

UJI AKTIVITAS PEREDAMAN RADIKAL BEBAS DPPH EKSTRAK ETANOL DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle)

DPPH FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT OF *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle LEAVES

Anri Firman Sah¹, Rengganis Ulvia^{2*}, Devika Nurhasanah³

^{1,2,3}Program Studi Farmasi (S-1), Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani
Yogyakarta, Yogyakarta, Indonesia

*Email corresponding author: rengganisulvia@gmail.com

Diterima : 4 April 2026

Disetujui : 25 Juni 2026

Terbit : 30 Juni 2026

ABSTRACT

Free radicals are reactive molecules that cause oxidative stress and degenerative diseases. Antioxidants prevent cell damage by donating electrons. Lime leaves (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) contain flavonoids, such as quercetin, with strong antioxidant activity. Their content and activity are influenced by the extraction method and solvent, with UAE using 96% ethanol being effective in extracting flavonoids. To determine the DPPH free radical scavenging activity of ethanol extract of lime leaves obtained using the UAE method based on IC_{50} values. Lime leaves were extracted using the UAE method with 96% ethanol as the solvent at a ratio of 1:10. The extract was tested organoleptically, subjected to phytochemical screening, and evaluated for DPPH radical scavenging activity using quercetin as a standard. The DPPH radical scavenging activity was expressed as the 50% inhibition concentration (IC_{50}). The IC_{50} values of the extract and standard were statistically analyzed using SPSS with an Independent T-test at a 95% confidence level. The extraction of lime leaves yielded 5.4%, with organoleptic characteristics of dark green color, distinctive lime leaf odor, and thick texture. Phytochemical screening of the ethanol extract of lime leaves revealed the presence of alkaloids, flavonoids, phenolics, and tannins. The free radical scavenging activity of quercetin showed an IC_{50} value of 2.212 ppm, while the ethanol extract of lime leaves showed an IC_{50} value of 69.402 ppm.

Conclusion: The ethanol extract of lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) leaves exhibits strong free radical scavenging activity against DPPH.

Keywords: antioxidant, *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle, DPPH, UAE

ABSTRAK

Radikal bebas adalah molekul reaktif penyebab stres oksidatif dan penyakit degeneratif. Antioksidan mencegah kerusakan sel dengan mendonorkan elektron. Daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) mengandung flavonoid, seperti kuersetin, yang beraktivitas antioksidan kuat. Kandungan dan aktivitasnya dipengaruhi metode ekstraksi dan pelarut, di mana UAE dengan etanol 96% efektif mengekstrak flavonoid. Mengetahui aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dari ekstrak etanol daun jeruk nipis yang diekstraksi menggunakan metode UAE berdasarkan nilai IC_{50} . Daun jeruk nipis diekstraksi menggunakan metode UAE menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Hasil ekstraksi diuji secara organoleptik, dilakukan penapisan fitokimia, dan diuji peredaman radikal bebas DPPH dan kuersetin sebagai standar. Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dinyatakan sebagai nilai inhibition concentration 50% (IC_{50}). Data nilai IC_{50} ekstrak dan standar dianalisis secara statistik dengan SPSS menggunakan uji T-test Independent dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil ekstraksi daun jeruk nipis diperoleh nilai randemen 5,4%, uji organoleptik dengan karakteristik warna hijau kehitaman, bau khas daun jeruk nipis dengan tekstur kental. Penapisan fitokimia ekstrak etanol daun jeruk nipis mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik dan tanin. Aktivitas peredaman radikal bebas kuersetin menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 2,212 ppm dan ekstrak etanol daun jeruk nipis menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 69,402 ppm. Kesimpulan: Ekstrak etanol daun jeruk nipis memiliki aktivitas peredaman radikal bebas yang kuat terhadap DPPH.

Kata kunci: antioksidan, *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle, DPPH, UAE

PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tanpa pasangan, reaktivitas yang sangat tinggi, dan berpotensi merusak sel dalam tubuh manusia. Radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif yang berperan terhadap berbagai penyakit degeneratif seperti kardiovaskular, dan diabetes. Stres oksidatif karena paparan radikal bebas dapat diatasi dengan pemberian senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan untuk menangkal efek negatif radikal bebas (Nurkhasanah et al., 2023).

Antioksidan terbagi atas dua kelompok, yaitu antioksidan alami dan anti oksidan sintetik. Penggunaan antioksidan sintetik dalam jangka waktu panjang dapat memicu efek samping berupa kanker (Nusaibah et al., 2023). Oleh karena itu, antioksidan alami yang berasal dari bahan alam seperti senyawa fenolik dan flavonoid menjadi sangat potensial untuk dikembangkan. Salah satu tanaman yang mengandung antioksidan alami adalah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle).

