AUC (*Area Under Curve*) atau luas daerah. Linearitas dapat digambarkan dengan koefisien korelasi. Semakin mendekati satu maka semakin linear kurva kalibrasinya. Koefisien korelasi dari kurva kalibrasi nobiletin adalah 0,9971. Seluruh konsentrasi baku yang digunakan berada diatas nilai LOD dan LOQ karena itu persamaan regresi bisa digunakan untuk penentuan kadar ekstrak.

LOD (*Limit Of Detection*) merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Sementara itu LOQ (*Limit Of Quantification*) adalah konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. LOD dan LOQ dapat dihitung berdasarkan standar deviasi (SD) dan slope (S) kurva baku. $LOD = 3,3 \times SD / S$, sedangkan $LOQ = 10 \times SD / S$ (76). LOD dan LOQ pada penetapan kadar nobiletin adalah 5,2686 µg dan 15,9654µg.

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya dan nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran (76). Perolehan kembali merupakan persentase jumlah analit yang ditambahkan kedalam sampel atau selisih antara rata – rata dan nilai sebenarnya yang dapat diterima. Syarat perolehan kembali untuk konsentrasi 0,01 % adalah 85 – 110 % (74). Dipilih ekstrak di daerah Solok untuk sampel yang di tambahkan baku, dipilih tiga konsentrasi pembanding yaitu 20 ppm, 50ppm dan 80 ppm. Dapat dilihat pada tabel

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relative (RSD) dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Presisi terbagi atas 3 yaitu : keterulangan berupa ketepatan pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya maupun waktunya. Selanjutnya yaitu presisi antara yang merupakan kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya maupun waktunya. Yang terakhir yaitu ketertiruan yang merujuk pada hasil laboratorium yang lain (76). RSD dari tabel 10 masih berada dalam rentang yang ditentukan yaitu 2% untuk senyawa dalam jumlah banyak dan <15% untuk senyawa dalam jumlah kecil.

Tabel 4.9. Tabel akurasi dan presisi menggunakan baku pembanding nobiletin

20 (µg/ml)			50 (µg/ml)			80 (µg/ml)		
AUC	Kadar (µg)	Perolehan Kembali (%)	AUC	Kadar	Perolehan Kembali	AUC	Kadar (µg)	Perolehan Kembali (%)
8259	19,7103	98,5513	11130,4	48,5373	97,0745	14249,4	79,8500	99,8125
8289,1	20,0124	100,0622	10887,5	46,0987	92,1974	14132,3	78,6744	98,3430
8161,1	18,7274	93,6370	10868,6	45,9090	91,8179	14197,5	79,3290	99,1612
Rata-rata	19,4834	97,4169	Rata-rata	46,8483	93,6966	Rata-rata	98,5616	99,1056
RSD (%)	3,4485		RSD (%)	3,1287		RSD (%)	0,7430	

Salah satu parameter validasi yang belum dilakukan pada penelitian kali ini adalah parameter selektivitas yang berfungsi untuk menunjukkan kemampuan pemisahan analit yang diinginkan dengan komponen lainnya (74). Penentuan

selektivitas dapat dilihat dari pemisahan peak nobiletin dengan senyawa lainnya dengan konsentrasi rendah. Parameter selektivitas dapat digambarkan sebagai nilai resolusi (Rs). Selektivitas merupakan komponen sangat penting dari validasi, karena itu sebaiknya dilakukan penentuan selektivitas sebelum melakukan penentuan kadar.

4.3.2 Parameter Non Spesifik

a. Kadar Air

Tabel 4.10. Kadar Air Ekstrak

Daerah	Kadar Air (%)	Standar Deviasi (%)
Pariaman	15,6292	0,9467
Bukittinggi	16,7314	0,9962
Solok	18,3753	0,8616

Penentuan kadar air merupakan hal yang sangat penting dalam menjamin mutu obat dikarenakan kadar air yang tinggi akan meningkatkan kelembapan dan meningkatkan resiko pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diharapkan. Ekstrak yang baik adalah ekstrak yang memiliki kadar air kecil. Menurut Peraturan BPOM 2014, kadar air yang baik untuk ekstrak yang akan digunakan dalam sediaan obat herbal adalah $\leq 10\%$ (77). Karena itu untuk dijadikan bahan baku obat tradisional ekstrak etanol kulit limau sundai ini harus mengalami perlakuan terlebih dahulu, karena kadarnya yang melebihi ketentuan (tabel 11). Ekstrak limau sundai termasuk ekstrak kental, dengan kadar air 5 – 30 % (78).

Penentuan kadar air ekstrak limau sundai ini menggunakan metode destilasi dengan pelarut berupa toluen. Toluene dipilih sebagai pelarut dikarenakan sifat toluen yang tidak tercampurkan dan memiliki berat jenis yang lebih ringan dibandingkan air, sehingga mempermudah proses pengamatan volume air yang terbaca pada proses ini. Titik didih toluen juga lebih tinggi dibandingkan air, yaitu 110°C , hal ini menyebabkan air dapat menguap keseluruhannya dan didinginkan oleh kondensor, sehingga penentuan kadar air pada ekstrak akurat.

Metode ini dipilih karena paling mudah pengerjaannya dibandingkan titrasi karlfischer, dan lebih akurat dibandingkan metode gravimetri. Data yang di

dapatkan dari ketiga daerah, dapat ditarik kesimpulan bahwa kadar kadar air pada ekstrak kulit limau sundai tidak lebih dari $18,3753 \pm 0,8616$ %.

b. Kadar Abu Total Ekstrak

Tabel 4.11. Kadar Abu Total Ekstrak

Daerah	Kadar Abu Total (%)	Standar Deviasi (%)
Pariaman	3,8656	0,7616
Bukittinggi	3,6015	0,6610
Solok	3,9294	0,9211

Sama halnya dengan simplisia kadar abu pada ekstrak juga perlu ditentukan dikarenakan mineral dan logam anorganik yang terdapat pada ekstrak yang tinggi dapat terakumulasi di tubuh jika dikonsumsi terus menerus. Logam yang terakumulasi di tubuh akan memperberat kerja ginjal, dapat menyebabkan terganggunya fungsi fisiologis dari tubuh. Dari tabel 4.11 dapat disimpulkan bahwa kadar abu total pada ekstrak limau sundai tidak lebih dari $3,9294 \pm 0,9211$ %

c. Kadar Abu Tidak Larut Asam Ekstrak

Tabel 4.12. Kadar Abu Tidak Larut Asam Ekstrak

Daerah	Kadar Abu Tidak Larut Asam (%)	Standar Deviasi (%)
Pariaman	0,2604	0,0297
Bukittinggi	0,2586	0,0382
Solok	0,2677	0,0770

Abu tidak larut asam dicerminkan oleh adanya kontaminasi mineral atau logam yang tidak larut asam dalam suatu produk. Kadar tidak larut dalam asam biasanya mengandung silikat yang berasal dari tanah, lingkungan atau pasir. Jumlah kotoran, tanah, tanah liat dan unsur logam Ag, Pb dan Hg (72). Dari data pada tabel 4.12 dapat disimpulkan bahwa kadar abu tidak larut asam pada ekstrak kulit limau sundai cukup tinggi, namun dari data tersebut juga dapat ditarik kesimpulan bahwa kadar abu tidak larut asam ekstrak etanol tidak lebih dari $0,2677 \pm 0,0770$ %.

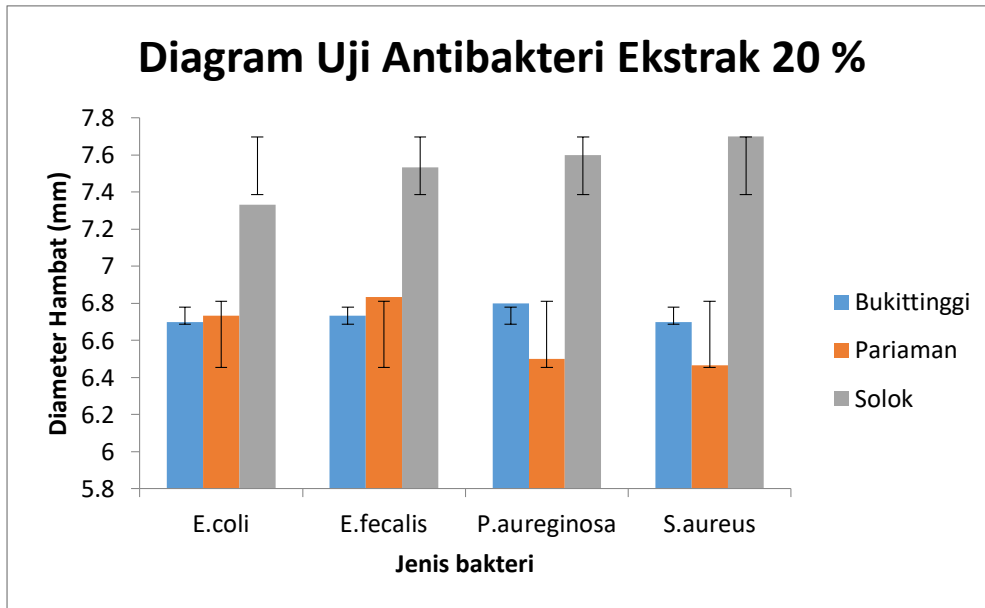
4.4 Aktivitas Antibakteri Ekstrak

Tabel 4.13. Hasil pengujian aktivitas antibakteri

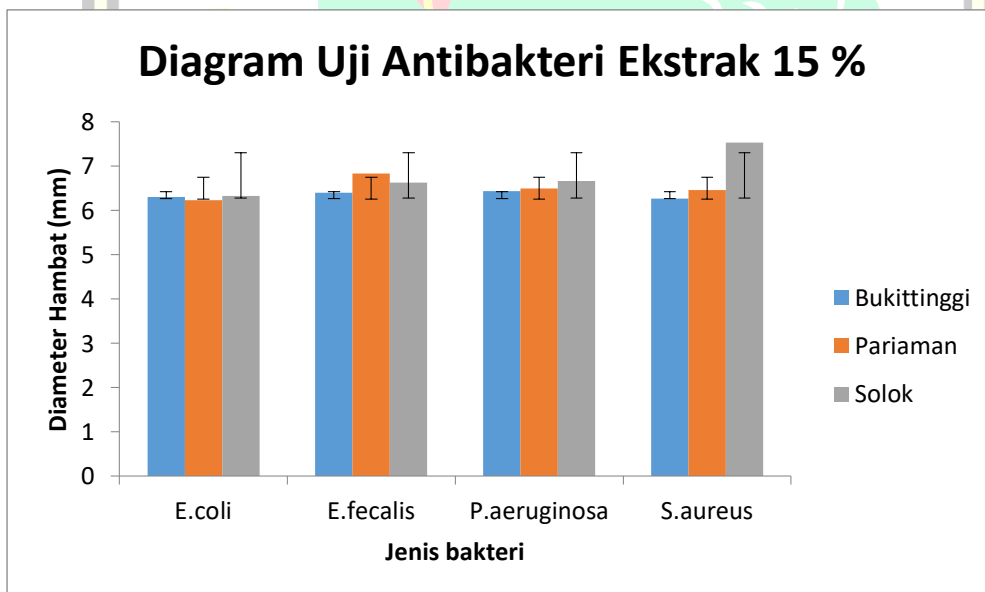
Bakteri Uji	Diameter hambat (mm ± SD)						K + (Kloramfenikol)
	Bukittinggi		Pariaman		Solok		
	20%	15%	20%	15%	20%	15%	
E. coli ATCC 25922	6,7± 0,17	6,3 ± 0,1	6,63± 0,21	6,23 ± 0,23	7,33 ± 0,31	6,33 ± 0,12	24 ± 0.0984
E. faecalis ATCC 12228	6,73 ±0,12	6,4 ± 0,1	6,83±0,06	6,5 ± 0,1	7,53 ± 0,06	6,63 ± 0,15	
P. aeruginosa ATCC 27853	6,8 ± 0,1	6,43 ± 0,06	6,5 ± 0,1	6,23 ± 0,12	7,6 ± 0,1	6,67 ± 0,15	
S. aureus ATCC 25923	6,7 ± 0,1	6,27 ± 0,06	6,47± 0,06	6,17 ± 0,06	7,7 ± 0,1	7,53 ± 0,15	

Salah satu aktivitas biologis yang biasanya dimiliki genus *Citrus* adalah aktivitas antibakterinya, karena itu dilakukan screening aktivitas antibakteri dari ekstrak kulit limau sundai. Metode yang digunakan adalah metode difusi menggunakan cakram (disc), karena metode ini tergolong mudah dan cepat dalam pengerjaan. Hasil penilaian dilakukan berdasarkan zona hambat bening yang diukur menggunakan jangka sorong. Zona hambat bening adalah area transparan/bening yang terjadi karena antimikroba (bakteri, jamur atau virus) menyebabkan pembentukan seperti cincin yang merupakan hambatan di dalam area pertumbuhan bakteri yang padat sehingga tak ada bakteri yang tumbuh di dalam cincin tersebut. Aktivitas antimikroba dikelompokkan menurut metode David dan Stout (1971) dimana diameter zona hambat ≥ 20 mm menunjukkan aktivitas sangat kuat, 10-20 kuat, 5-10 sedang, dan ≤ 5 lemah (79).

Alasan dipilih keempat bakteri tersebut dikarenakan adalah banyaknya kasus resisten pada jenis bakteri tersebut. Sebagai kontrol positif digunakan kloramfenikol 0,3 % dikarenakan antibiotik kloramfenikol memiliki spektrum yang luas. Untuk kontrol positif digunakan DMSO dikarenakan DMSO merupakan pelarut yang digunakan untuk mengencerkan ekstrak, serta tidak memiliki aktivitas antibakteri. Dapat dilihat pada tabel 4.13 zona hambat paling besar dari ekstrak adalah 7,6 mm, dan paling kecil 6,2333 mm, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri termasuk sedang dengan konsentrasi 20 % dan 15 %.



Gambar 4.4. Diagram uji antibakteri ekstrak 20%



Gambar 4.5. Diagram uji antibakteri ekstrak 15 %

Dari gambar 12 dapat dilihat bahwa ekstrak kulit limau sundai dari solok pada konsentrasi 20 % memiliki aktivitas lebih kuat dibandingkan yang lainnya, sementara pada gambar 13 aktivitas antibakteri pada konsentrasi 15% tergolong relatif sama, hal ini menunjukkan aktivitas yang berbeda dengan meningkatnya konsentrasi pada ketiga ekstrak. Kecilnya zona hambat dari ekstrak dipengaruhi oleh komposisi senyawa di dalamnya, dan kemampuan tiap senyawa berdifusi yang berbeda.

