

**PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL DAN
FRAKSI ETIL ASETAT DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantiifolia*
(Christm. & Panz.) Swingle.) SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
TERHADAP *Salmonella typhi***

**DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOID CONTENT OF ETHANOL
EXTRACT AND ETHYL ACETATE FRACTION OF LIME LEAVES
(*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) AND ANTIBACTERIAL
ACTIVITY TEST ON *Salmonella typhi***

SKRIPSI



Oleh :

ISNAINI PRATIWI

4171029

PROGRAM STUDI S1 FARMASI

SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL

SURAKARTA

2021

**PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL DAN
FRAKSI ETIL ASETAT DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantiifolia*
(Christm. & Panz.) Swingle.) SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI
TERHADAP *Salmonella typhi***

**Determination of Total Flavonoid Content of Ethanol Extract and Ethyl
Acetate Fraction of Lime Leaves (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.)
Swingle.) and Antibacterial Activity Test on *Salmonella typhi***

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana
Farmasi (S. Farm) pada Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu
Kesehatan Nasional di Surakarta**

Oleh :

ISNAINI PRATIWI

4171029

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL
SURAKARTA**

2021

SKRIPSI

PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Salmonella typhi*

DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOID CONTENT OF ETHANOL EXTRACT AND ETHYL ACETATE FRACTION OF LIME LEAVES (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST ON *Salmonella typhi*

Oleh :


ISNAINI PRATIWI

4171029

Dipertahankan di hadapan Penguji Skripsi Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional Pada tanggal : 14 Agustus 2021

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping


apt. Novena Yety L, S.Farm., M.Sc


apt. Lusia Murtisiwi, S.Farm., M.Sc

Mengetahui,
**Ketua Program Studi S1 Farmasi
Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional**


apt. Lusia Murtisiwi, S.Farm., M.Sc

Tim Penguji

- | | |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1 apt. Diah Pratimasari, M.Farm | Ketua Penguji |
| 2 Dr. Didik Wahyudi, M.Si | Anggota Penguji |
| 3 apt. Novena Yety L, S.Farm., M.Sc | Anggota Penguji |
| 4 apt. Lusia Murtisiwi, S.Farm., M.Sc | Anggota Penguji |

- 
- 
- 
- 

PERSEMBAHAN

Berpikirlah positif, tidak peduli seberapa keras kehidupanmu.

(Ali bin Abi Thalib)

“Dan orang-orang yang berjihad untuk (mencari keridhaan) Kami, benar-benar akan Kami tunjukkan kepada mereka jalan-jalan Kami. Dan sesungguhnya Allah benar-benar beserta orang-orang yang berbuat baik.”

(QS. Al-Ankabut : 69)

Kupersembahkan kepada

Allah SWT yang senantiasa memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga diberikan kelancaran dalam segala urusan. Nabi Muhammdah SAW yang menjadi panutan umat Muslim dalam beribadah kepada Allah SWT

Bapak dan Ibu tercinta yang selalu menyebut nama saya dalam setiap doa, selalu menjadi motivasi, dan dukungan yang tulus

Kakak tercinta serta saudara-saudara yang selalu memberi dukungan

Teman-teman ku Annisa, Gustiana, Ivory, Sylvi, Laras, Liyona, Irna yang selalu memberi dukungan dan doa