Bagian daun jeruk nipis digunakan oleh masyarakat sebagai bumbu dapur Nurfadila et al. (2002) dan secara empiris dimanfaatkan sebagai penambah nafsu makan, penurun panas (antipireutik), diare, menguruskan badan, antiinflamasi, antioksidan, dan antibakteri (Yanuary et al., 2024). Berdasarkan penelitian Loizzo et al. (2012) ekstrak metanol daun jeruk nipis memiliki aktivitas peredaman radikal bebas yang lebih baik dengan nilai IC_{50} 76,9 ppm dibandingkan buah dan kulit buah dengan nilai IC_{50} secara berturut-turut 1793.06 ppm dan IC_{50} 83,3 ppm. Ekstrak metanol daun jeruk nipis menghasilkan aktivitas peredaman radikal bebas dengan nilai IC_{50} $95,32 \pm 2,06$ ppm (Khetal et al., 2017). Penelitian Yanuary (2021) menyebutkan daun jeruk nipis mengandung senyawa kuersetin yang berperan dalam aktivitas peredaman radikal bebas dengan nilai IC_{50} 98,58 ppm yang termasuk dalam kategori kuat.

Senyawa flavonoid seperti kuersetin pada daun jeruk nipis dapat diperoleh dengan proses ekstraksi salah satunya menggunakan metode Ultrasound-Assisted Extraction (UAE). Pada penelitian Sari *et al.* (2024) menunjukkan metode ekstraksi UAE menghasilkan kadar flavonoid total yang lebih tinggi yaitu $38,626 \pm 0,321$ mg QE/g, dibandingkan metode maserasi sebesar $36,876 \pm 0,386$ mg QE/g pada ekstrak etanol daun jeruk nipis. Senyawa flavonoid bersifat polar sehingga dapat diekstraksi dengan pelarut polar seperti metanol, aseton, dan etanol. Menurut Joangga (2024) pelarut etanol 96% mengasilkan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH terbaik dengan nilai IC_{50} 56,811 ppm dibandingkan dengan metanol sebesar 67,143 ppm dan aseton sebesar 90,331 ppm. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ekstrak etanol daun jeruk nipis yang diekstraksi menggunakan metode UAE. DPPH merupakan radikal bebas yang bersifat stabil dan umum digunakan untuk mengevaluasi kemampuan suatu ekstrak sebagai antioksidan (Puspitasari & Wulandari, 2017).

METODE PENELITIAN

Alat Penelitian

Ayakan mesh 40, cawan porselen, alat penggiling (*Fomac*), pemanas listrik, labu ukur, mikropipet (*Ohaus*), *moisture analyzer*, pipet ukur, perangkat sonikasi (*GT-Sonic*), spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Scientific Genesys 10S*), timbangan analitik (*Ohaus PAJ1003*), tabung reaksi, serta berbagai peralatan gelas lainnya (*Pyrex*).

Bahan Penelitian

Daun jeruk nipis, akuades (p.a), *blue tip*, DPPH (*Sigma Aldrich*), etanol 96% (teknis), HCl pekat p.a (*Merck*), HCl 1M p.a (*Merck*), kain mori, kertas saring, kuersetin (*sigma aldrich*), metanol p.a (*Merck*), reagen $FeCl_3$ 1% (teknis), reagen dragendroff (teknis), reagen Mayer (teknis), reagen Wagner (teknis), serbuk magnesium p.a (*Merck*), reagen bouchardat (teknis).

Pelaksanaan Penelitian

Determinasi

Daun jeruk nipis berasal dari daerah Sumber Batikan, Tlirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta dengan titik koordinat 7.909040,110.342826). Determinasi tanaman daun jeruk nipis dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan.

Pengumpulan Sampel

Sebanyak 2,220 kg daun jeruk nipis dipanen pada pagi hari pukul 08.00–10.15 WIB. Daun yang digunakan berwarna hijau tua, dalam kondisi utuh, tidak berlubang maupun rusak, serta berasal dari urutan daun keempat hingga ketujuh dari pucuk pada setiap ranting. Proses selanjutnya adalah sortasi basah, di mana daun jeruk nipis dibersihkan menggunakan air mengalir bertujuan menyingkirkan kotoran yang berada pada daun. Sampel terlebih dahulu dikering-anginkan, kemudian dilanjutkan pengeringan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 3 hari sampai sampel hancur saat diremas dan dihaluskan menggunakan grinder serta diayak dengan ayakan 40 mesh.

Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Nipis

Bubuk simplisia dari daun jeruk nipis sebanyak 100 g diekstraksi dengan 1000 mL etanol 96% (1:10 b/v) dengan teknis dibagi ke dalam dua erlemenser sebanyak 50 g dalam 500 mL. Proses ekstraksi dilakukan dengan bantuan sonikator selama 60 menit pada suhu 25°C. Ekstrak yang diperoleh

kemudian disaring menggunakan kain putih dan dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat. Ampas yang tersisa digabungkan kemudian diekstraksi kembali menggunakan 500 mL etanol 96% selama 60 menit pada suhu 25°C dengan bantuan sonikator. Setelah 60 menit ekstrak cair disaring menggunakan kain putih dilanjutkan dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat. Selanjutnya, kedua filtrat tersebut digabung dan diuapkan pada suhu 50°C dengan penangas air, dan nilai rendemen dihitung persamaan (1).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat serbuk}} \times 100\% \dots (1)$$

Penetapan kadar air

Metode penentuan kandungan air dilakukan dengan menggunakan alat *moisture analyzer*. Ekstrak etanol daun jeruk nipis hasil ekstraksi dimasukan ke dalam *cawan moisture analyzer* hingga berat sampel menjadi 0,5 g lalu alat diatur pada suhu 105°C. Proses ini berlangsung hingga alat mengeluarkan bunyi sebagai tanda sinyal, dan hasil kadar airnya dapat langsung terlihat pada layar. Selanjutnya, hasil pengukuran kadar air tersebut dicatat (Cahyaningrum et al., 2024).

Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik untuk mengetahui sifat fisik sampel yang meliputi warna, aroma dan tekstur ekstrak (Andika et al., 2021).

Uji Penapisan Fitokimia

Pada analisis penapisan fitokimia ini, uji dilakukan pada ekstrak etanol daun jeruk nipis dengan metode UAE. Analisis yang dipakai adalah uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenolik, dan terpenoid.

a. Alkaloid

Sebanyak 100 mg sampel dilarutkan dengan 10 mL etanol p.a dan ditambahkan 15 mL ammonia kemudian hasil pencampuran tersebut disaring. Selanjutnya 2 mL larutan HCl 2M ditambahkan pada filtrat dan dikocok. Hasil yang didapatkan dimasukkan dalam 4 tabung reaksi masing-masing 5 tetes. Tabung 1 berisi larutan blanko, sedangkan tabung 2, 3, dan 4 akan dicampur dengan 1 tetes pereaksi Mayer, Wagner, Dragendorff pada setiap tabung. Pada penambahan pereaksi Mayer, positif mengandung alkaloid jika endapan putih atau kuning. Pada penambahan pereaksi Wagner, positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan coklat. Pada penambahan Dragendorf, mengandung alkaloid jika terbentuk endapan jingga. Hasil positif alkaloid pada pengujian sekurang kurangnya terdapat dua reagen yang positif (Sari et al., 2024).

b. Flavonoid

Sebanyak 100 mg sampel dicampurkan dengan 10 mL etanol p.a hingga larut. Selanjutnya, 1 mL larutan sampel diambil, lalu dimasukan 1 mg bubuk Mg serta 5 tetes HCl. Jika berubah dan menghasilkan warna merah, kuning, atau jingga, maka sampel tersebut terindikasi mengandung flavonoid (Sari et al., 2024).

c. Saponin

Sebanyak 100 mg sampel dicampurkan dengan 10 mL etanol p.a. Selanjutnya, 1 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dimasukkan 5 mL akuades dan dikocok menggunakan tabung reaksi selama 1 menit. Setelah buih sudah muncul, ditambahkan 4 tetes

larutan HCl 1 M. Jika buih tidak muncul, dilakukan pemanasan selama 2-3 menit, kemudian larutan didinginkan dan dikocok dengan kuat. Adanya buih yang stabil selama 8-10 menit menunjukkan keberadaan senyawa saponin dalam sampel (Sari *et al.*, 2024).

d. Fenolik dan Tanin

Sebanyak 100 mg sampel dilarutkan menggunakan 10 mL etanol p.a. Selanjutnya, 1 mL larutan sampel diambil dan dimasukan 3 tetes FeCl₃ 1%. Sampel dikatakan positif apabila terbentuk warna biru gelap atau hijau kehitaman (Sari *et al.*, 2024).

e. Terpenoid

Sebanyak 100 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Sebanyak 1 mL sampel ditambahkan dengan Bouchardat. Terbentuknya pereaksi warna jingga kecoklatan menunjukan adanya terpenoid (Sari *et al.*, 2024).