Pada penelitian ini hanya dilakukan *screening* pada ekstrak kulit limau sundai, untuk mengetahui adakah aktivitas antibakteri pada ekstrak. Setelah dilakukan uji antibakteri didapatkan bahwa ekstrak memiliki aktivitas antibakteri, hal ini diperkirakan karena kandungan flavonoid yang berada pada limau sundai. Salah satu flavonoid yang dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri adalah nobiletin. Johann (2007) dalam penelitiannya membuktikan bahwa flavonoid nobiletin dan tangeretin memiliki aktivitas terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.coli* dengan MIC 500 µg/ml (10). Oleh karena itu sebaiknya dilakukan penentuan senyawa yang terdapat dalam ekstrak limau sundai dan menentukan aktivitas antibakterinya.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

1.1 Kesimpulan

Standarisasi simplisia dan ekstrak dari tiga daerah Bukittinggi, Pariaman, dan Solok didapatkan kesimpulan bahwa hasil makroskopis yaitu simplisia (*Citrus x aurantiifolia* 'sundai') merupakan irisan tipis kulit buah dengan permukaan tidak rata dengan bau khas, permukaan luar berwarna coklat, dan permukaan bagian dalam berwarna putih kekuningan. Fragmen pengenal yang terdapat pada kulit limau sundai berupa rambut penutup, jaringan pengangkut berbentuk tangga, parenkim dengan sel sekresi, Kristal oksalat, jaringan parenkim dan stomata. Standarisasi spesifik simplisia lainnya yaitu kadar sari larut air dari simplisia tidak lebih 24,8965 %, sementara kadar sari larut etanol tidak lebih 17,6578 %. Parameter non spesifik standarisasi simplisia kulit limau sundai berupa susut pengeringan yang tidak lebih dari 5,6526 %, kadar abu total tidak lebih dari 5,1376 %, dan kadar abu tidak larut asam tidak lebih dari 0,8041% . Parameter spesifik standarisasi ekstrak didapatkan hasil berupa ekstrak kental, warna hitam , bau khas, nilai Rf Nobiletin 0,75 dengan eluen kloroform : etil asetat (7 : 3) dengan penambahan beberapa tetes asam format. Nilai rendemen dari ekstrak tidak kurang dari 18.8044%. Parameter non spesifik ekstrak berupa kadar air tidak lebih dari 18,3753 % , abu total tidak lebih dari 3,9294 %, dan kadar abu tidak larut asam tidak lebih dari 0,2677 %. Kadar nobiletin pada ekstrak kulit limau sundai tidak kurang dari 0,4434 % yang diukur menggunakan KLT Densitometri dengan validasi berupa akurasi, presisi, linearitas, LOD dan LOQ. Batasan berupa kadar minimal dan maksimal yang dapat ditentukan dari simplisia dan ekstrak kulit limau sundai tersebut dapat dijadikan acuan atau standar dari limau sundai. Kadar nobiletin pada ekstrak kulit limau sundai Pariaman 0,4434 %, Solok 0,5738 % dan Bukittinggi 0,5122 % . Pada uji antibakteri menggunakan metode difusi pada ketiga daerah memiliki aktivitas tergolong sedang pada konsentrasi 20 % dan 15 % .

5.2 Saran

Disarankan untuk peneliti selanjutnya agar melakukan standardisasi lebih lanjut, serta melakukan fraksinasi atau isolasi dari kulit limau sundai. Kemudian disarankan untuk melakukan uji aktivitas lain pada ekstrak limau sundai terkait golongan polimetoksi flavon , terutama nobiletin.



DAFTAR PUSTAKA

1. Pratiwi D, Hastuti N, W NN, Armandari I, Ikawati M, Hermawan A, et al. Potensi Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantiifolia* (Cristm.) Swingle) Sebagai Agen Khemopreventif Melalui Penekanan Ekspresi c-Myc dan Penghambatan Proliferasi Pada Sel Payudara Tikus Galur Sprague Dawley Terinduksi 7,12-dimetilbenz[a] . Majalah Obat Tradisional. 2010;15(1):8–15.
2. Salim Z, Munadi E. Info Komoditi Tanaman Obat. Badan Pengkajian dan Pengembangan Perdagangan Kementerian Perdagangan Republik Indonesia; 2017.
3. Pertanian K. Komoditas Pertanian Subsektor Hortikultura Jeruk. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Kementerian, Kementrian pertanian; 2015.
4. Andriani IAA, Harijani N, Kurnijasanti R. Pemanfaatan Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C) Sebagai Antibakteri Terhadap Total Bakteri Pada Daging Sapi. Basic Med Vet. 2016;5(2):73–9.
5. Irawaty W, Soetaredjo FE, Ayucitra A, Sianto ME, Jonathan K, Cynthia D, et al. Antioxidant and Antidiabetic Activities of Ethanolic *Citrus hystrix* Peel Extract : Optimization of Extraction Conditions. Aust Journal Basic Application Science. 2014;8(14):85–9.
6. Irsyam ASD, Chikmawati T. Peninjauan Ulang Marga *Citrus* (Rutaceae) di Kawasan Madura. Floribunda, Kampus IPB Dramaga, Bogor. 2015;5(3).
7. Sari HN, Meriko L. Jenis-Jenis Tumbuhan Obat Yang digunakan Masyarakat Untuk Pengobatan Tradisional di Nagari Panyakalan Kecamatan Kubung Kabupaten Solok. Progr Stud Pendidik Biol STKIP PGRI Sumatera Barat. 2016;
8. Li S, Yu H, Ho CT. Nobiletin: Efficient and large quantity isolation from orange peel extract. Biomed Chromatogr. 2006;20(1):133–8.
9. Nakajima A, Ohizumi Y. Potential Benefits of Nobiletin , A Citrus Flavonoid , against Alzheimer ' s Disease and Parkinson ' s Disease through. Moeucle Science. 2019;1–14.
10. Johann S, De Oliveira VL, Pizzolatti MG, Schripsema J, Braz-Filho R,

- Branco A, et al. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from Citrus spp. peels. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(6):681–5.
11. wahyuni, Dwi Kusuma, Wiwied Ekasari JRWH. Toga Indonesia. Airlangga University press; 2016. p. 173.
 12. Sembiring HB, Sihotang H, Ctampubolon A. Antibacterial Activities of Rough Lemon (*Citrus jambhiri* lush) Rind Essential oil. Jounal Chemistry Natural Resourch. 2019;01(01):12–8.
 13. Sembiring HB. Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Minyak Atsiri Daun Asam Jungga (*Citrus jambhiri* Lush). Chimia Natural Acta. 2017;5(3):124–31.
 14. Ekawati ER, Santoso SD, Purwanti YR. Pemanfaatan Kulit Buah Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) Sebagai Larvasida Aedes Aegypti Instar III. J Biota. 2017;3(1):1–5.
 15. Hindun S, Rusdiana T, Abdasah M, Hindritiani R. Potensi Limbah Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Sebagai Inhibitor Tirosinase. IJPST Univ Padjadjaran, Bandung, Indones. 2017;4:64–9.
 16. Kurniandari N, Susantiningsih T, Berawi KN. Efek Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai Senyawa Nefroprotektor terhadap Gambaran Histopatologis Ginjal yang Diinduksi Cisplatin. Majority. 2015;4:140–3.
 17. Dwiyanti RD, Nailah H, Muhlisin A, Lutpiatina L. Efektivitas Air Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) dalam Menghambat Pertumbuhan Escherichia coli. Jurnal Skala Kesehatan Politeknik. 2018;9(2).
 18. Berlian Z, Fatiqin A, Agustina E. Penggunaan Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Dalam Menghambat Bakteri *Escherichia coli* Pada Bahan Pangan. Jurnal Bioilmi. 2016;2(1).
 19. Zage AU, T ST, Ali M. Antibacterial Activity of *Citrus aurantifolia* Leaves Extracts Against Some Enteric Bacteria of Public Health Importance. Module Approaches Matery Science. 2018;1(2):33–8.
 20. Anindito W, Tunjung S, Cinatl J, Michaelis M, Smales CM. Anti-Cancer Effect of Kaffir Lime (*Citrus hystrix* DC) Leaf Extract in Cervical Cancer and Neuroblastoma Cell Lines. Procedia Chem. 2015;14:465–8.

21. R U, Khasanah, Nasution LU and. Preservative effects of kaffir lime (*Citrus hystrix* DC) leaves oleoresin incorporation on cassava starch-based edible coatings for refrigerated fresh beef. International Food Research Journal. 2017;24(August):1464–72.
22. Hendri Joni. Daya Proteksi Ekstrak Kulit Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) terhadap Nyamuk Demam berdarah. Sains Veterenery. 2013;31(2):180–5.
23. Khafidhoh Z, Dewi SSi, Iswara A. Efektivitas Infusa Kulit Jeruk Purut (*Citrus hystrix* Dc .) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. Univ Res Coloquium. 2015;31–7.
24. RI DK. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. 2000.
25. Parwata IMO. Obat Tradisional. 2016. 1–71 p.
26. Prasetyo, Entang I. Pengelolaan Budidaya Tanaman Obat-Obatan (Bahan Simplisia). Fakultas Pertanian , UNIB; 2013.
27. Badan POM RI. Pedoman Teknologi Formulasi Sediaan Berbasis Ekstrak. Jakarta: Badan POM RI; 2012.
28. Rosidah I, Mufidah R, Bahua H, Saprudin M, Teknologi P, Pengkajian B, et al. Optimasi Kondisi Ekstraksi Senyawa Total Fenolik Buah Labu Siam (*Sechium edule* (Jacq .) Sw .) Menggunakan Response Surface Methodology. Media Litbangkes. 2017;79–88.
29. Hidayah N, Hisan AK, Solikin A, Mustikaningtyas D. Uji Efektivitas Ekstrak *Sargassum muticum* Sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas *Staphylococcus aureus* Nikmatul. J Creat Students. 2016;1(1).
30. Kementrian Kesehatan RI. Farmakognosi dan Fitokimia. 2016.
31. Sumiwi SA, Muhtadi A, Marline A, Zuhrotun A, Tjitraresmi A. Penetapan Parameter Standarisasi Ekstrak Herba Putrimalu (*Mimosa pudica* Linn.) Dan Uji Toksisitas Akut nya Pada Mencit. Fak Farm Univ Padjadjaran. 2013;(November):6–7.
32. Utami YP, Taebe B, Tinggi S, Farmasi I, Perintis J, Km K, et al. Standardisasi Parameter Spesifik Dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus alba* L .) Asal Kabupaten Soppeng Provinsi Sulawesi Selatan. J Pharm Med Sci. 2016;1(2):48–52.
33. Kementrian Kesehatan RI. Farmakope Herbal Indonesia edisi II. 2017.

34. Utami YP, Umar AH, Syahrani R, Kadullah I. Standardisasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Leilem (*Clerodendrum*). *Journal Pharmacy Medical Science*. 2017;2(1):32–9.
35. Dachriyanus, Susanti M. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Padang: Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi Universitas Andalas; 2008.
36. Wulandari L. *Kromatografi Lapis Tipis*. PT. Taman Kampus Presindo, Jember; 2011.
37. Wiryawan A, Retnowati R, Sabarudin A. *Kimia Analitik*. Departemen Pendidikan Nasional; 2008.
38. Leswara ND. Penetapan Kadar Triprolidina Hidroklorida Dalam Sediaan Sirup Obat Influenza Secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri. *Dep Farm FMIPA-UI, Kampus UI Depok*. 2007;IV(2):59–72.
39. Muflihah YM, Fithria A, Indarti D. Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri untuk Analisis Residu Pestisida Diazinon dalam Sawi Hijau (*Brassica juncea* L .). *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. 2015;149–53.
40. Dachriyanus. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. 2004.
41. Wang T yang, Li Q, Bi K shun. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal Pharmcy Science*. 2018;13(1):12–23.
42. Redha A. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Journal Berlian*. 2010;9(2):196–202.
43. Arifin B, Ibrahim S. Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *Journal Zarah*. 2018;6(1):21–9.
44. Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M, Ohta H. Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 2014;8451(May).
45. Abdulazizahmeedahabee A, Bennisir HAH. Hesperidin An Antioxidant Flavonoid Prevents Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Toxicity In Male Albino Rats. *Journal Innovation Pharmcy Biology Science*. 2018;5(4):127–32.

46. Kuntić V, Brborić J, Holclajtner-Antunović I, Uskoković-Marković S. Evaluating The Bioactive Effects Of Flavonoid Hesperidin – A New Literature Data Survey. *Vojn Pregl.* 2014;71(1):60–5.
47. Lee HJ, Lee WJ, Chang SE, Lee G. Hesperidin , A Popular Antioxidant Inhibits Melanogenesis via Erk1 / 2 Mediated MITF Degradation. *Molecule Science.* 2015;2:18384–95.
48. N.F. D, Yulianti F, Andrini. Kandungan Flavonoid dan Limonoid pada Berbagai Fase Pertumbuhan Tanaman Jeruk Kalamondin (*Citrus mitis* Blanco) dan Purut (*Citrus hystrix* Dc .). *Jurnal Hortikultura.* 2010;20(4):360–7.
49. Karayıldırım ÇK. Characterization and in vitro Evolution of Antibacterial Efficacy of Novel Hesperidin Microemulsion. *Celal Bayar University Journal Science.* 2017;13(4):943–7.
50. Iswandi, I B, R H. (*Citrus sinensis* (L .) Osbeck) Isolation of Hesperidine from Rind of citrus fruits (*Citrus sinensis* (L .) Osbeck). *Fak Farm Univ Setia Budi.* 5(1):9–14.
51. Zhang J, Cui C, Zhang H, Wang S, Liu J, Zhai G. Synthesis, Characterization and Antihyperlipidemic of Rutin-calcium (II) Complex. *Life Science Journal.* 2016;13(8):13–21.
52. Kuersetin-3-o-glikosida (Rutin) dari daun Ubi Karet. *Jurnal Peneliti Sains.* 2005;
53. Al-Dhabi NA, Arasu MV, Park CH, Park SU. An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal.* 2015;14(:59–63.
54. Toxicológica A, Flavanoide DO, No R, Reprodutor S, Wistar DER. Artigo Original Toxicological Evaluation of the Flavonoid Rutin on the Reproductive System of Wistar Rats. *J Artig.* 2015;7–14.
55. Hilmy Nur Hichmah, Rise Desnita SL, Program. Karakteristik Kelarutan Rutin Dari Ekstrak Air Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) Hilmy. *Progr Stud Farm Fak Kedokteran, Univ Tanjungpura Pontianak.* 2010;1–7.
56. Sun Y, Wang J, Gu S, Liu Z, Zhang Y, Zhang X. Simultaneous Determination of Flavonoids in Different Parts of *Citrus reticulata* ‘Chachi’

- Fruit by High Performance Liquid Chromatography—Photodiode Array Detection. *molecules*. 2010;5378–88.
57. Huang H, Li L, Shi W, Liu H, Yang J, Yuan X, et al. The Multifunctional Effects of Nobiletin and Its Metabolites In Vivo and In Vitro. *Evidence-Based Complement Altern Med* Vol. 2016;2016.
58. Arbor A. Safety Data Sheet (Nobiletin). Cayman. 2014;0(1907):11–4.
59. Jen-Yin Chen , Chin Chen Chu S-YC and PDD. Inhibitory Effect on Lipid Accumulation: Comparison between Two Polymethoxyflavones, Tangeretin and Nobiletin, and One Flavonoid, Hesperetin, in 3T3-L1 Adipocytes. *Biomed Journal Science Technology Resourch*. 2018;3(1):3049–53.
60. Morin B, Nichols LA, Zalasky KM, Davis JW, Manthey JA, Holland LJ. The Citrus Flavonoids Hesperetin and Nobiletin Differentially Regulate Low Density Lipoprotein Receptor Gene Transcription in HepG2 Liver Cells. *Journal Nutrition*. 2008;138(7):1274–81.
61. Kementrian Kesehatan RI. Kimia Farmasi. 2016.
62. Soleha TU. Uji Kepekaan terhadap Antibiotik Susceptibility Test of Antimicroba. Bagian Mikrobiol Fak Kedokteran, Univ Lampung. 2015;3–7.
63. Dewi AK. Isolasi , Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap Amoxicillin dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita. *Kedokteran, Fak Mada, Univ Gadjah*. 2013;31(2):138–50.
64. Rahmi Y, Abrar M, Jamin F, Fahrimal Y. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Preputium Dan Vagina Kuda (*Equus caballus*) . *Journal Medicinal Veterenery*. 2015;9(2).
65. Suyono Y, Salahudin F. Pseudomonas Pada Tanah Yang Terindikasi Kontaminasi Logam. *Jornal Biopropal Indonesia*. 2011;(01):8–13.
66. Denis R. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* (*E . coli*) Pada Air Galon Reverse Osmosis (RO) dan Non Reverse Osmosis (Non RO). *Jurnal Gradien*. 2014;10(1):967–71.
67. Nurdin D, Satari MH. Peranan *Enterococcus faecalis* Terhadap Persistensi Infeksi Saluran Akar Gigi. *Fak Kedokt Gigi Univ Padjadjaran*. 2006;

68. Afriyandi D. Standardisasi Simplisia Dan Ekstrak Kulit Buah Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa* Bunge), Penetapan Kadar Hesperidin , Serta Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri. Skripsi Fak Farm Univ Andalas. 2019;
69. Wahyulianingsih W, Handayani S, Malik A. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry). Jurnal Fitofarmaka Indonesia. 2016;3(2):188–93.
70. Rathee D, Rathee S, Rathee P, Deep A, Anandjiwala S, Rathee D. HPTLC densitometric quantification of stigmaterol and lupeol from *Ficus religiosa*. Arab Journal Chemistry. 2015;8(3):366–71.
71. Chaudari, Y. Swapnibal, C.R Harisha PKP. Pharmacognostical Evaluation of *Citrus jambhiri* Lush. Fruit. Anc Science Life. 2014;32(2):96–9.
72. Any Guntarti, Kholif Sholehah, Nurul Irna WFF. Penentuan Parameter Non spesifik Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana*) Pada Variasi Asal Daerah. Farmasains vol 2. 2015;2(5):202–7.
73. Kim, S., Stebe, M.J., Blin, J.L., and Pasc, A. pH-controlled Delivery of Curcumin From a Compartmentalized Solid Lipid Nanoparticle-Mesostructured Silica Matrix. Journal Master Chemistry B,. 2014;7910–7917.
74. AOAC International. AOAC Official Methods of Analysis - Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. 2013;32.
75. Armin F, Revira B, Adnan AZ. Development and Validation Of Thin Layer Chromatography-Densitometry Method for Determination and Quantification of Synthetic Red Coloring Agent in Sauce Sambel Sachet. J Sains Farm Klin. 2015;2(1):60.
76. Gandjar IG, Rohman A. Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta: Pustaka Pelajar; 2008.
77. BPOM. Persyaratan Mutu Obat Tradisional. Bpom. 2014;1–16.
78. Voight R. Teknologi Farmasi. Noerono S, editor. Yogyakarta: UGM; 1994.
79. Davis W, T RS. Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay. Microbiology. 1971;22:659–65.