Teman-teman angkatan 2017 yang telah berjuang selama studi

HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surakarta, 7 Agustus 2021

10000
METRAL
TEMPEL
C 026 SAJ08081143



dit
Ismaini Pratiwi

PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas segala karunia dan rahmat-Nya sehingga dapat menyelesaikan penelitian ini dengan judul “Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Dan Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) Serta Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Salmonella Typhi*” sebagai salah satu syarat menyelesaikan jenjang pendidikan S1 Farmasi di Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional. Dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. apt. Hartono, M.Si. selaku Ketua Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional.
2. apt. Lusia Murtisiwi, S.Farm, M.Sc selaku Ketua Program Studi S1 Farmasi serta pembimbing yang telah memberikan masukan dalam penelitian hingga menyelesaikan skripsi.
3. Apt. Novena Yety Lindawati, S.Farm., M.Sc selaku pembimbing utama dan dosen pembimbing akademi yang telah memberikan masukan dalam penelitian hingga menyelesaikan skripsi.
4. apt. Diah Pratimasari, M.Farm dan Dr. Didik Wahyudi, M.Si selaku penguji yang telah memberikan masukan dalam penelitian hingga menyelesaikan skripsi.
5. Seluruh dosen prodi S1 Farmasi maupun dosen diluar prodi S1 Farmasi yang telah membimbing serta memberikan ilmu dan pengalaman yang sangat bermanfaat.

6. Laboran laboratorium Obat Tradisional, Laboran laboratorium Kimia, dan Laboran laboratorium Bakteriologi yang telah membantu dan mendampingi untuk menyelesaikan skripsi.
7. Kedua orang tua dan seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa, dukungan serta semangat bagi penulisan sehingga terselesaikannya skripsi ini.
8. Seluruh tim skripsi Bakteriologi dan Kimia Ivary Zella F, Irna D. S, Mahanani Eka B, Noor Anisa M, Dilla Nur P, Maryani, Tarasia Gandes, Imam N. F, dan Nugroho yang senantiasa menghibur, memberi semangat, doa, serta dukungan untuk segera menyelesaikan skripsi.
9. Teman-teman angkatan 2017 yang telah berjuang bersama-sama untuk menempuh Sarjana Farmasi di STIKES Nasional.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca. Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Surakarta, 7 Agustus 2021

Isnaini Pratiwi

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
INTISARI	xiv
ABSTRACT	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Tanaman Daun Jeruk Nipis.....	6
1. Deskripsi Tanaman	6
2. Morfologi Tanaman	6
3. Klasifikasi dan Tata Nama Tanaman.....	7
4. Kandungan Kimia	8
5. Manfaat Tanaman	11
B. Uraian Flavonoid	12

C. Metode Penyarian	13
1. Pengertian Ekstrak dan Ekstraksi.....	13
2. Metode Maserasi.....	13
3. Fraksinasi	15
D. Kromatografi Lapis Tipis	16
1. Pengertian Kromatografi Lapis Tipis.....	16
1. Komponen KLT	17
E. Spektrofotometer.....	17
F. <i>Salmonella typhi</i>	19
1. Klasifikasi <i>Salmonella typhi</i>	19
2. Morfologi dan fisiologi <i>Salmonella typhi</i>	20
3. Patogenesis dan Gejala Klinis <i>Salmonella typhi</i>	21
G. Antibakteri	23
H. Landasan Teori.....	26
I. Hipotesis	28
J. Kerangka Konsep Penelitian.....	29
BAB III METODE PENELITIAN	30
A. Desain Penelitian	30
B. Alat dan Bahan	30
C. Variabel Penelitian.....	31
D. Definisi Operasional Variabel.....	32
E. Jalannya Penelitian.....	33
1. Determinasi Tanaman Jeruk Nipis.....	34
2. Persiapan Bahan.....	34
3. Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Nipis.....	34
4. Pembuatan Fraksi Daun Jeruk Nipis.....	35
5. Penapisan Fitokimia.....	36
6. Uji Bebas Etanol	37
7. Pengujian Pendahuluan Flavonoid secara KLT	37
8. Penetapan Kadar Flavonoid	39