Uji peredaman radikal bebas DPPH

a. Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM

Larutan DPPH 0,1 mM disiapkan dengan melarutkan 3,94 mg serbuk DPPH (BM 394,32) pada metanol p.a menggunakan labu takar 100 mL hingga mencapai tanda batas (Joangga, 2024).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan λ maksimum DPPH dengan 3 mL larutan DPPH lalu discanning menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan λ 400-800 nm. Puncak tertinggi dengan peak absorbansi terbesar pada grafik hasil uji merupakan panjang gelombang maksimal (Chiyindiko *et al.*, 2022).

c. Penentuan *operating time*

1 mL kuersetin 5 ppm dicampur dengan larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 2 mL, selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mendapatkan nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimum dengan interval setiap 1 menit selama 60 menit (Joangga, 2024).

d. Pembuatan larutan blanko

Sebanyak 3 mL larutan DPPH 0,1 mM diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan digunakan sebagai nilai absorbansi kontrol.

e. Pembuatan larutan kuersetin (100 ppm)

Sebanyak 10 mg kuersetin dilarutkan dalam 100 mL metanol. Pengenceran pada konsentrasi 10 mg kuersetin dilarutkan dalam 100 mL metanol. Pengenceran pada konsentrasi larutan 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm, dan 9 ppm dalam 5 mL metanol.

f. Pembuatan larutan sampel (1000 ppm)

Sebanyak 100 mg ekstrak sampel dilarutkan dalam 100 mL metanol, diencerkan larutan dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm dalam 5 mL methanol (Joangga, 2024).

g. Penetapan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

Larutan standar kuersetin dan sampel ekstrak etanol daun jeruk nipis dengan berbagai konsentrasi diambil 1 mL dicampurkan dengan larutan DPPH 0,1 mM dalam tabung reaksi sebanyak 2 mL. Larutan diinkubasi dalam tempat gelap selama Operating Time, dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal (Joangga, 2024).

Metode pengolahan dan analisis data

1. Penentuan nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*)

Nilai absorbansi akan digunakan sebagai perhitungan persentase penghambatan (%inhibisi) dapat dihitung dengan menggunakan persamaan (2):

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{Ak-As}{Ak} \times 100 \% \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

AK = Serapan DPPH

AS = Serapan DPPH + sampel

Data yang didapat dianalisis dengan menerapkan persamaan regresi linier, menghubungkan yang persentase inhibisi sebagai variabel y dengan konsentrasi sebagai variabel x untuk setiap larutan sampel uji serta standar kuersetin. (3):

$$y = bx+a \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

y = Persentase inhibisi (%)

x = IC₅₀ a = Intercept (perpotongan garis di sumbu y)

b = Slope (kemiringan)

2. Analisis data

Data nilai IC₅₀ dari ekstrak etanol daun jeruk nipis dan standar kuersetin yang di hasilkan dianalisis dengan aplikasi Statistical Product and Service Solution (SPSS). Uji normalitas dilakukan menggunakan uji Shapiro Wilk, dan uji homogenitas menggunakan Levene Statistic dengan taraf kepercayaan 95% atau nilai sig value nya >0,05. Data yang terdistribusi normal dan homogen kemudian dilakukan uji T-test Independent untuk menentukan apakah dua sampel yang tidak saling berkaitan mempunyai nilai rata-rata yang berbeda, dengan taraf kepercayaan jika nilai sig value nya <0,05.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi

Determinasi sampel penelitian dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan, dengan nomor 309/Lab.Bio/B/V/2025. identifikasi Hasil tanaman menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan untuk penelitian ini benar daun jeruk nipis *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle.

Penyiapan simplisia

Sampel daun jeruk nipis dipanen dari wilayah Sumber Batikan, Trirenggo, Kecamatan Bantul, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Sampel kemudian disortasi basah, dikeringkan, diserbukkan hingga diperoleh serbuk halus, dan diayak. Hasil pengolahan sampel berupa serbuk daun jeruk nipis disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Berat Daun Jeruk Nipis

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

Pembuatan ekstrak etanol daun jeruk nipis

Ekstrak etanol daun jeruk nipis diperoleh dengan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Persentase rendemen yang diperoleh tersaji pada Tabel 2. Nilai rendemen yang diperoleh dalam penelitian ini berada di bawah 10%, yang diduga dipengaruhi oleh penggunaan suhu ekstraksi sebesar 25°C. Hal ini didukung oleh penelitian lain Joangga (2024) yang menunjukkan bahwa suhu ekstraksi yang lebih tinggi (40°C) dapat meningkatkan rendemen. Peningkatan suhu mempermudah difusi pelarut ke dalam jaringan tanaman dan membantu memecah dinding sel, sehingga lebih banyak senyawa yang larut dalam pelarut (Wandira et al., 2023).