Lampiran 1. Data Penelitian

1.1. Hasil identifikasi tanaman



HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang Sumbar
Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 ext. *811 e-mail: nas_herb@yahoo.com;
herbariumandaunand@gmail.com

Nomor : 405/K-ID/ANDA/X/2019
Lampiran : -
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada yth,
Awaliana
Di
Tempat

Dengan hormat,
Sehubungan dengan surat mengenai bantuan untuk "Identifikasi Tumbuhan" di Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, kami telah membantu mengidentifikasi tumbuhan yang dibawa, atas nama:

Nama : Awaliana
NIM : 1611012029
Instansi : Farmasi - UNAND

Berikut ini diberikan hasil identifikasi yang dikeluarkan dari Herbarium Universitas Andalas.

No	Family	Spesies
1.	Rutaceae	<i>Citrus x aurantiifolia</i> "sundai"

Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

Padang, 24 Oktober 2019
Kepala,

Dr. Nurainas
NIP. 196908141995122001

1.2.Data Simplisia

Perhitungan kadar sari larut air simplisia

Sampel	Berat Simplisia (g)	Berat Cawan (g)	Berat Sari Larut Air + Cawan			Kadar sari larut air (%)	Rata-rata (%)	Standar Deviasi (%)
			1	2	Perubahan bobot (%)			
Pariaman	5,0806	30,7747	31,0498	31,0239	0,0833	24,5266	24,896 5	0,4528
	5,1808	30,6306	30,9176	30,8938	0,0770	25,4015		
	5,0381	52,2619	52,5388	52,5114	0,0521	24,7613		
Bukittinggi	4,9996	67,3642	67,6911	67,5998	0,1349	23,5619	23,133 8	0,6790
	5,1564	67,2811	67,5287	67,5116	0,0253	22,3509		
	5,0663	70,7083	70,9876	70,9463	0,0582	23,4885		
Solok	5,0811	69,4478	69,6987	69,6815	0,0247	22,9970	23,118 3	0,5848
	5,2779	71,3584	71,6013	71,597	0,0060	22,6037		
	5,1212	80,899	81,1678	81,1423	0,0314	23,7542		

Perhitungan kadar sari larut etanol simplisia

Sampel	Berat Simplisia (g)	Berat Cawan (g)	Berat Sari Larut Etanol + Cawan (g)			Kadar sari larut etanol (%)	Rata-rata (%)	Standar Deviasi (%)
			1	2	Perubahan bobot (%)			
Pariaman	4,9982	30,7747	30,9553	30,9506	0,0152	17,5963	17,6578	0,2117
	5,0533	30,6306	30,8567	30,8073	0,1600	17,4836		
	5,0661	52,2619	52,4713	52,4432	0,0535	17,8934		
Bukittinggi	5,0214	67,3642	67,5481	67,5278	0,0301	16,2903	15,6999	0,9569
	5,0631	67,2811	67,4609	67,4289	0,0474	14,5958		
	5,0606	70,7083	70,8976	70,8724	0,0355	16,2135		
Solok	5,0713	69,4478	69,6523	69,6231	0,0419	17,2835	16,7662	0,7029
	5,0032	71,3584	71,5939	71,529	0,0907	17,0491		
	5,0013	80,899	81,0789	81,0587	0,0249	15,9658		

Nilai susut pengeringan simplisia

	Berat Wadah (g)	Berat Wadah + Simplisia (g)	Berat Wadah + Simplisia Setelah Pemanasan (g)			Nilai Susut Pengerinan (%)	Rata-rata (%)	Standar Deviasi (%)
			1	2	Perubahan Bobot (%)			
Pariaman	25,5873	27,5041	27,4094	27,3914	0,0657	5,8796	5,4498	0,6940
	25,6712	27,6737	27,5846	27,5806	0,0145	4,6492		
	21,4339	23,4165	23,3053	23,3011	0,0180	5,8206		
Bukittinggi	29,0920	31,0595	30,9739	30,9663	0,0245	4,7370	4,8339	0,2817
	19,2199	21,2252	21,1380	21,1219	0,0762	5,1513		
	17,8374	19,8554	19,7677	19,7623	0,0273	4,6135		
Solok	42,4731	44,4035	44,3202	44,3121	0,0183	4,7367	5,6526	0,7951
	31,1265	33,0359	32,9323	32,9203	0,0364	6,0542		
	38,3474	40,3079	40,1943	40,1870	0,0182	6,1668		

Kadar abu total simplisia

	Berat Kurs (g)	Berat Kurs + Simplisia (g)	Berat Kurs + abu (g)			Kadar Abu (%)	Rata-rata (%)	Standar Deviasi (%)
			1	2	Perubahan Bobot(%)			
Pariaman	8,6068	11,6774	8,7412	8,7398	0,0160	4,3314	4,2349	0,0836
	7,7148	10,7258	7,8418	7,8408	0,0127	4,1846		
	7,17	10,1997	7,2978	7,2969	0,0123	4,1885		
Bukittinggi	21,4374	24,4829	21,6091	21,5949	0,0657	5,1716	4,9600	0,4285
	19,1583	22,1895	19,3012	19,2937	0,0388	4,4669		
	19,4636	22,4856	19,6232	19,6220	0,0061	5,2416		
Solok	25,6816	28,6920	25,8428	25,8350	0,0301	5,0957	5,1376	0,0413
	25,5447	28,5573	25,7091	25,7007	0,0327	5,1782		
	19,7388	22,7862	19,8993	19,8954	0,01956	5,1388		

Kadar abu tidak larut asam simplisia

	Berat Kurs (g)	Berat Kurs + Simplisia (g)	Berat Kurs + abu tidak larut asam (g)			Kadar Abu tidak larut asam (%)	Rata-rata (%)	Standar Deviasi (%)
			1	2	Perubahan Bobot(%)			
Pariaman	8,6068	11,6774	8,631	8,6278	0,0370	0,6839	0,7224	0,0351
	7,7148	10,7258	7,7381	7,7368	0,0168	0,7306		
	7,17	10,1997	7,1966	7,1928	0,0528	0,7525		
Bukittinggi	21,4374	24,4829	21,4689	21,4585	0,0484	0,6928	0,7630	0,0660
	19,1583	22,1895	19,185	19,1817	0,0172	0,7720		
	19,4636	22,4856	19,491	19,4885	0,0128	0,8240		
Solok	25,6816	28,692	25,7189	25,7099	0,0350	0,9401	0,8041	0,1186
	25,5447	28,5573	25,5734	25,5673	0,0239	0,7502		
	19,7388	22,7862	19,775	19,7608	0,0718	0,7219		

1.3 Data Ekstrak

Nilai rendemen ekstrak limau sundai

Sampel	Berat Ekstrak yang diperoleh (g)	Berat Simplisia (g)	Randemen (%)
Pariaman	84,42	400,51	21,0781
Bukittinggi	83,45	400,62	20,8302
Solok	75,24	400,12	18,8044

Kadar abu total ekstrak limau sundai

	Berat Kurs (g)	Berat Kurs + ekstrak (g)	Berat Kurs + abu (g)			Kadar Abu (%)	Rata-rata (%)	Standar Deviasi (%)
			1	2	Perubahan Bobot (%)			
Pariaman	32,4609	34,4665	32,5696	32,5216	0,1474	3,0265	3,8655	0,7616
	34,0076	36,2299	34,138	34,1079	0,0882	4,5133		
	44,0098	46,3195	44,1399	44,1035	0,0825	4,0568		
Bukittinggi	38,7397	40,8878	38,8497	38,8323	0,0448	4,3108	3,6015	0,6610
	40,4176	42,5517	40,4994	40,4921	0,0179	3,4909		
	40,6099	42,6714	40,6799	40,6718	0,0199	3,0027		
Solok	32,5536	34,5931	32,6612	32,6532	0,0245	4,8835	3,9294	0,9211
	41,0481	43,3073	41,1254	41,1169	0,0207	3,0453		
	33,0864	35,3485	33,1791	33,1737	0,0163	3,8592		

Kadar abu tidak larut asam ekstrak asam sundai

	Berat Kurs (g)	Berat Kurs + Simplisia (g)	Berat Kurs + abu tidak larut asam (g)			Kadar Abu tidak larut asam (%)	Rata-rata (%)	Standar Deviasi (%)
			1	2	Perubahan Bobot(%)			
Pariaman	32,4609	34,4665	32,479	32,4657	0,0409	0,2393	15,6291	0,9467
	34,0076	36,2299	34,0249	34,0131	0,0347	0,2475		
	44,0098	46,3195	44,0277	44,0166	0,0252	0,2944		
Bukittinggi	38,7397	40,8878	38,761	38,7459	0,0389	0,2886	16,7314	0,9962
	40,4176	42,5517	40,4334	40,4222	0,0277	0,2155		
	40,6099	42,6714	40,6272	40,6155	0,0288	0,2716		
Solok	32,5536	34,5931	32,5697	32,5578	0,0365	0,2059	18,3752	0,8616
	41,0481	43,3073	41,0672	41,0561	0,0270	0,3541		
	33,0864	35,3485	33,1012	33,0919	0,0281	0,2431		

Nilai kadar air ekstrak kulit asam sundai

	Pengulangan	Berat Ekstrak (g)	Volume Air (ml)	Kadar air (%)	Rata-Rata Kadar Air (%)	Standar Deviasi (%)
Pariaman	1	5,5922	0,9	16,0938	15,6291	0,9467
	2	5,5021	0,8	14,5399		
	3	5,5372	0,9	16,2537		
Bukittinggi	1	5,5622	0,9	16,1806	16,7314	0,9962
	2	5,5924	1	17,8814		
	3	5,5789	0,9	16,1322		
Solok	1	5,5994	1	17,859	18,3752	0,8616
	2	5,5876	1	17,8967		
	3	5,6789	1,1	19,3699		

1.4. Data aktivitas antibakteri ekstrak asam sundai

Sampel	Bakteri	Kontrol Positif	Kontrol Negatif	Zona Hambat pada Konsentrasi (mm)		Rata-rata		Standar Deviasi	
				20 %	15%	20%	15%	20%	15%
Bukittinggi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,4	-	6,8	6,4	6,8	6,4333	0,1	0,0577
		24,6	-	6,7	6,4				
		24,4	-	6,9	6,5				
	<i>Escherichia coli</i>	24,6	-	6,8	6,3	6,7	6,3	0,1732	0,1
		24,4	-	6,5	6,2				
		24,6	-	6,8	6,4				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	24,5	-	6,7	6,3	6,7	6,2667	0,1	0,0577
		24,5	-	6,8	6,2				
		24,4	-	6,6	6,3				
<i>Enterococcus faecalis</i>	24,6	-	6,8	6,3	6,7333	6,4	0,1155	0,1	
	24,5	-	6,6	6,5					
	24,7	-	6,8	6,4					
Pariaman	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,4	-	6,4	6,1	6,5	6,2333	0,1	0,1154
		24,4	-	6,6	6,3				
		24,5	-	6,5	6,3				
	<i>Escherichia coli</i>	24,6	-	6,4	6,1	6,6333	6,2333	0,2082	0,2309
		24,4	-	6,8	6,1				
		24,4	-	6,7	6,5				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	24,5	-	6,4	6,1	6,4667	6,1667	0,0577	0,0577
		24,5	-	6,5	6,2				
		24,4	-	6,5	6,2				
<i>Enterococcus faecalis</i>	24,7	-	6,8	6,6	6,8333	6,5	0,0577	0,1	
	24,6	-	6,8	6,5					
	24,5	-	6,9	6,4					
Solok	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,6	-	7,5	6,5	7,6	6,6	0,1	0,1
		24,5	-	7,7	6,7				
		24,4	-	7,6	6,6				
	<i>Escherichia coli</i>	24,4	-	7	6,4	7,3333	6,3333	0,3055	0,1155
		24,4	-	7,4	6,2				
		24,6	-	7,6	6,4				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	24,5	-	7,6	6,8	7,7	6,6667	0,1	0,1527
		24,5	-	7,7	6,7				
		24,4	-	7,8	6,5				
<i>Enterococcus faecalis</i>	24,7	-	7,5	6,6	7,5333	6,6333	0,0577	0,1527	
	24,6	-	7,6	6,8					
	24,5	-	7,5	6,5					

Lampiran 2. Rumus dan Perhitungan

a. Contoh Rumus dan Perhitungan Perubahan Bobot

Rumus :

$$\text{Perubahan bobot} = \frac{\text{Berat 1} - \text{Berat 2}}{\text{Berat 1}} \times 100\%$$

Keterangan : Berat 1 = Berat setelah pemanasan atau pemijaran

Berat 2 = Berat setelah pemanasan atau pemijaran kembali

Contoh perhitungan :

Berat wadah + simplisia setelah pemanasan 1 = 27,4094 g

Berat wadah + simplisia setelah pemanasan 2 = 27,3914 g

$$\text{Perubahan Bobot} = \frac{27,4094 - 27,3914}{27,4094} \times 100\% = 0,0657\%$$

b. Contoh Rumus dan Perhitungan Nilai Susut Pengerinan

Rumus :

$$\begin{aligned} &\text{Nilai susut pengerinan} \\ &= \frac{((\text{Berat wadah} + \text{simplisia}) - (\text{Berat wadah})) - ((\text{Berat wadah} + \text{simplisia setelah pemanasan 2}) - (\text{Berat wadah}))}{((\text{Berat wadah} + \text{simplisia}) - (\text{Berat wadah}))} \times 100\% \end{aligned}$$

Contoh perhitungan :

Berat wadah + simplisia = 27,5041 g

Berat wadah = 25,5873 g

Berat wadah + simplisia setelah pemanasan 2 = 27,3914 g

$$\begin{aligned} \text{Nilai susut pengerinan} &= \frac{(27,5041 - 25,5873) - (27,3914 - 25,5873)}{(27,5041 - 25,5873)} \times 100\% \\ &= 5,8796\% \end{aligned}$$

c. Contoh Rumus dan Perhitungan Kadar Abu Total dan Abu Tidak Larut Asam

Rumus :

Kadar abu

$$= \frac{((\text{Berat kurs + sampel}) - (\text{Berat kurs})) - ((\text{Berat kurs + abu setelah pemanasan 2}) - (\text{Berat kurs}))}{((\text{Berat kurs + sampel}) - (\text{Berat kurs}))} \times 100\%$$

Kadar abu tidak larut asam

$$= \frac{((\text{Berat kurs + sampel}) - (\text{Berat kurs})) - ((\text{Berat kurs + abu tidak larut asam setelah pemanasan 2}) - (\text{Berat kurs}))}{((\text{Berat kurs + sampel}) - (\text{Berat kurs}))} \times 100\%$$