9. Sterilisasi Alat dan Bahan.....	40
10. Karakterisasi Bakteri.....	41
a. Pewarnaan Gram.....	41
b. Inokulasi Bakteri Pada Media <i>Mac Conkey</i>	42
c. Uji Biokimia.....	42
11. Pembuatan Suspensi Bakteri.....	42
12. Uji Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat	45
F. Analisis Hasil	46
1. Perhitungan Rendemen	46
2. Analisis Kualitatif Flavonoid	46
3. Perhitungan Regresi Linier	46
4. Perhitungan Koefisien Variasi	47
5. Standar Uji Sensitivitas antibakteri.....	47
6. Uji Statistik	48
G. Alur Penelitian	49
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	51
A. Determinasi Tanaman.....	51
B. Preparasi Sampel	51
C. Pembuatan Ekstrak dan Fraksi	53
D. Penapisan Skrining Fitokimia.....	56
E. Pengujian Pendahuluan Flavonoid secara KLT.....	61
F. Penetapan Kadar Flavonoid.....	64
G. Uji Karakteristik Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	71
H. Uji Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat	77
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	85
A. Kesimpulan	85
B. Saran.....	85
DAFTAR PUSTAKA	86
LAMPIRAN.....	95

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR 1.	Daun Jeruk Nipis	8
GAMBAR 2.	Struktur Flavonoid	12
GAMBAR 3.	Pengamatan Mikroskop Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	19
GAMBAR 4.	Bagan Kerangka Konsep Penelitian	29
GAMBAR 5.	Bagan Pembuatan Ekstrak dan Fraksi Daun Jeruk Nipis serta Penetapan Kadar Flavonoid Total	49
GAMBAR 6.	Bagan Uji Aktivitas Antibakteri	50
GAMBAR 7.	Simplisia Daun Jeruk Nipis	52
GAMBAR 8.	Reaksi Flavonoid dengan Serbuk Mg dan HCl	57
GAMBAR 9.	Reaksi Alkaloid dengan Mayer	58
GAMBAR 10.	Reaksi Alkaloid dengan Dragendroff	58
GAMBAR 11.	Reaksi Hidrolisis Saponin dalam Air	59
GAMBAR 12.	Reaksi Tanin dengan FeCl ₃	60
GAMBAR 13.	Reaksi Steroid dan Terpenoid dengan Reagen Liberman Burchaer	61
GAMBAR 14.	KLT Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis	62
GAMBAR 15.	Reaksi kompleks flavonoid golongan flavonol dengan AlCl ₃	64
GAMBAR 16.	Spektrum Panjang Gelombang Maksimal Kompleks Kuersetin dengan AlCl ₃	67
GAMBAR 17.	Kurva Konsentrasi dengan Absorbansi Kuersetin.....	68
GAMBAR 18.	Pengamatan Mikroskop Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	71
GAMBAR 19.	Hasil morfologi <i>Salmonella typhi</i> pada Media MC.....	72
GAMBAR 20.	Hasil Uji Biokimia <i>Salmonella typhi</i>	73
GAMBAR 21.	Hasil Daya Hambat Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis	78
GAMBAR 22.	Diagram Daya Hambat Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis	79

DAFTAR TABEL

TABEL 1.	Standar Sensitivitas Antibakteri	48
TABEL 2.	Rendemen Ekstrak Daun Jeruk Nipis.....	54
TABEL 3.	Rendemen Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis.....	56
TABEL 4.	Identifikasi Senyawa Kimia Daun Jeruk Nipis	57
TABEL 5.	Identifikasi KLT pada Sampel dan Baku Kuersetin.....	63
TABEL 6.	Data Operating Time	66
TABEL 7.	Hasil Pengukuran Absorbansi dari Kurva Baku Kuersetin.....	68
TABEL 8.	Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis.....	69
TABEL 9.	Hasil Uji Biokimia	72
TABEL 10.	Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis`	78