Tabel 2. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Berat Serbuk	Berat Ekstrak Kental (g)	Randemen (%)	(Depkes RI, 2017)
Daun	24,893%	5,4	>10%

Penetapan kadar kelembapan

Pengujian kadar kelembapan bertujuan untuk mengukur jumlah air dalam ekstrak. Dimana semakin tinggi nilai kelembapan, maka semakin besar kadar air dalam ekstrak yang dapat menurunkan kualitas, mengurangi kandungan senyawa aktif, dan memperpendek daya simpan karena memicu pertumbuhan mikroorganisme (Wandira et al., 2023). Hasil pengujian ekstrak etanol daun jeruk nipis dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Kadar Kelembapan Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

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

Uji organoleptik

Pengujian organoleptik untuk mengetahui sifat fisik sampel yang meliputi warna, aroma dan tekstur ekstrak Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Organoleptik Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Sampel	Organoleptis	Hasil	(Andasari et al., 2020)
Ekstrak etanol daun jeruk nipis	warna	Hijau tua	Hijau tua
	Tekstur	Kental	Kental
	Aroma	Khas	Khas

Uji penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia bertujuan untuk mendeteksi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel. Uji ini dilaksanakan pada ekstrak etanol dari daun jeruk nipis. Hasil analisis mengindikasikan bahwa ekstrak etanol daun jeruk nipis mengandung berbagai senyawa flavonoid, fenolik dan tanin seperti pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Skrining Fitokimia

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

Penambahan magnesium dan HCl pada uji flavonoid menyebabkan reduksi inti benzopiron (Karlina & Nasution, 2022), menghasilkan warna kuning yang mengindikasikan adanya flavonol seperti epigenin, rutin, dan kuersetin (Indriyani *et al.*, 2023). Sementara itu, uji fenolik-tanin menghasilkan kompleks berwarna hijau kehitaman setelah ditambahkan reagen FeCl₃ (Qomaliyah *et al.*, 2023). Warna tersebut yang menandakan keberadaan tanin terhidrolisis (Suciati, 2017).

Identifikasi terpenoid memberikan hasil positif dengan perubahan warna menjadi jingga kecokelatan akibat proses oksidasi yang membentuk ikatan rangkap terkonjugasi (Sari *et al.*, 2024). Hasil tersebut mengindikasikan adanya senyawa terpenoid, seperti d-limonene, β -pinene, γ terpinene, dan citral (Spadaro *et al.*, 2012). Pada uji alkaloid, hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya endapan coklat dengan reagen Wagner dan endapan jingga dengan reagen Dragendorff. Endapan tersebut terbentuk akibat adanya ikatan koordinasi antara reagen dengan atom nitrogen pada senyawa alkaloid (Loizzo *et al.*, 2012). Hasil ini mengindikasikan keberadaan golongan alkaloid dalam sampel, yang pada daun jeruk nipis dilaporkan antara lain meliputi sinefrin dan oktopamin (Percy *et al.*, 2010).

Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

a. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengidentifikasi panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi tertinggi dari larutan DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis dalam rentang 400-800 nm menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum berada pada 517 nm. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya (Bahun *et al.*, 2025) yang juga menggunakan panjang gelombang 517 nm.

b. Penentuan *operating time*

Operating time adalah waktu yang dibutuhkan agar senyawa uji dan DPPH mencapai stabilitas reaksi, yaitu pada menit ke-33, yang kemudian digunakan sebagai acuan untuk pengukuran absorbansi sampel, dan hasilnya serupa dengan penelitian sebelumnya (Bahun *et al.*, 2025) yang menunjukkan waktu stabil sekitar 30 menit.

Tabel 6. Hasil Rata-Rata Nilai IC_{50} Standar Kuersetin dan Ekstrak Eetanol Daun Jeruk Nipis

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

c. Pengujian aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

Berdasarkan hasil pengujian, standar kuersetin menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 2,212 ppm. Nilai tersebut mengindikasikan bahwa kuersetin memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dalam meredam radikal bebas. Berdasarkan data tersebut, kuersetin menunjukkan kemampuan antioksidan yang lebih kuat daripada ekstrak etanol dari daun jeruk nipis. Perbedaan ini terjadi karena ekstrak etanol daun jeruk nipis masih mengandung campuran senyawa, sedangkan berbagai kuersetin merupakan senyawa murni tunggal yang telah terbukti menunjukkan kemampuan antioksidan yang sangat kuat (Djamaluddin *et al.*, 2024).

Data nilai IC_{50} dihitung nilai standar deviasi (SD) dan koefisien variasi (CV) digunakan untuk menilai presisi data. SD yang kecil menunjukkan hasil uji homogen, sedangkan CV yang rendah (umumnya <5% untuk spektrofotometri) menandakan variasi antar data rendah dan metode analisis presisi (Wang *et al.*, 2024). Pada penelitian ini, SD dan CV yang diperoleh masih berada dalam batas yang dipersyaratkan, sehingga hasil pengukuran dapat dikatakan presisi dan memenuhi kriteria validitas metode analisis. Hasil ini sejalan dengan temuan yang dilaporkan oleh Yanuarty (2021), Joangga (2024), dan Ulfa (2024), yang juga menyatakan bahwa daun jeruk nipis memiliki zat antioksidan yang kuat dan berada dalam kategori yang sama, yaitu antioksidan kuat.