Contoh perhitungan :

$$\text{Berat kurs + sampel} = 11,6774 \text{ g}$$

$$\text{Berat kurs} = 8,6068 \text{ g}$$

$$\text{Berat kurs + abu setelah pemanasan 2} = 8,7398 \text{ g}$$

$$\text{Berat kurs + abu tidak larut asam setelah pemanasan 2} = 8,6278 \text{ g}$$

$$\text{Kadar abu} = \frac{(11,6774 - 8,6068) - (8,7398 - 8,6068)}{(11,6774 - 8,6068)} \times 100\% = 5,4498\%$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar abu tidak larut asam} &= \frac{(11,6774 - 8,6068) - (8,6278 - 8,6068)}{(11,6774 - 8,6068)} \times 100\% \\ &= 0,6839\% \end{aligned}$$

d. Contoh Rumus dan Perhitungan Kadar Sari Larut Air atau Etanol

Rumus :

$$\text{Kadar sari} = \frac{(\text{Berat sari + cawan 2}) - \text{Berat cawan}}{\text{Berat simplisia}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

Contoh perhitungan :

$$\text{Berat simplisia} = 5,0806 \text{ g}$$

$$\text{Berat cawan} = 30,7747 \text{ g}$$

$$\text{Berat sari larut air + cawan 2} = 31,0239 \text{ g}$$

$$\text{Kadar sari larut air} = \frac{31,0239 - 30,7747}{5,0806} \times \frac{100}{20} \times 100\% = 24,5266\%$$

e. Contoh Rumus dan Perhitungan Nilai Randemen

Rumus :

$$\text{Nilai randemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat simplisia}} \times 100 \%$$

Contoh perhitungan :

$$\text{Berat ekstrak yang diperoleh} = 84,42 \text{ g}$$

$$\text{Berat simplisia} = 400,51 \text{ g}$$

$$\text{Nilai Randemen} = \frac{84,42}{400,51} \times 100 \% = 21,0781 \%$$

f. Contoh Rumus dan Perhitungan Kadar Air

Rumus :

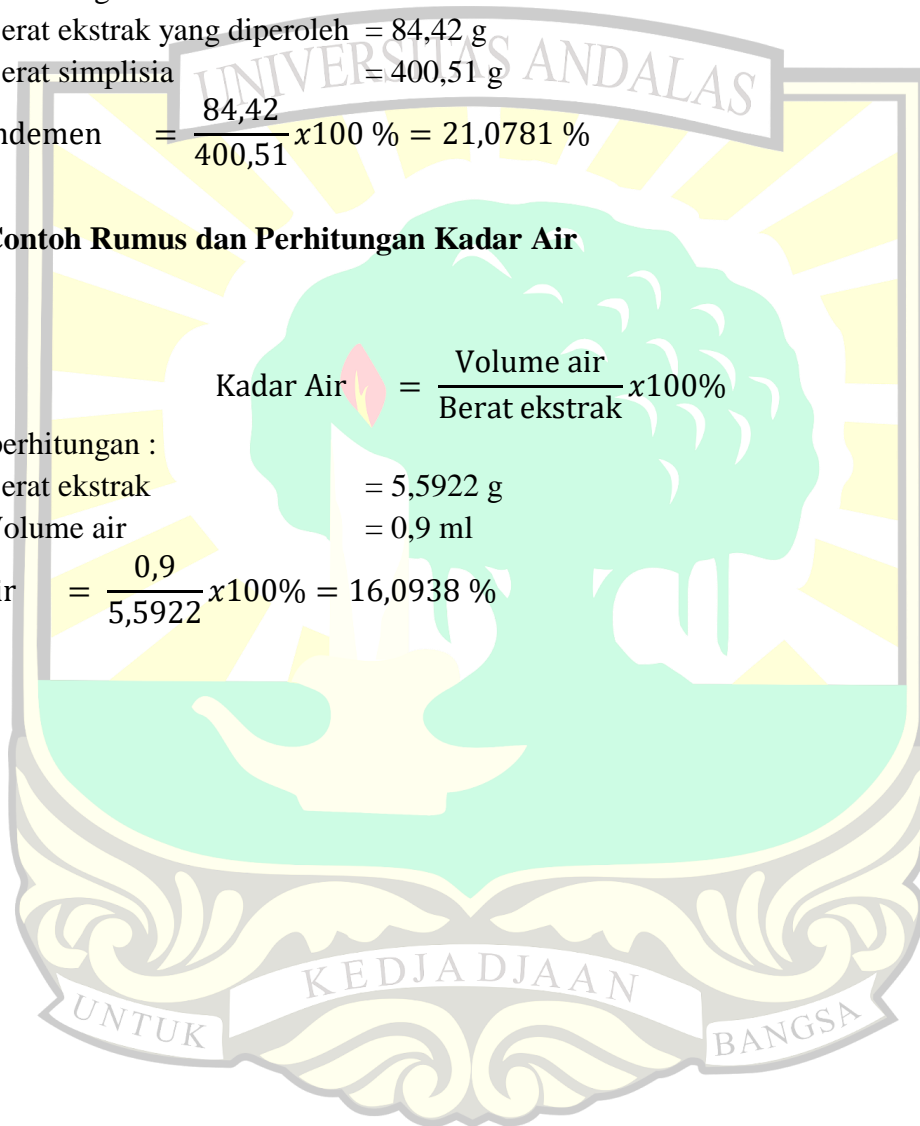
$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{Volume air}}{\text{Berat ekstrak}} \times 100\%$$

Contoh perhitungan :

$$\text{Berat ekstrak} = 5,5922 \text{ g}$$

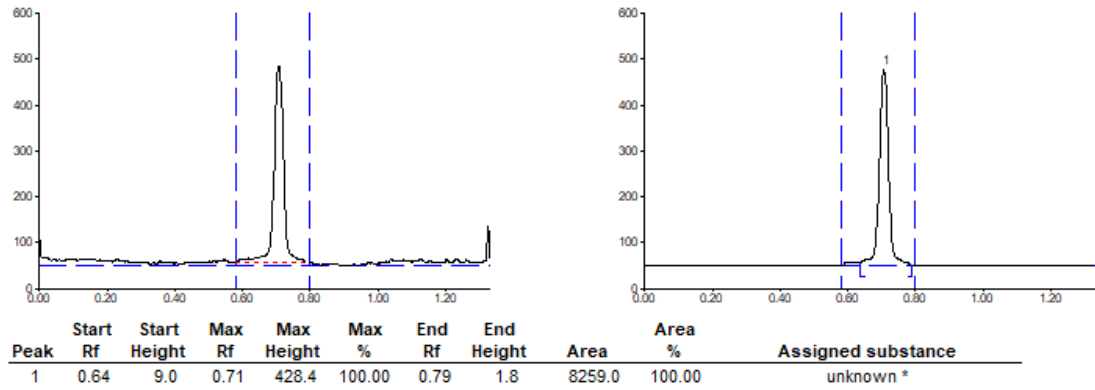
$$\text{Volume air} = 0,9 \text{ ml}$$

$$\text{Kadar Air} = \frac{0,9}{5,5922} \times 100\% = 16,0938 \%$$

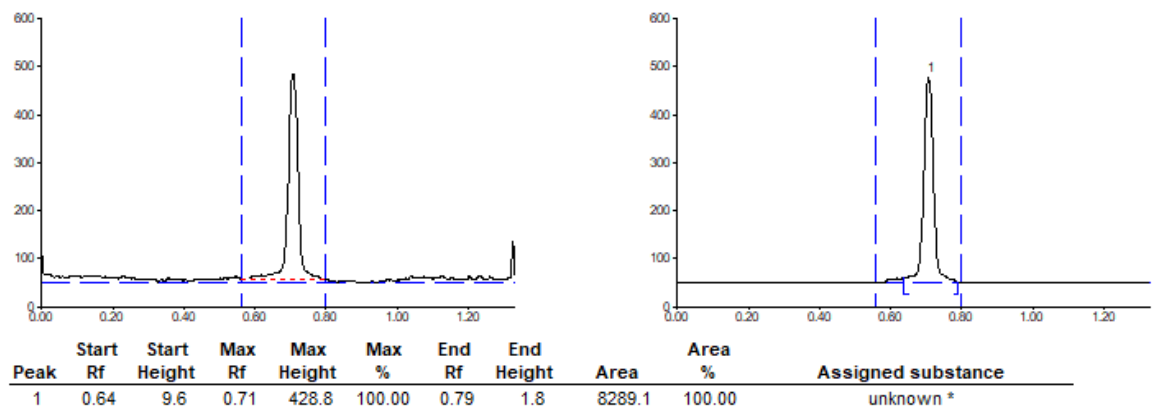


Lampiran 3. Data Penunjang dan Skema Kerja

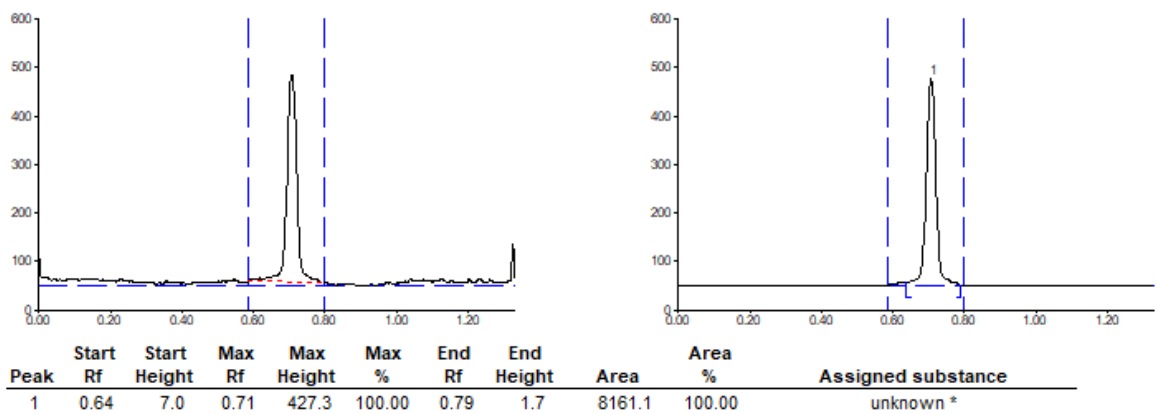
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 20 ppm Track 1



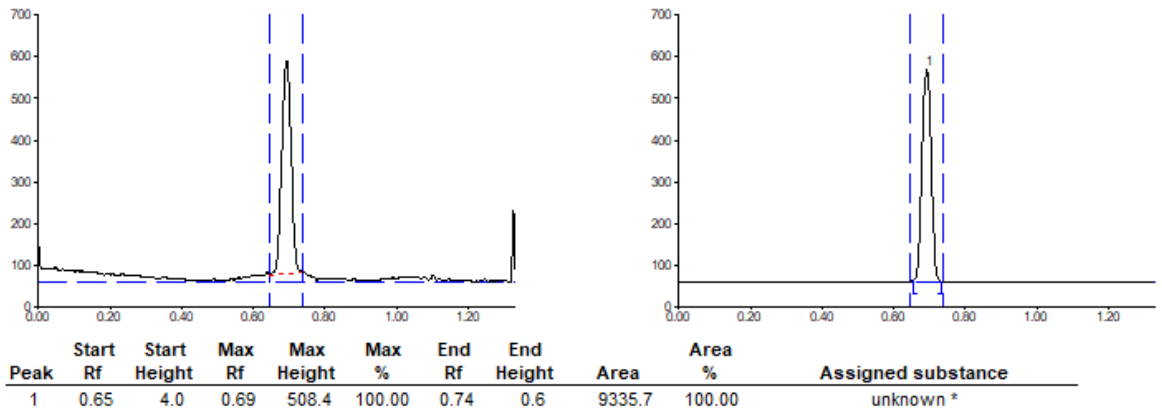
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 20 ppm Track 2



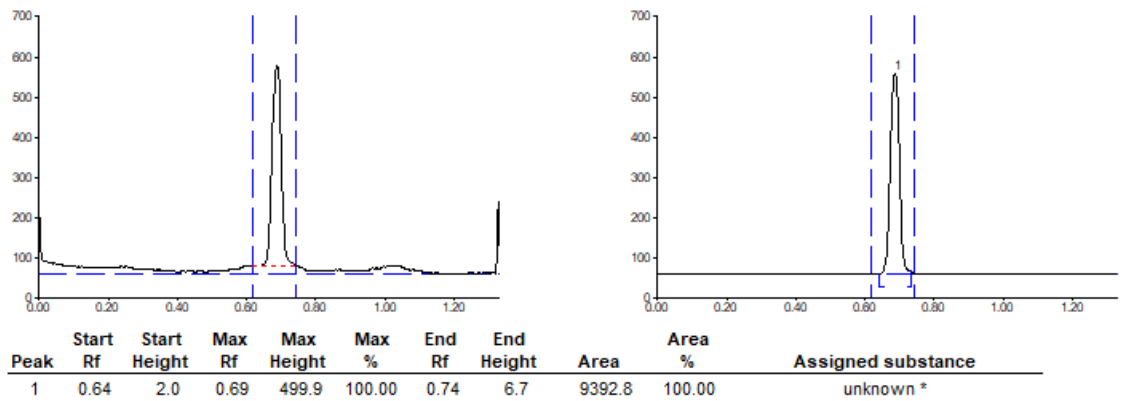
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 20 ppm Track 3



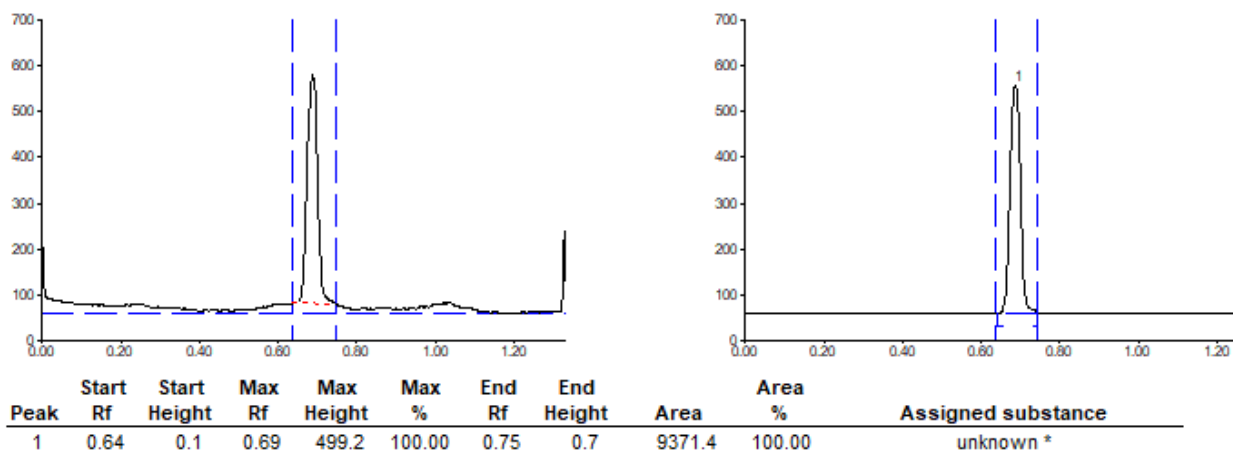
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 30 ppm Track 1