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Hasil Determinasi	95
Lampiran 2.	Perhitungan Rendemen Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat	97
Lampiran 3.	Perhitungan KLT dan Nilai hRf	98
Lampiran 4.	Perhitungan Bahan.....	99
Lampiran 5.	<i>Operating Time</i> (OT) Kuersetin	102
Lampiran 6.	Panjang Gelombang Maksimal.....	103
Lampiran 7.	Kurva Baku Kuersetin	104
Lampiran 8.	Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis.....	105
Lampiran 9.	Kadar Flavonoid Total Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis..	108
Lampiran 10.	Perhitungan Larutan Sampel	111
Lampiran 11.	Hasil Pengukuran Dengan Spektrofotometri.....	115
Lampiran 12.	Hasil Analisis <i>Independent Samples T-Test</i> Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis.....	116
Lampiran 13.	Analisis <i>One Way Anova</i> Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Etil Asetat Daun Jeruk Nipis	117
Lampiran 14.	Tabel Baca Bakteri	122
Lampiran 15.	Dokumentasi Penelitian.....	123

INTI SARI

Daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) memiliki kandungan senyawa flavonoid yang berpotensi sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar flavonoid total dan aktivitas antibakteri *Salmonella typhi* antara ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis.

Pada penelitian ini daun jeruk nipis diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% kemudian dilarutkan dengan air hangat dan difraksinasi menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat. Penetapan kadar flavonoid total menggunakan spektrofotometri UV-Vis kemudian dilakukan uji antibakteri dengan menggunakan metode difusi.

Hasil penelitian penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis berturut-turut sebesar 1,0324 b/b QE dan 1,2702 b/b QE. Analisis statistik *Independent Samples T-Test* menunjukkan bahwa kadar flavonoid total pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0,000$ ($p<0,05$)). Hasil statistik daya hambat ekstrak etanol dan fraksi etil asetat mampu menghambat bakteri *Salmonella typhi* pada konsentrasi 100% dengan diameter zona hambat berturut-turut sebesar 10,4 mm dan 12,63 mm kategori resisten yang memiliki perbedaan bermakna ($p<0,05$) dengan kontrol negatif DMSO 10%. Hasil tersebut belum setara dengan kontrol positif chloramphenicol 30 μg dengan zona hambat sebesar 34,5 mm.

Kata kunci : Daun jeruk nipis, Flavonoid, Antibakteri, *Salmonella typhi*

ABSTRACT

Lime leaves (*Citrus aurantiifolia*) contain flavonoid compounds that have the potential as antibacterial. This study aims to determine the total flavonoid content and antibacterial activity of *Salmonella typhi* between the ethanol extract and the ethyl acetate fraction of lime leaf (*Citrus aurantiifolia*).

In this study, lime leaves were extracted by maceration method using 70% ethanol solvent then dissolved in warm water and fractionated using n-hexane and ethyl acetate as solvents. Determination of total flavonoid levels using UV-Vis spectrophotometry and then antibacterial test using the diffusion method.

The results of the study were to determine the total flavonoid content of the ethanol extract and the ethyl acetate fraction of lime leaf, respectively, at 1.0324 w/w QE and 1.2702 w/w QE. Statistical analysis of the Independent Samples T-Test showed that the total flavonoid content in the ethanol extract and the ethyl acetate fraction of lime leaves had a significant difference ($p=0.000$ ($p<0.05$)). Statistical results of the inhibitory power of ethanol extract and ethyl acetate fraction were able to inhibit *Salmonella typhi* bacteria at a concentration of 100% with an inhibition zone diameter of 10.4 mm and 12.63 mm in the resistant category which had a significant difference ($p<0.05$) with DMSO 10% negative control. These results were not equivalent to the positive control of chloramphenicol 30 g with an inhibition zone of 34.5 mm.

Key words : Lime leaf, Flavonoid, Antibacterial, *Salmonella typhi*

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder. Flavonoid dapat diperoleh melalui proses ekstraksi yang merupakan suatu kegiatan yang dilakukan untuk menarik kandungan kimia yang dapat larut agar terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair (Depkes RI, 2000). Flavonoid termasuk golongan terbesar senyawa fenol alam dan merupakan senyawa polar karena mempunyai gugus hidroksil, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol. Senyawa flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan, terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon (Sukadana, 2010).