Analisis Data

Hasil IC_{50} pada standar kuersetin, sampel ekstrak etanol daun jeruk nipis dianalisis menggunakan SPSS didapatkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen dengan nilai signifikansi >0,05. Maka selanjutnya dilakukan uji T-test Independent dengan hasil terdapat perbedaan yang signifikan antara standar kuersetin dan sampel ekstrak etanol daun jeruk nipis yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi <0,05 seperti yang dimaksud pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji Statistik Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH Kuersetin dan Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

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

Keterangan:

a = Data terdistribusi normal (P value >0,05)

b = Data terdistribusi homogen (P value >0,05)

c = Data berbeda signifikan (P value <0,05)

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun jeruk nipis mempunyai kemampuan peredaman radikal bebas DPPH dengan yang termasuk kategori kuat dengan nilai IC₅₀ 69,402 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Andasari, S. D., Indriyastuti, & Arrosyid, M. (2020). Standarisasi Ekstrak Etil Asetat Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* S). *University Research Colloquium 2020 Universitas Aisyiyah Surakarta*, 257–262.
- Andika, B. T., Rahmawati, D., & Kuncoro, H. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan dan Formulasi Gel Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*). *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 14, 25–30. <https://doi.org/10.25026/mpc.v14i1.547>
- Bahun, N. R. I., Fatmawati, A., Jannah, N., & Bachri, M. S. (2025). Formulasi Dan Uji Aktivitas Antioksidan Gel Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Dengan Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam). *INPHARNMED Journal (Indonesian Pharmacy and Natural Medicine Journal)*, 8(2), 62–73. <https://doi.org/10.21927/inpharnmed.v8i2.5136>
- Cahyaningrum, T., Subhan, A. P. B., Rahmawati, E. N., Teju, D., Zulfa, N. M., Zulfa, F. A., & Erwiyani, A. R. (2024). Paper Soap Daun Belimbing Wuluh Sebagai Skin Moisturizer. *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 7(01), 62–71. <https://doi.org/10.35473/ijpnp.v7i01.2685>
- Chiyindiko, E., Langner, E. H. G., & Conradie, J. (2022). Spectroscopic Behaviour of Copper(II) Complexes Containing 2-Hydroxyphenones. *Molecules*, 27(18). <https://doi.org/10.3390/molecules27186033>
- Djamaluddin, R. R., Putra Pratama, N., & Nurhasanah, D. (2024). Potensi Antioksidan Ekstrak Metanol Fuli Pala (*Myristica fragrans* Houtt). *Journal of Pharmaceutical (Jop)*, 2(1), 51–58. <https://doi.org/10.30989/jop.v2i1.1517>
- Indriyani, N. N., AL Anshori, J., Permadi, N., Nurjanah, S., & Julaeha, E. (2023). Bioactive Components and Their Activities from Different Parts of *Citrus aurantifolia* (Christm..) Swingle for Food Development. *Foods*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/foods12102036>
- Joangga, I. (2024). Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Aktivitas Peredaman Radikal Bebas Dpph (2 , 2-Diphenyl-1- Picrylhydrazyl) Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*). Program Studi Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.
- Karlina, V. R., & Nasution, H. M. (2022). Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak

- Etanol Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* Dan *Escherichia Coli*. *Journal of Health and Medical Science*, 1(2), 132–139. <https://pusdikrapublishing.com/index.php/jkes/home>
- Khettal, B., Kadri, N., Tighilet, K., Adjebli, A., Dahmoune, F., & Maiza-Benabdeslam, F. (2017). Phenolic Compounds From Citrus Leaves: Antioxidant Activity And Enzymatic Browning Inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1515/jcim-2016-0030>
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., De Luca, D., Colica, C., & Menichini, F. (2012). Evaluation of *Citrus aurantifolia* peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(15), 2960–2967. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5708>
- Nurfadila, N., Kosman, R., & Herwin, H. (2022). Literature Study of Antibacterial Activity of the Famili *Rutacea*. *Journal Microbiology Science*, 2(1), 15–25. <https://doi.org/10.56711/jms.v2i1.823>
- Nurkhasanah, Bachri, M. S., & Yuliani, S. (2023). *Antioksidan dan Stres Oksidatif* (G. A. Sabilla (ed.)). UAD Press.
- Nusaibah, N., Cempaka, C. I., Abrian, S., Susanti, O., & Andayani, T. R. (2023). Karakteristik Face Scrub dari Sediaan Simplisia Rumput Laut *Sargassum sp.* *Majalah Farmasetika*, 9(1), 76. <https://doi.org/10.24198/mfarmasetika.v9i1.49265>
- Percy, D. W., Adcock, J. L., Conlan, X. A., Barnett, N. W., Gange, M. E., Noonan, L. K., Henderson, L. C., & Francis, P. S. (2010). Determination of Citrus aurantium protoalkaloids using HPLC with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Talanta*, 80(5), 2191–2195. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.10.052>
- Puspitasari, A. D., & Wulandari, R. L. (2017). Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Pharmascience*, 4(2), 167–175. <https://doi.org/10.20527/jps.v4i2.5770>
- Qomaliyah, E. N., Indriani, N., Rohma, A., & Islamiyati, R. (2023). Skrining Fitokimia, Kadar Total Flavonoid dan Antioksidan Daun Cocor Bebek Phytochemical Screening, Total Flavonoids and Antioxidants of *Kalanchoe Pinnata* Linn. Leaves. *Current Biochemistry*, 10(1), 1–10.
- Sari, I. P., Ulvia, R., & Pratama, N. P. (2024). Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Flavonoid Total (*Citrus aurantifolia*). *Jurnal Ilmiah Farmasi Attamru*, 5(2), 100–113.
- Spadaro, F., Costa, R., Circosta, C., & Occhiuto, F. (2012). Volatile composition and biological activity of key lime *Citrus aurantifolia* essential oil. *Natural Product Communications*, 7(11), 1523–1526. <https://doi.org/10.1177/1934578x1200701128>
- Suciati, I. (2017). Perbedaan Daya Hambat Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan Daun Salam (*Syzygium polyanthum* Wight) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dan Pemanfaatannya Sebagai Buku Ilmiah Populer. *Skripsi Universitas Jember*, 1–136.
- Ulfa, A. (2024). *Uji Peredaman Radikal Bebas Dpph (2,2-Diphenyl-1- Picrylhidrazyl) Ekstrak Etanol Dan Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia)*. Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.
- Wandira, A., Cindiansya, Rosmayati, J., Anandari, R. F., Naurah, S. A., & Fikayuniar, L. (2023). Menganalisis Pengujian Kadar Air Dari Berbagai Simplisia Bahan Alam Menggunakan Metode Gravimetri. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 9(17), 190–193.