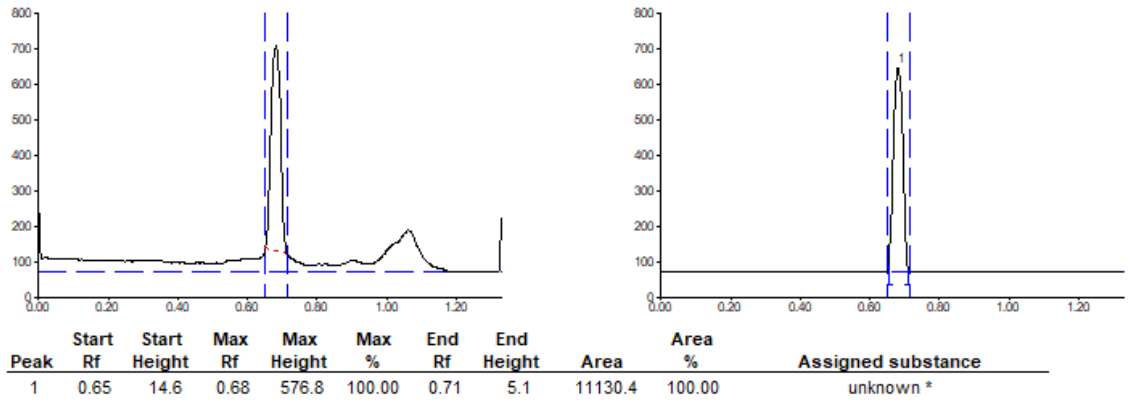
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 30 ppm Track 2



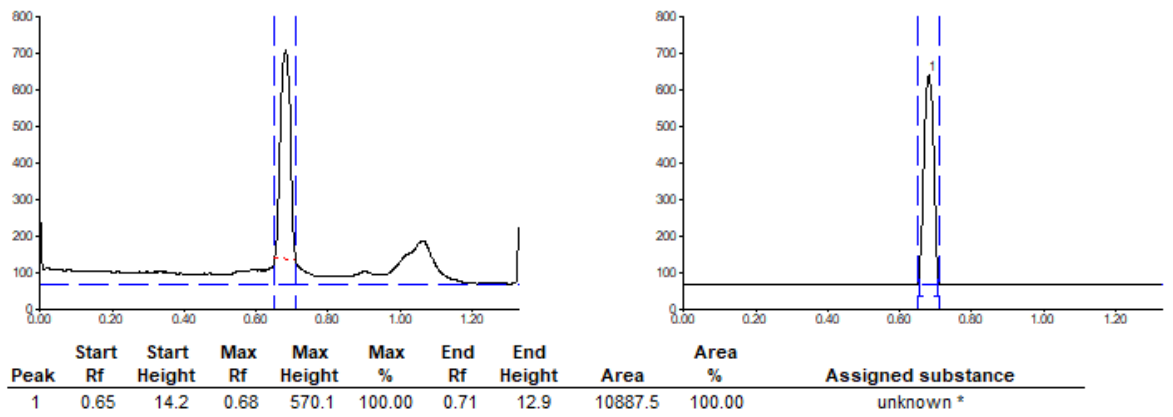
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 30 ppm Track 3



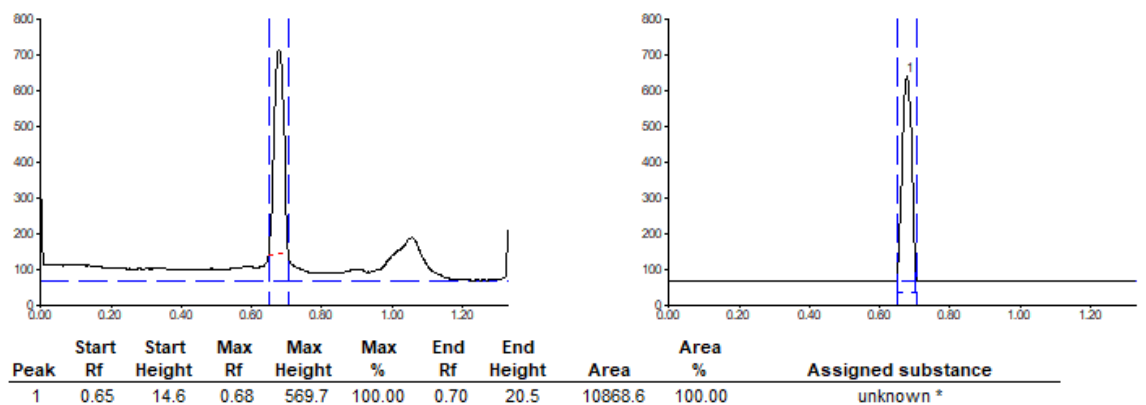
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 50 ppm Track 1



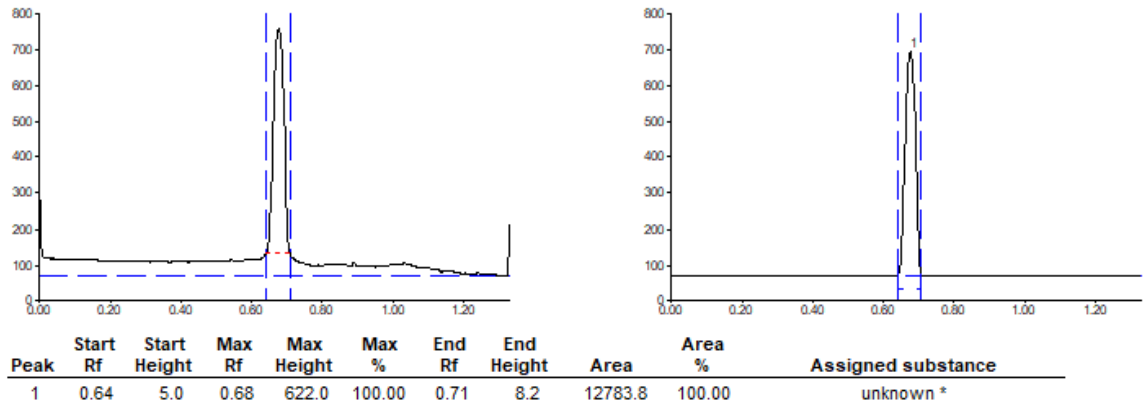
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 50 ppm Track 2



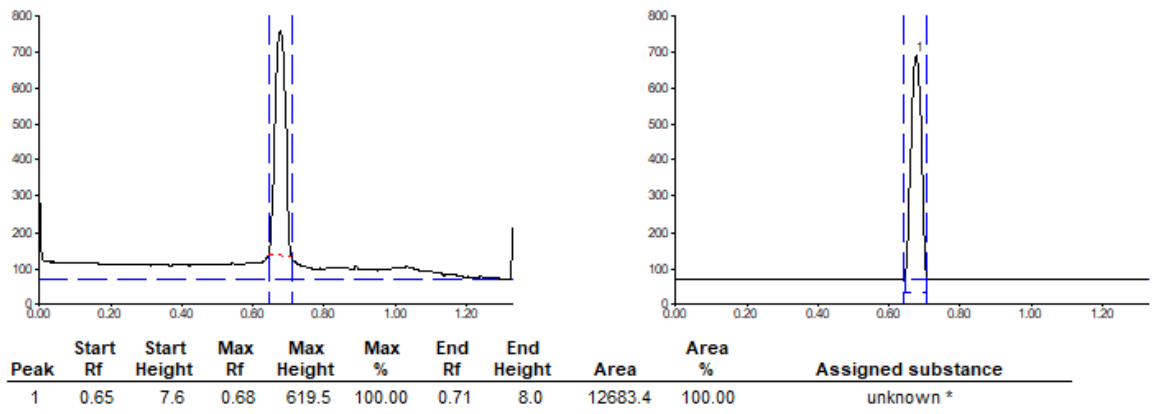
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 50 ppm Track 3



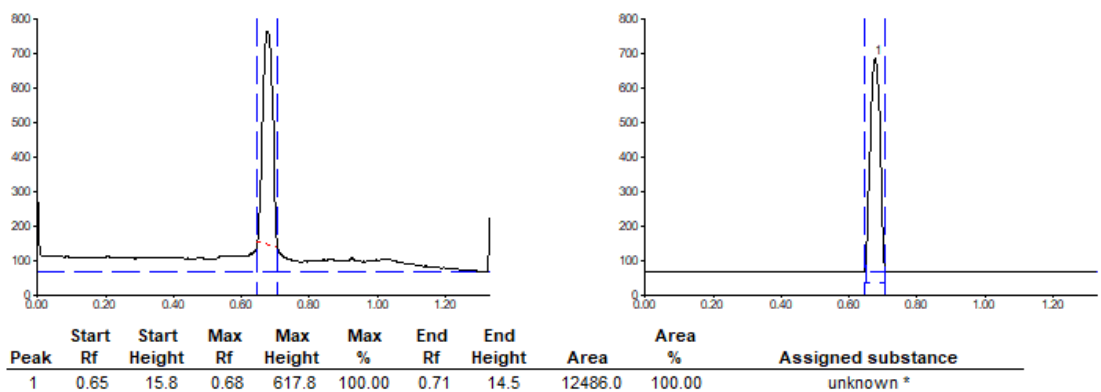
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 60 ppm Track 1



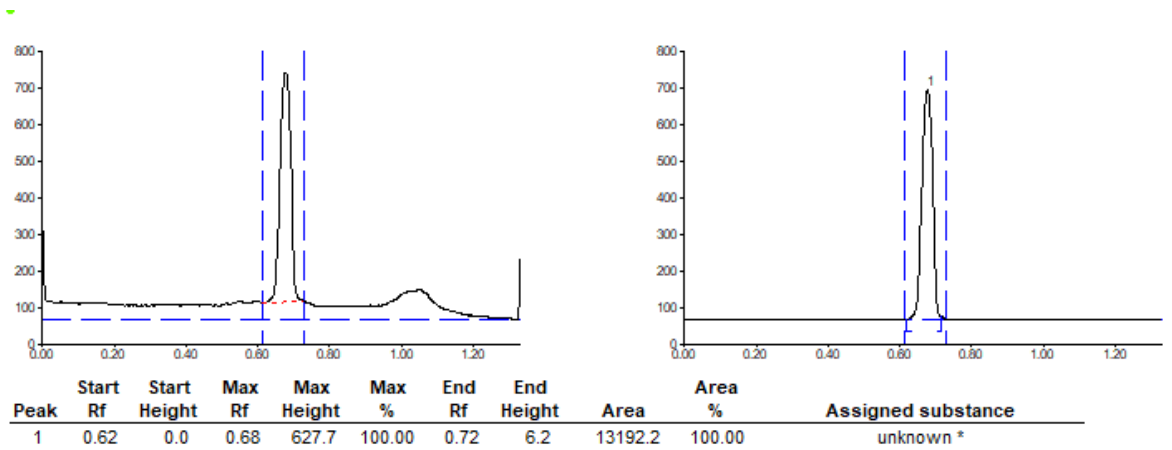
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 60 ppm Track 2



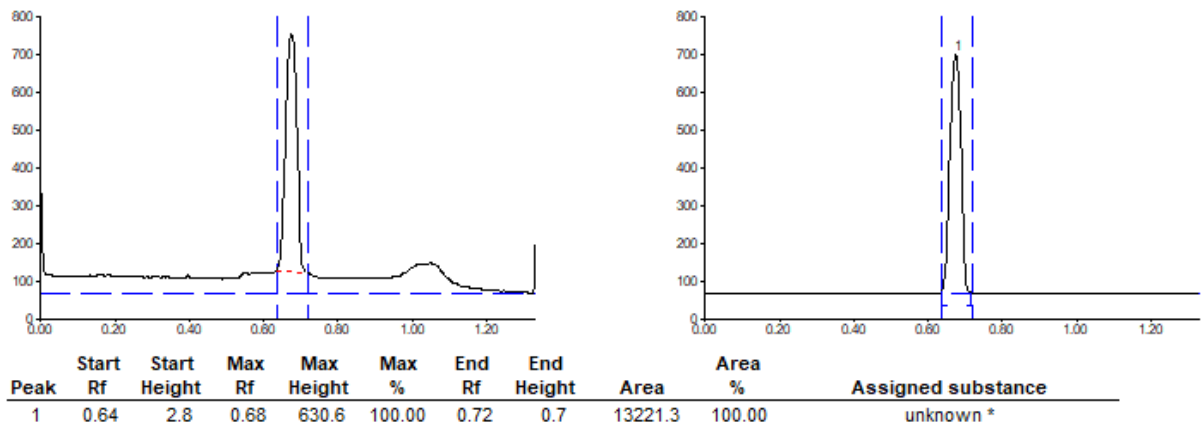
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 60 ppm Track 3



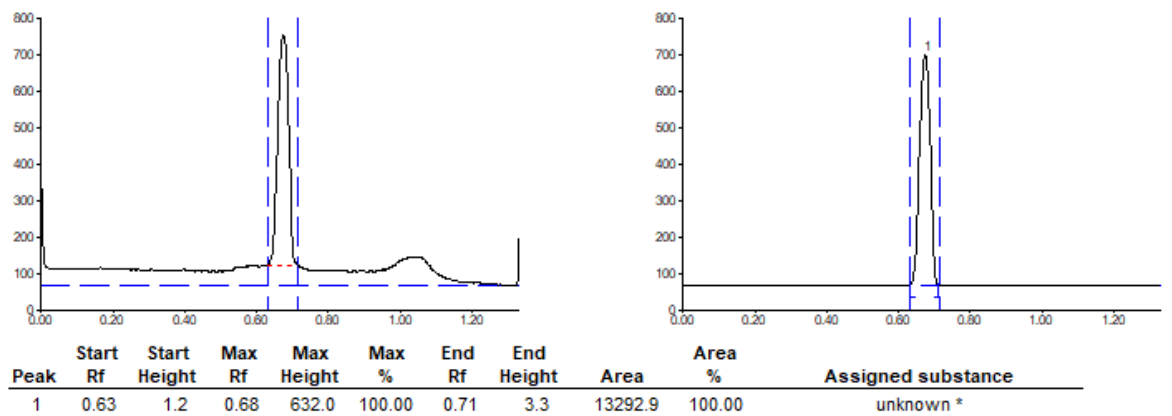
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 70 ppm Track 1



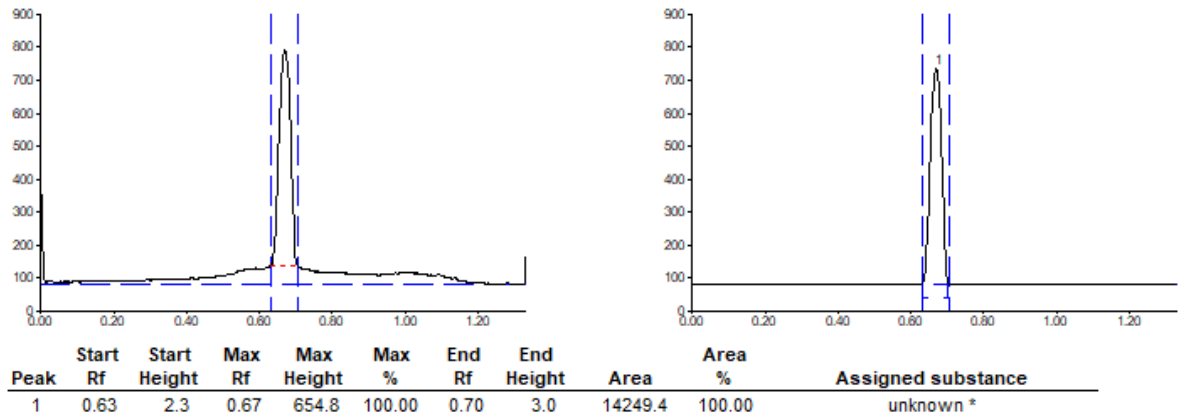
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 70 ppm Track 2



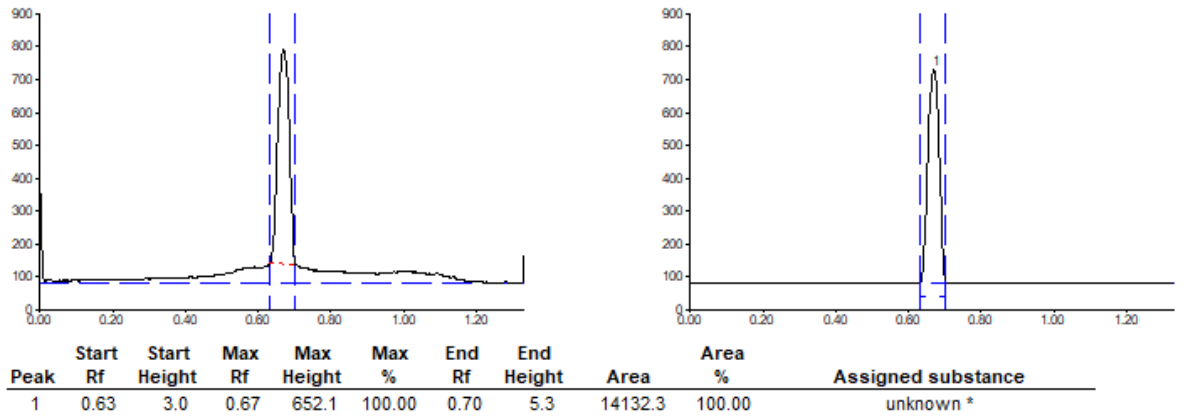
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 70 ppm Track 3



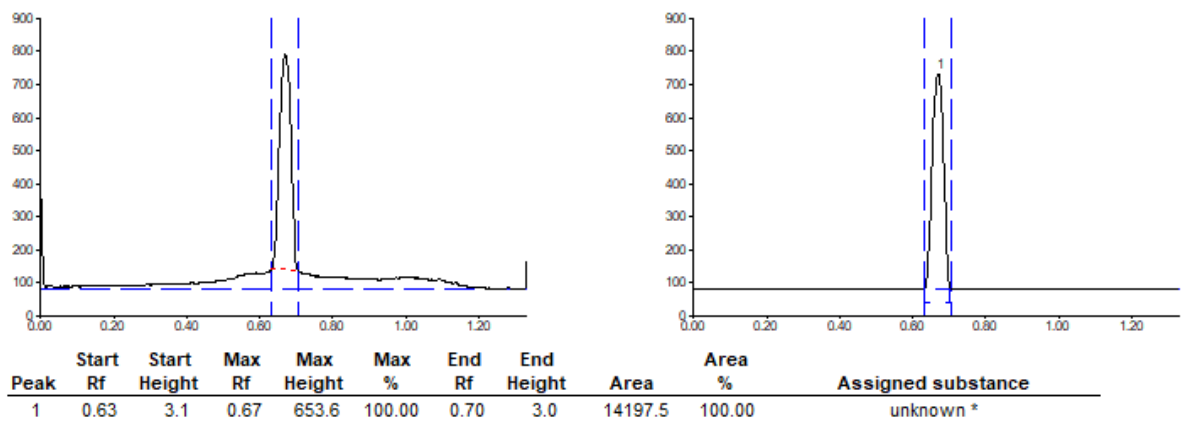
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 80 ppm Track 1



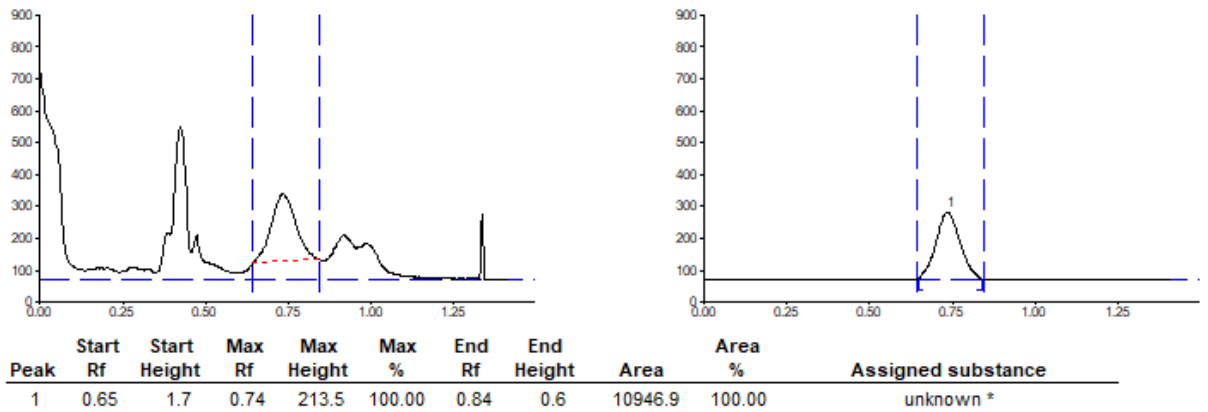
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 80 ppm Track 2



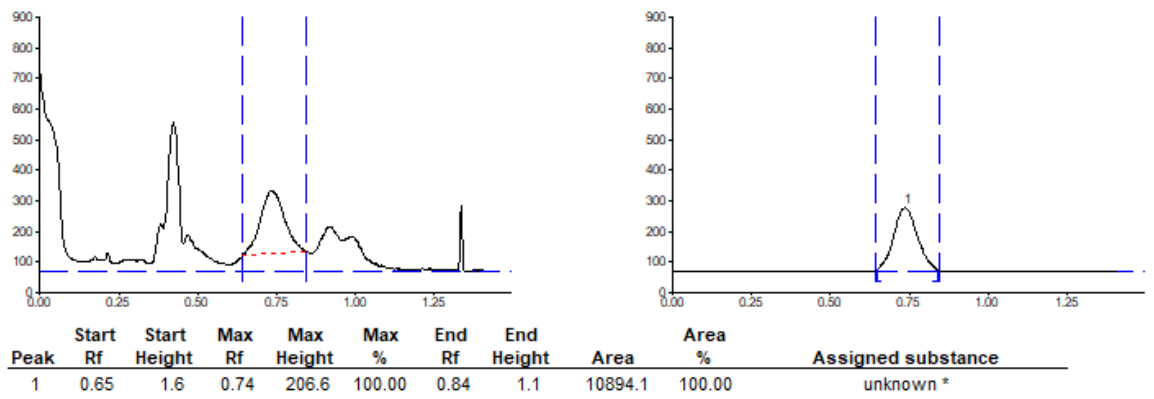
Histogram Kurva Kalibrasi Konsentrasi 80 ppm Track 3



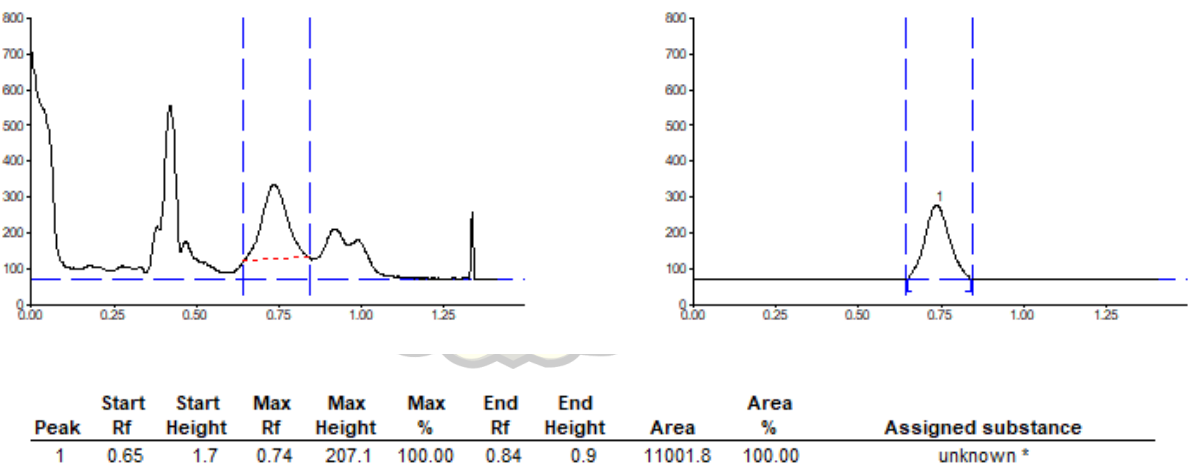
Histogram penetapan kadar nobiletin Bukittinggi track 1



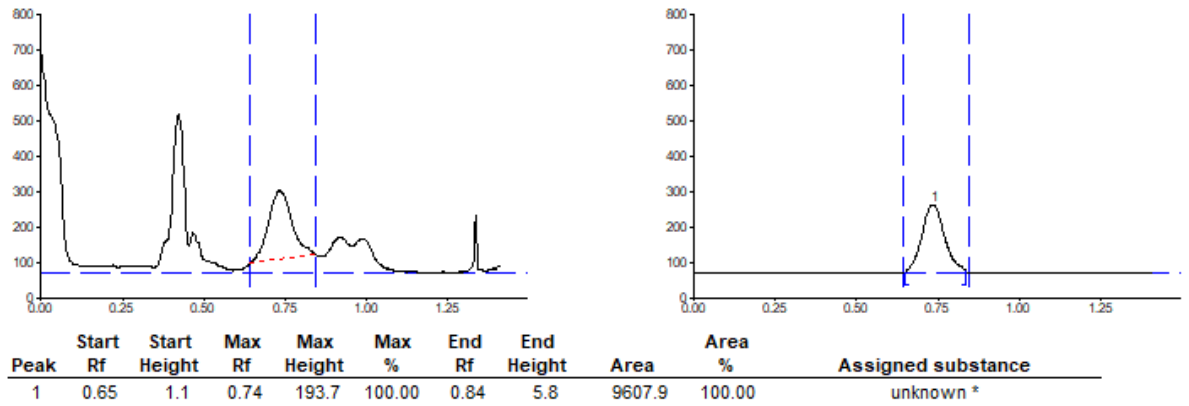
Histogram penetapan kadar nobiletin Bukittinggi track 2



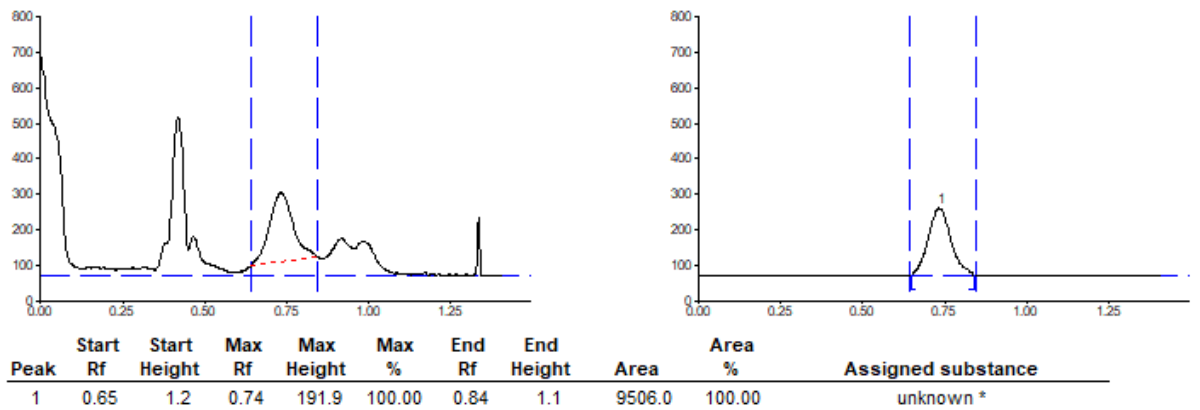
Histogram penetapan kadar nobiletin Bukittinggi track 3



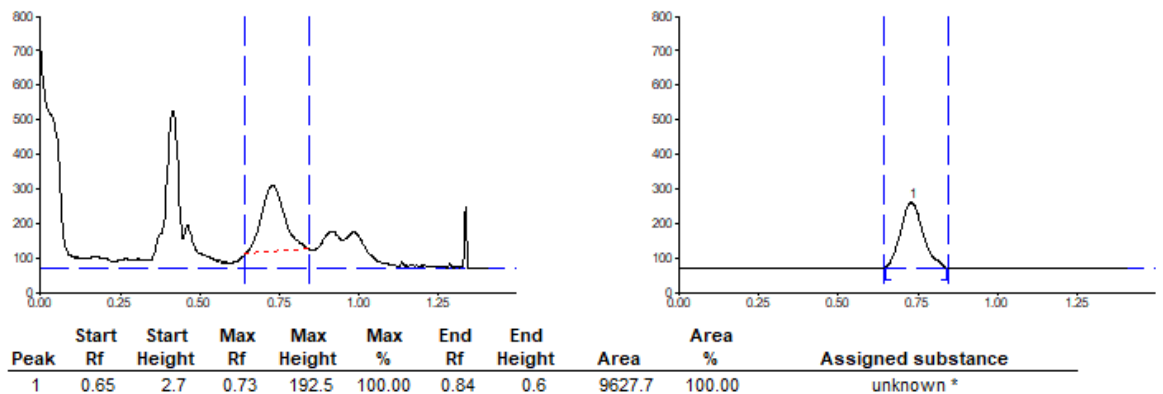
Histogram Penetapan kadar Pariaman Track 1



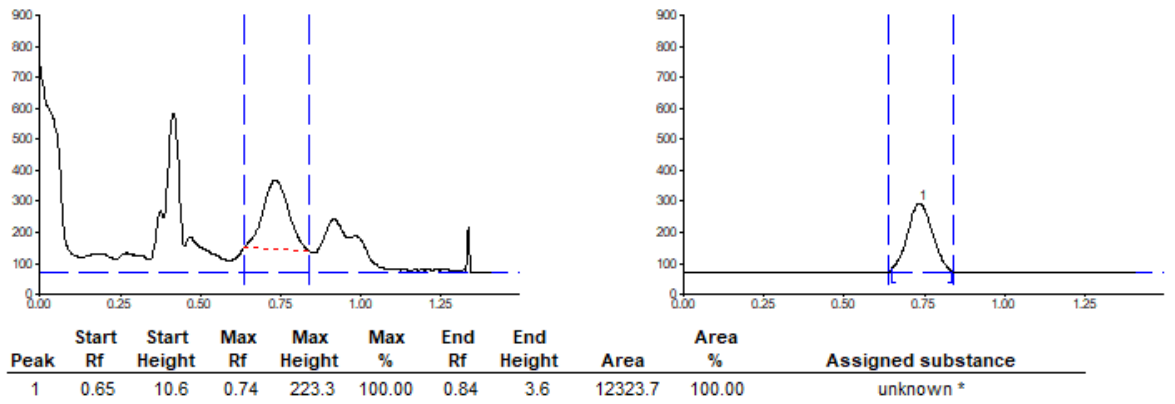
Histogram Penetapan kadar pariaman Track 2



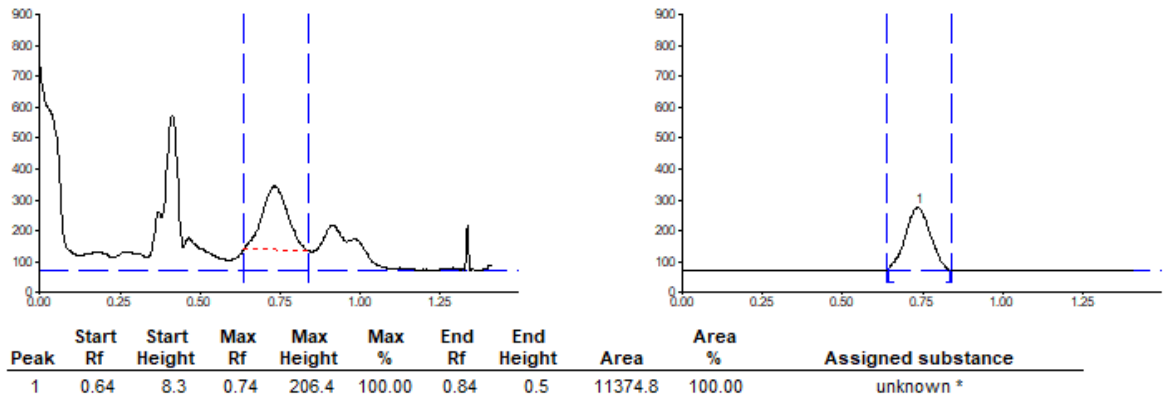
Histogram Penetapan kadar pariaman Track 3