- Wang, W., Zhang, Z., Zhang, C., Zhao, H., Yuan, S., Liu, J., Dong, N., Wang, Z., & Kang, F. (2024). Evaluation of Coefficients of Variation for Clinical Chemistry Tests Based on Internal Quality Control Data Across 5,425 Laboratories in China From 2013 to 2022. *Annals of Laboratory Medicine*, 44(3), 245–252. <https://doi.org/10.3343/alm.2023.0236>
- Yanuarty, R. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Secara Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal FARMASINDO Politeknik Indonusa Surakarta*, Vol. 5, 53–56.
- Yanuarty, R., Patala, R., & Awilia, N. (2024). Edukasi Manfaat Daun Jeruk Nipis Untuk Kesehatan Bagi Masyarakat Desa Sejahtera Kecamatan Palolo, Kabupaten Sigi. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat Nusantara*, 5(1), 1241–1246. <https://doi.org/10.55338/jpkmn.v5i1.2673>
- Andasari, S. D., Indriyastuti, & Arrosyid, M. (2020). Standarisasi Ekstrak Etil Asetat Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* S). *University Research Colloquium 2020 Universitas Aisyiyah Surakarta*, 257–262.
- Andika, B. T., Rahmawati, D., & Kuncoro, H. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan dan Formulasi Gel Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*). *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 14, 25–30. <https://doi.org/10.25026/mpc.v14i1.547>
- Bahun, N. R. I., Fatmawati, A., Jannah, N., & Bachri, M. S. (2025). Formulasi Dan Uji Aktivitas Antioksidan Gel Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Dengan Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam). *INPHARMED Journal (Indonesian Pharmacy and Natural Medicine Journal)*, 8(2), 62–73. <https://doi.org/10.21927/inpharmed.v8i2.5136>
- Cahyaningrum, T., Subhan, A. P. B., Rahmawati, E. N., Teju, D., Zulfa, N. M., Zulfa, F. A., & Erwiyani, A. R. (2024). Paper Soap Daun Belimbing Wuluh Sebagai Skin Moisturizer. *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 7(01), 62–71. <https://doi.org/10.35473/ijpnp.v7i01.2685>
- Chiyindiko, E., Langner, E. H. G., & Conradie, J. (2022). Spectroscopic Behaviour of Copper(II) Complexes Containing 2-Hydroxyphenones. *Molecules*, 27(18). <https://doi.org/10.3390/molecules27186033>
- Djamaluddin, R. R., Putra Pratama, N., & Nurhasanah, D. (2024). Potensi Antioksidan Ekstrak Metanol Fuli Pala (*Myristica fragrans* Houtt). *Journal of Pharmaceutical (Jop)*, 2(1), 51–58. <https://doi.org/10.30989/jop.v2i1.1517>
- Indriyani, N. N., AL Anshori, J., Permadi, N., Nurjanah, S., & Julaeha, E. (2023). Bioactive Components and Their Activities from Different Parts of *Citrus aurantifolia* (Christm..) Swingle for Food Development. *Foods*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/foods12102036>
- Joangga, I. (2024). Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Aktivitas Peredaman Radikal Bebas Dpph (2, 2-Diphenyl-1- Picrylhydrazyl) Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*). Program Studi Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.
- Karlina, V. R., & Nasution, H. M. (2022). Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* Dan *Escherichia Coli*. *Journal of Health and Medical Science*, 1(2), 132–139. <https://pusdikrapublishing.com/index.php/jkes/home>
- Khettal, B., Kadri, N., Tighilet, K., Adjebli, A., Dahmoune, F., & Maiza-Benabdeslam, F. (2017). Phenolic Compounds From Citrus Leaves: Antioxidant Activity And Enzymatic Browning Inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1515/jcim-2016-0030>
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., De Luca, D., Colica, C., & Menichini, F. (2012).