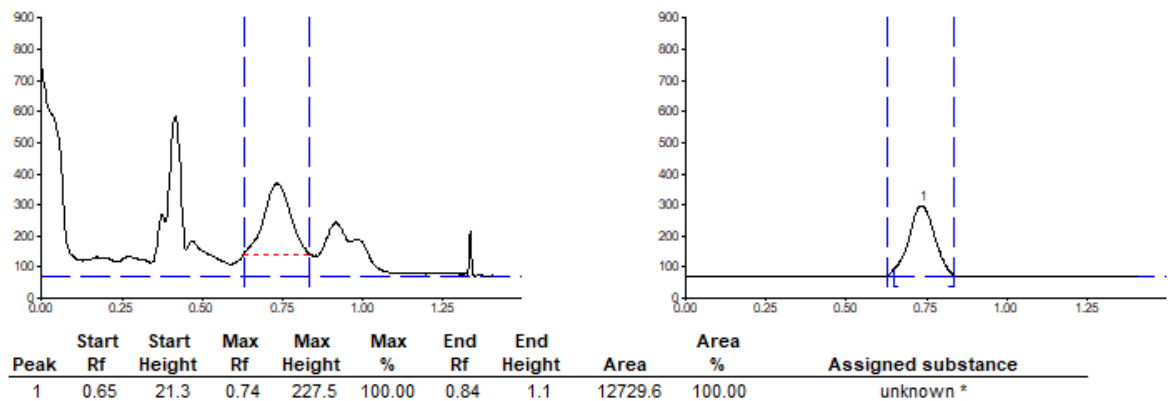
Histogram Penetapan kadar solok Track 1



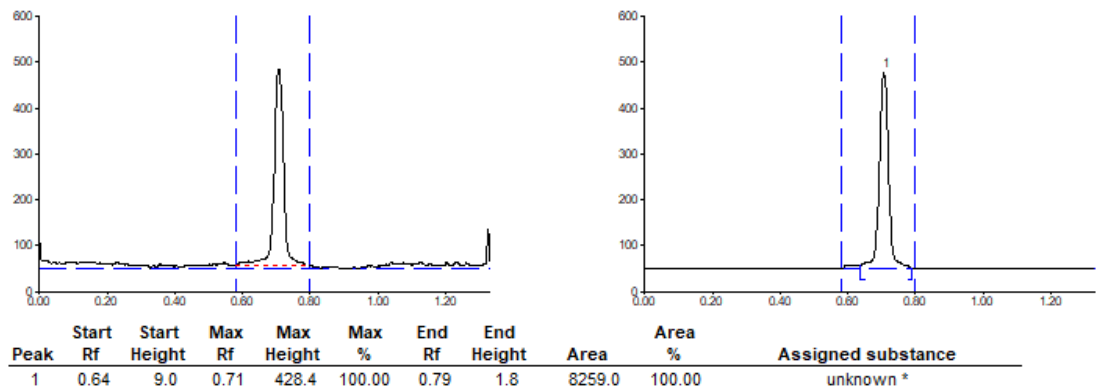
Histogram Penetapan kadar solok Track 2



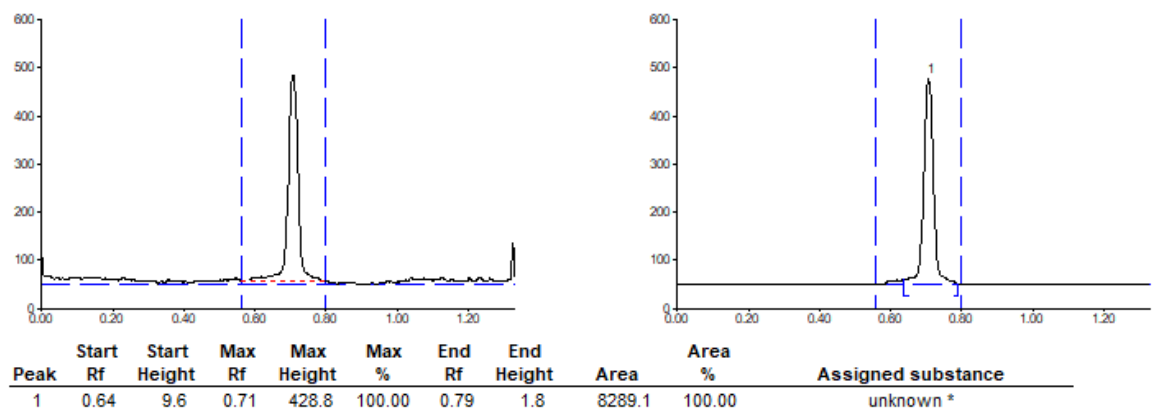
Histogram Penetapan kadar solok Track 3



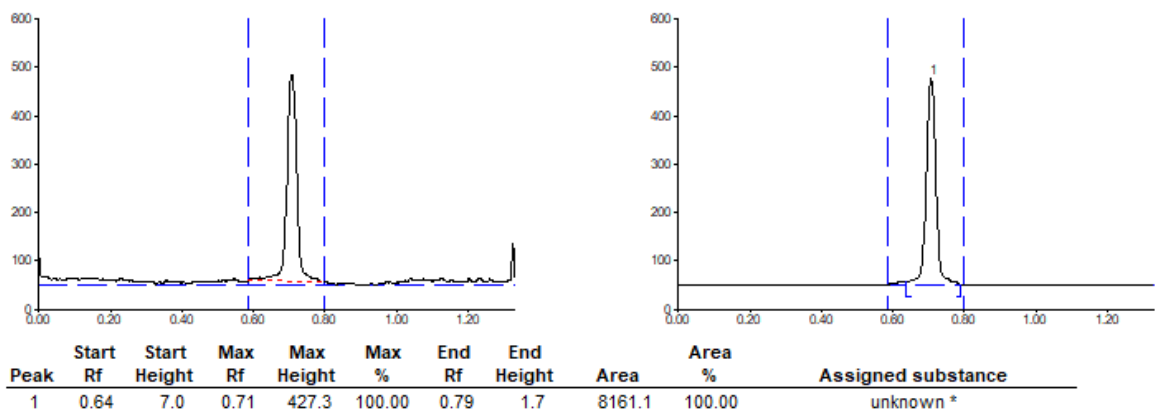
Histogram Akurasi Presisi Konsentrasi 20 ppm Track 1



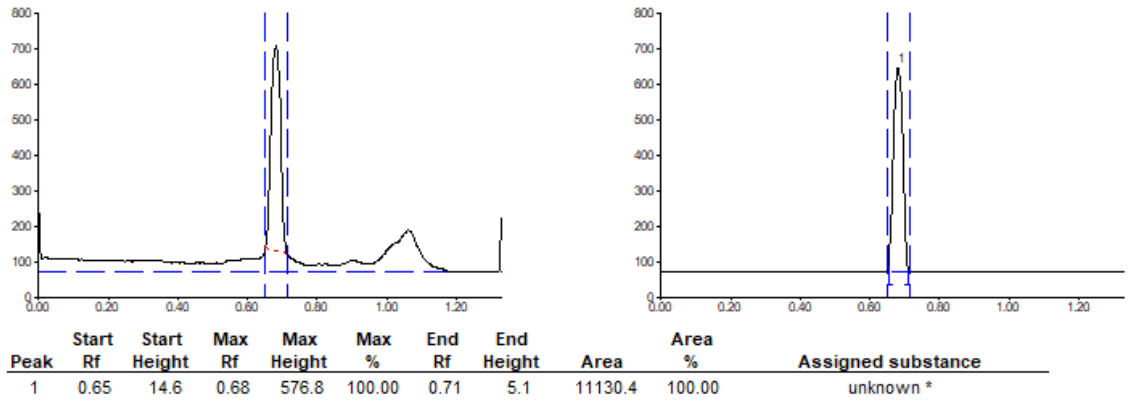
Histogram Akurasi Presisi Konsentrasi 20 ppm Track 2



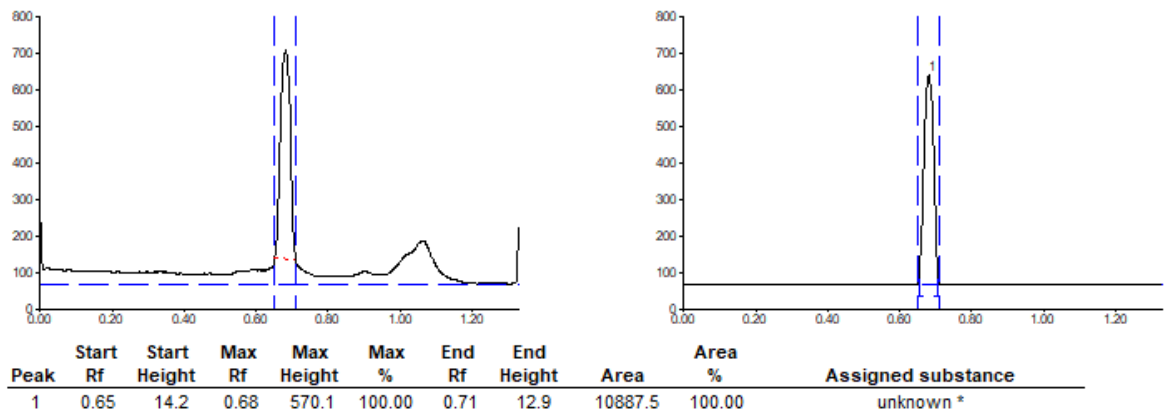
Histogram Akurasi Presisi Konsentrasi 20 ppm Track 3



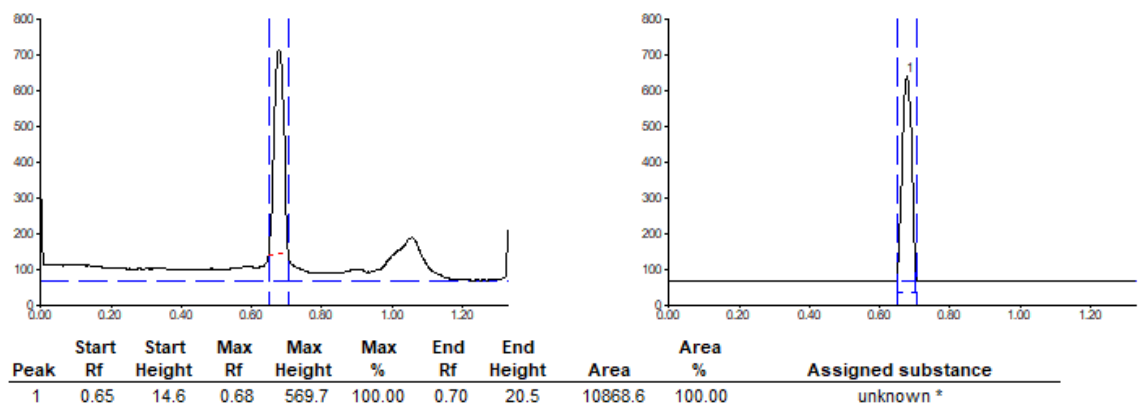
Histogram Akurasi Presisi Konsentrasi 50 ppm Track 1



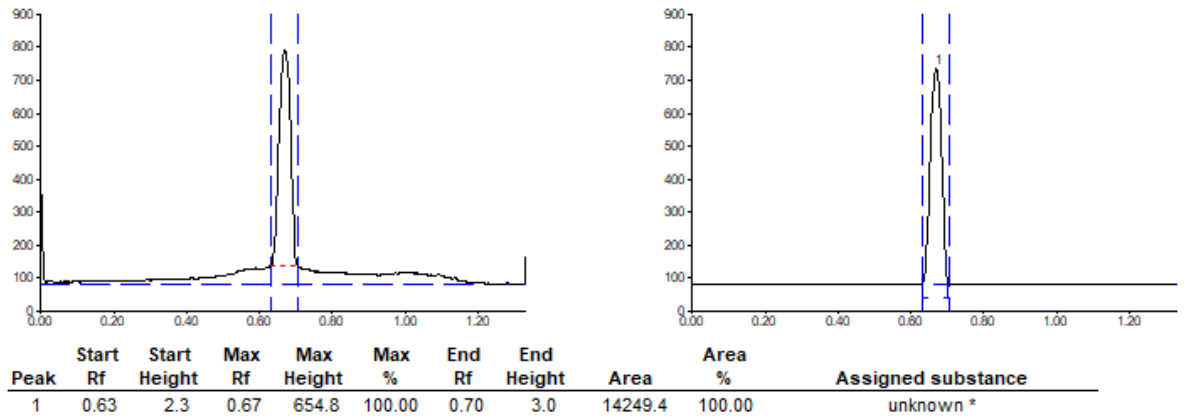
Histogram Akurasi Presisi Konsentrasi 50 ppm Track 2



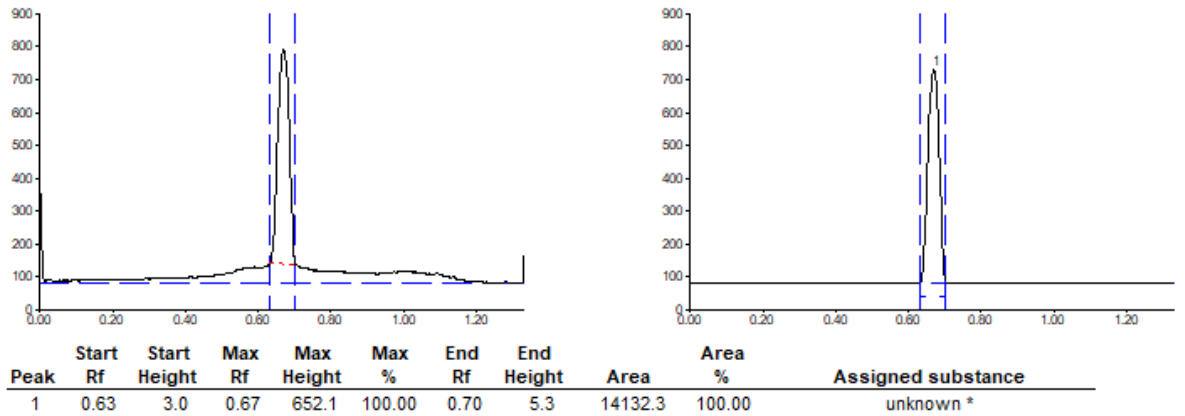
Histogram Akurasi Presisi Konsentrasi 50 ppm Track 3



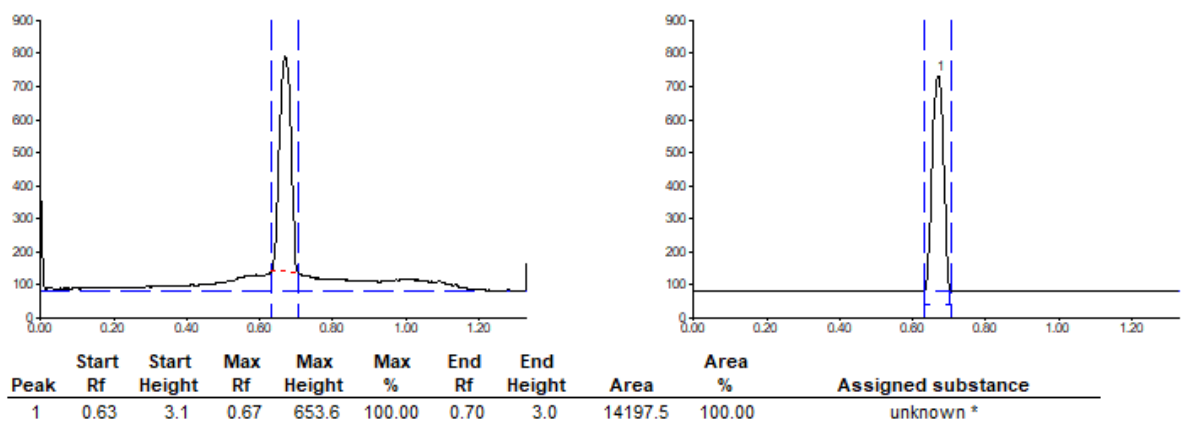
Histogram Akurasi Presisi Konsentrasi 80 ppm Track 1