- Evaluation of *Citrus aurantifolia* peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(15), 2960–2967. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5708>
- Nurfadila, N., Kosman, R., & Herwin, H. (2022). Literature Study of Antibacterial Activity of the Famili Rutacea. *Journal Microbiology Science*, 2(1), 15–25. <https://doi.org/10.56711/jms.v2i1.823>
- Nurkhasanah, Bachri, M. S., & Yuliani, S. (2023). *Antioksidan dan Stres Oksidatif* (G. A. Sabilla (ed.)). UAD Press.
- Nusaibah, N., Cempaka, C. I., Abrian, S., Susanti, O., & Andayani, T. R. (2023). Karakteristik Face Scrub dari Sediaan Simplisia Rumpun Laut *Sargassum sp.* *Majalah Farmasetika*, 9(1), 76. <https://doi.org/10.24198/mfarmasetika.v9i1.49265>
- Percy, D. W., Adcock, J. L., Conlan, X. A., Barnett, N. W., Gange, M. E., Noonan, L. K., Henderson, L. C., & Francis, P. S. (2010). Determination of Citrus aurantium protoalkaloids using HPLC with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Talanta*, 80(5), 2191–2195. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.10.052>
- Puspitasari, A. D., & Wulandari, R. L. (2017). Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Pharmascience*, 4(2), 167–175. <https://doi.org/10.20527/jps.v4i2.5770>
- Qomaliyah, E. N., Indriani, N., Rohma, A., & Islamiyati, R. (2023). Skrining Fitokimia, Kadar Total Flavonoid dan Antioksidan Daun Cocor Bebek Phytochemical Screening, Total Flavonoids and Antioxidants of Kalanchoe Pinnata Linn. Leaves. *Current Biochemistry*, 10(1), 1–10.
- Sari, I. P., Ulvia, R., & Pratama, N. P. (2024). Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Flavonoid Total (*Citrus aurantifolia*). *Jurnal Ilmiah Farmasi Attamru*, 5(2), 100–113.
- Spadaro, F., Costa, R., Circosta, C., & Occhiuto, F. (2012). Volatile composition and biological activity of key lime *Citrus aurantifolia* essential oil. *Natural Product Communications*, 7(11), 1523–1526. <https://doi.org/10.1177/1934578x1200701128>
- Suciati, I. (2017). Perbedaan Daya Hambat Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan Daun Salam (*Syzygium polyanthum Wight*) Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus epidermidis dan Pemanfaatannya Sebagai Buku Ilmiah Populer. *Skripsi Universitas Jember*, 1–136.
- Ulfa, A. (2024). *Uji Peredaman Radikal Bebas Dpph (2,2-Diphenyl -1- Picrylhidrazyl) Ekstrak Etanol Dan Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia)*. Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.
- Wandira, A., Cindiansya, Rosmayati, J., Anandari, R. F., Naurah, S. A., & Fikayuniar, L. (2023). Menganalisis Pengujian Kadar Air Dari Berbagai Simplisia Bahan Alam Menggunakan Metode Gravimetri. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 9(17), 190–193.
- Wang, W., Zhang, Z., Zhang, C., Zhao, H., Yuan, S., Liu, J., Dong, N., Wang, Z., & Kang, F. (2024). Evaluation of Coefficients of Variation for Clinical Chemistry Tests Based on Internal Quality Control Data Across 5,425 Laboratories in China From 2013 to 2022. *Annals of Laboratory Medicine*, 44(3), 245–252. <https://doi.org/10.3343/alm.2023.0236>
- Yanuary, R. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Secara Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal FARMASINDO Politeknik Indonusa Surakarta*, Vol. 5, 53–56.
- Yanuary, R., Patala, R., & Awilia, N. (2024). Edukasi Manfaat Daun Jeruk Nipis Untuk Kesehatan Bagi Masyarakat Desa Sejahtera Kecamatan Palolo, Kabupaten Sigi. *Jurnal Pengabdian Kepada*

Masyarakat Nusantara, 5(1), 1241–1246. <https://doi.org/10.55338/jpkmn.v5i1.2673>