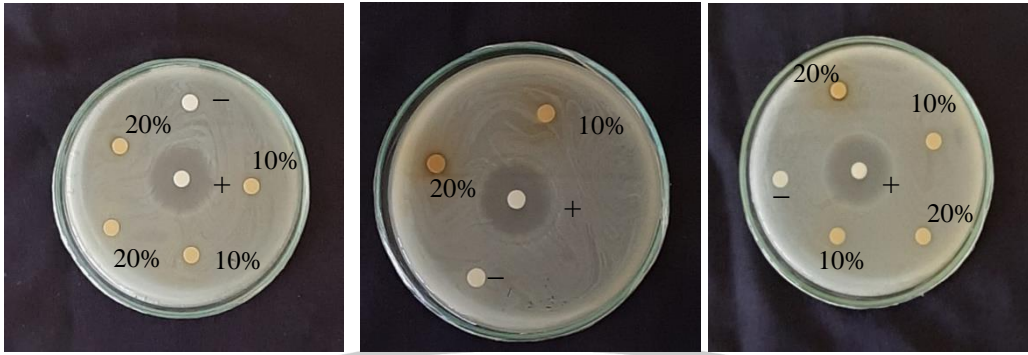


Histogram Akurasi Presisi Konsentrasi 80 ppm Track 2



Histogram Akurasi Presisi Konsentrasi 80 ppm Track 3



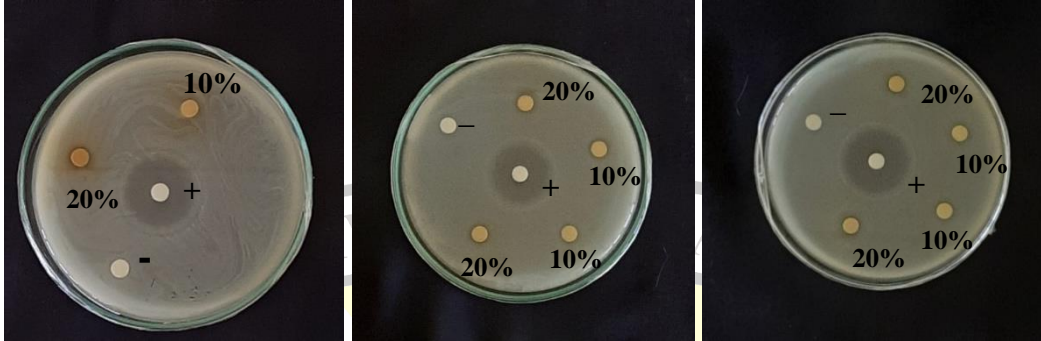


(a) Bukittinggi dan Pariaman (b) Solok (c) Solok dan Bukittinggi



(d) Bukittinggi dan Pariaman (e) Bukittinggi dan Solok

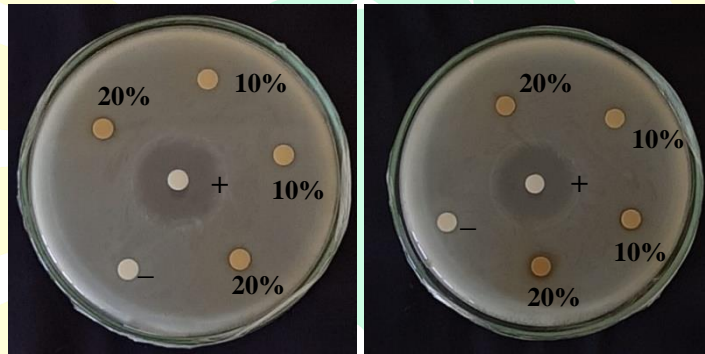
Gambar 63. Uji aktivitas ekstrak pada bakteri *E. Coli*



(a) Solok

(b) Solok dan pariaman

(c) Bukittinggi dan Pariaman

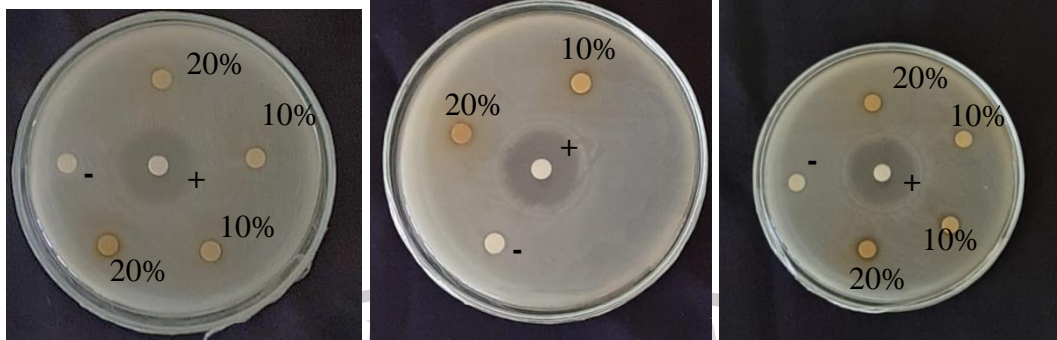


(d) Bukittinggi dan Pariaman

(e) Bukittinggi dan Solok

Gambar 64. Uji aktivitas ekstrak pada bakteri *E.Fecalis*

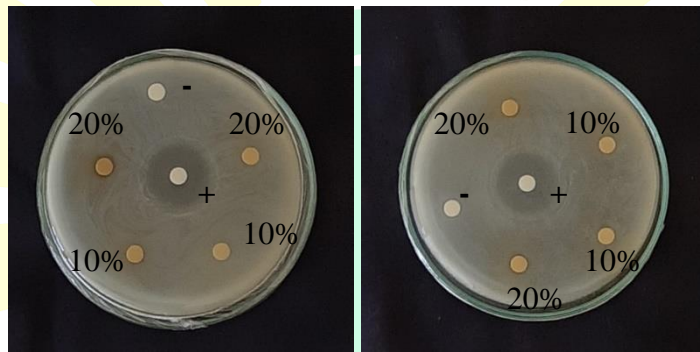




(a) Bukittinggi dan Solok

(b) Solok

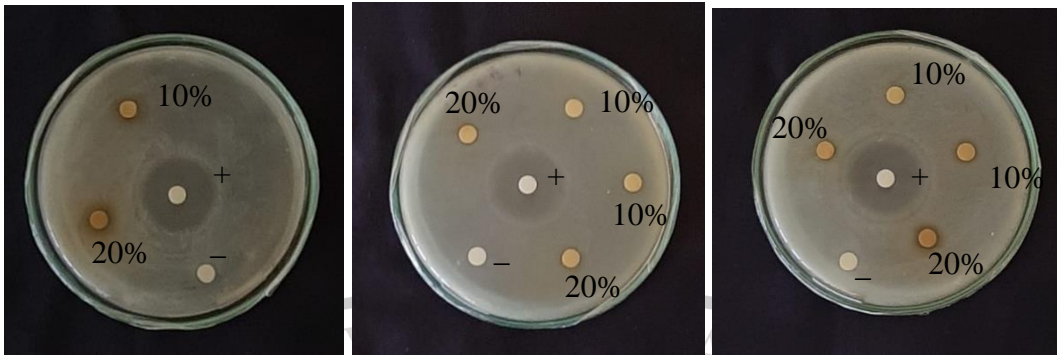
(c) Pariaman dan Solok



(d) Bukittinggi dan Pariaman (e) Bukittinggi dan Pariaman

Gambar 65. Uji aktivitas ekstrak pada bakteri *P.aeruginosa*

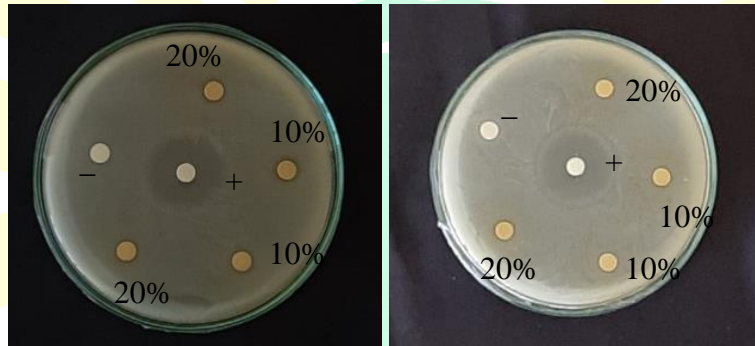




(a) Solok

(b) Bukittinggi dan Pariaman

(c) Bukittinggi dan Solok



(d) Pariaman dan Solok

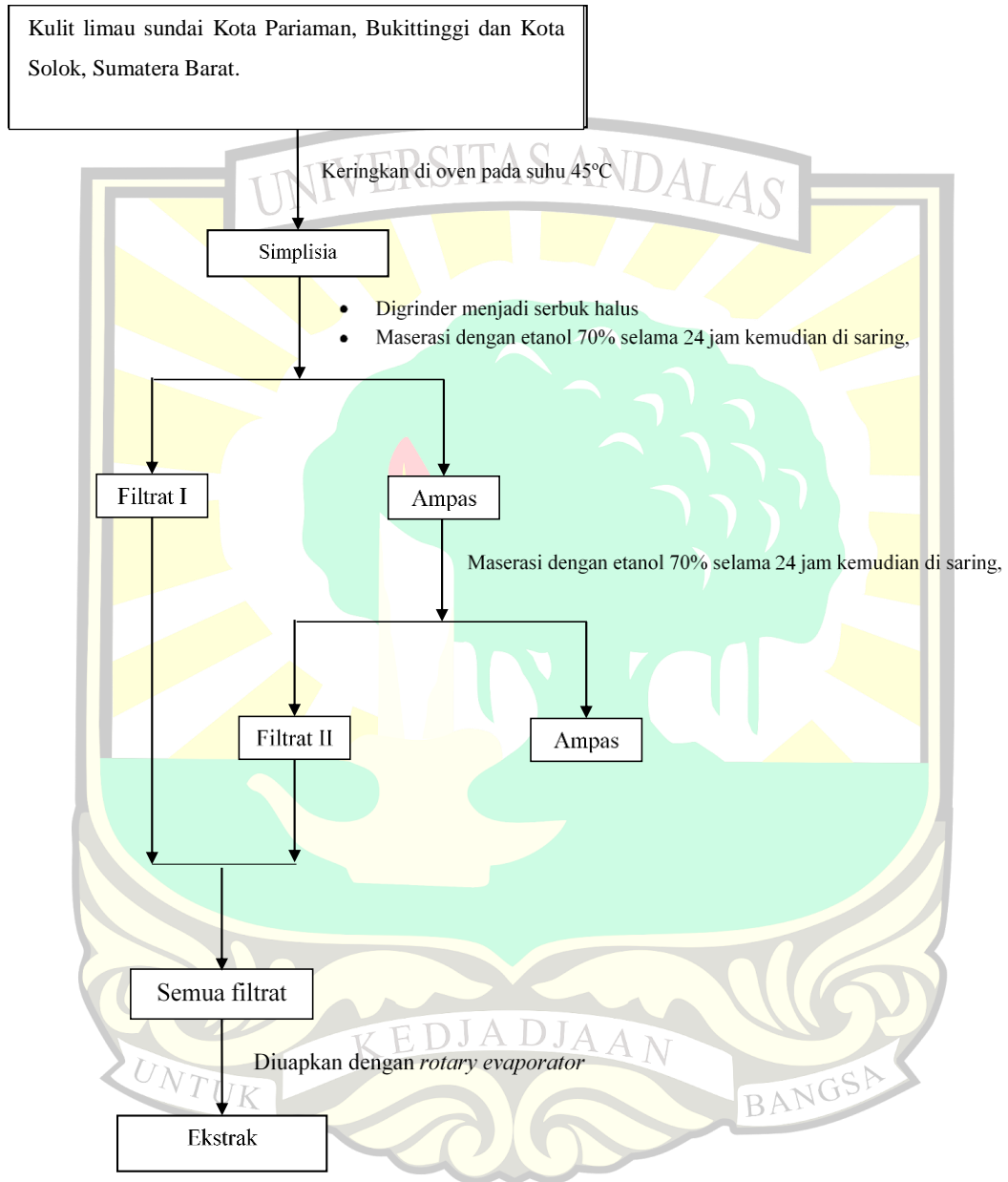
(e) Bukittinggi dan Pariaman

Gambar 66. Uji aktivitas ekstrak pada bakteri *S.A*

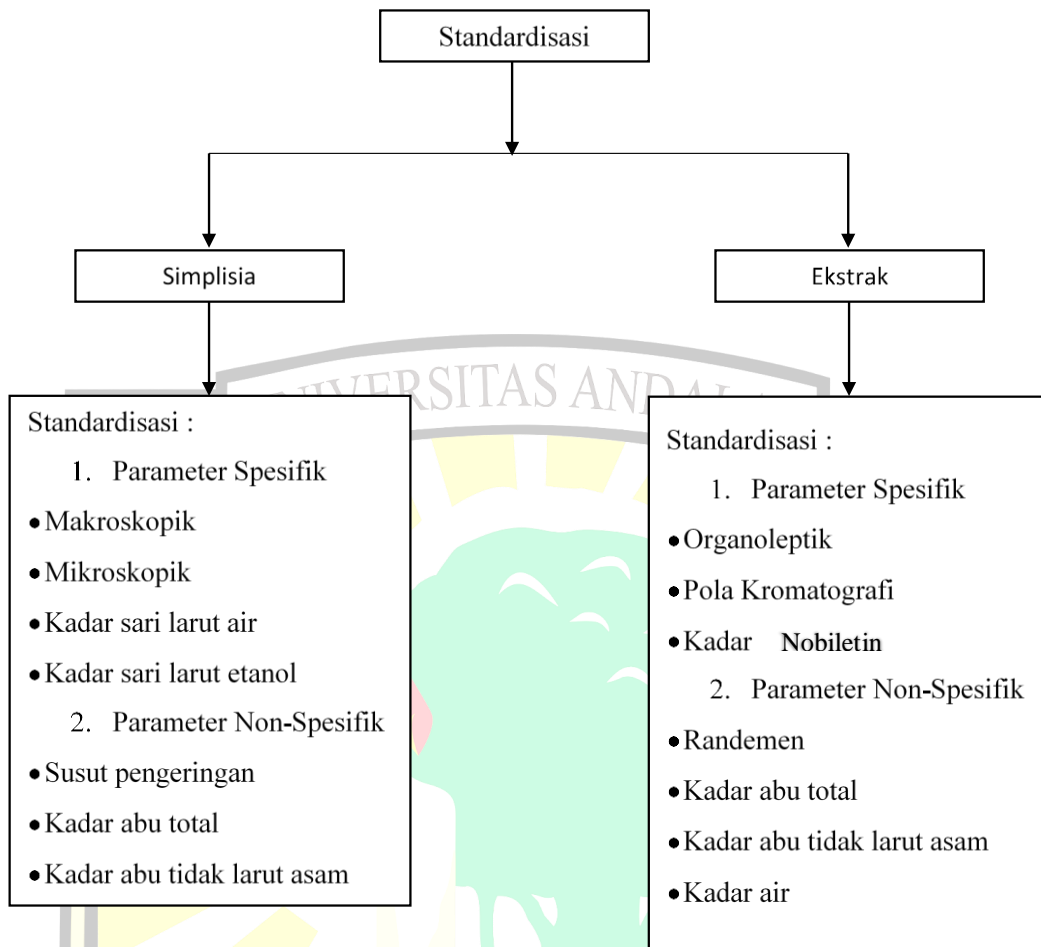


e. Skema Kerja

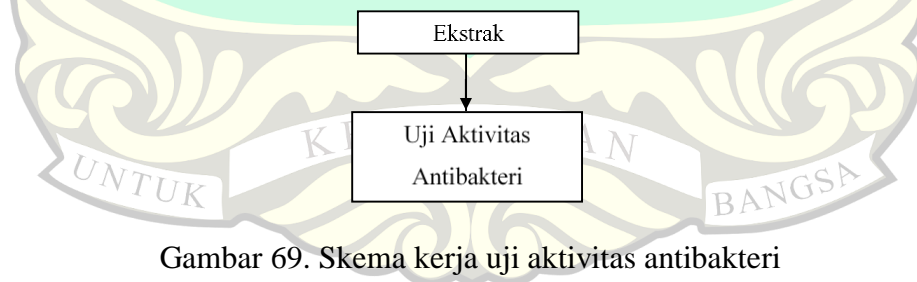
SKEMA KERJA



Gambar 67. Skema kerja pembuatan simplisia dan ekstrak



Gambar 68. Skema kerja standardisasi simplisia dan ekstrak



Gambar 69. Skema kerja uji aktivitas antibakteri