Salah satu tanaman di Indonesia yang memiliki kandungan flavonoid yaitu daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.). Daun jeruk nipis mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid, polifenol, saponin, tanin, flavonoid dan triterpenoid (Afrina, 2016). Flavonoid memiliki efek farmakologis sebagai antioksidan, antimikroba, antihipertensi, antiinflamasi serta mengobati gangguan pada fungsi hati.

Salmonella typhi merupakan golongan bakteri Gram negatif. *Salmonella typhi* dapat menyebabkan penyakit demam tipoid. Bakteri ini masuk melalui mulut kemudian menuju ke saluran cerna. Pengobatan pada penyakit demam tipoid pada umumnya menggunakan obat antibiotik sintetik seperti kloramfenikol, ampisilin dan kotrimoksazol namun, karena memiliki banyak efek samping maka pengobatan

dikembangkan melalui pengobatan bahan alam (Marhamah, 2010). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jeruk nipis pada konsentrasi 20% efektif sebagai antimikroba dalam membunuh bakteri Gram-negatif, diantaranya *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* dan juga dapat membunuh bakteri Gram-positif, diantaranya *Bacillus cereus*, *Enterobacter faecalis*, dan *Staphylococcus aureus* serta memiliki daya hambat minimum pada bakteri rata-rata adalah 0,25% (Reddy, dkk., 2012). Ekstrak air daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* dengan berbagai konsentrasi. Konsentrasi yang paling baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah 25% dengan nilai hambat 11,25 mm dan 12,33 mm (Abubakar, 2018).

Pengembangan obat dengan bahan alam pada saat ini tidak hanya pada ekstrak saja melainkan dapat dikembangkan pada fraksi. Pengembangan obat pada fraksi dapat dilakukan dengan cara memisahkan senyawa-senyawa yang hanya memiliki aktivitas saja hal ini disebabkan karena pelarut yang digunakan sesuai dengan tingkat polaritasnya (Sarker, dkk., 2006). Penelitian sebelumnya menunjukkan senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat daun jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *Escherichia coli* sebesar 12,21 mm pada konsentrasi 2000 μ g/disk. Fraksi etil asetat memiliki sifat semi polar sehingga dapat menarik senyawa flavonoid (Andini, 2018).

Flavonoid merupakan salah satu senyawa yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Kharismayanti, 2015). Kuersetin termasuk

senyawa flavonoid yang terdapat pada daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) golongan flavonol yang paling banyak dan merupakan senyawa yang paling aktif (Amic, 2003). Penetapan kadar flavonoid total dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan metode kolorimertri $AlCl_3$ yaitu dengan menggunakan pereaksi $AlCl_3$ yang akan membentuk kompleks tahan asam antara gugus hidroksi dengan keton yang berdekatan dan membentuk kompleks tidak tahan asam dengan gugus ortohidroksi pada flavonoid, sehingga pereaksi $AlCl_3$ digunakan untuk mendeteksi gugus flavon dan flavonol pada senyawa flavonoid (Cahyadi, dkk., 2014). Hasil penelitian Hindun., dkk (2017) menyatakan bahwa kadar flavonoid total pada ekstrak metanol daun jeruk nipis sebesar 0,467% b/b.

Penetapan kadar flavonoid total memiliki hubungan dengan aktivitas antibakteri karena flavonoid mempunyai kemampuan berinteraksi dengan DNA bakteri dan menghambat fungsi membran sitoplasma bakteri dengan mengurangi fluiditas dari membran dalam dan membran luar sel bakteri (Sudirnan, 2014). Semakin besar kadar flavonoid maka zona hambat pertumbuhan bakteri yang dihasilkan akan semakin besar (Elia, dkk., 2020). Maka berdasarkan uraian latar belakang masalah, perlu dilakukan penelitian mengenai hubungan penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*.

B. Rumusan Masalah

1. Berapa kadar flavonoid total ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) dengan metode kolorimetri $AlCl_3$?
2. Apakah ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi*?
3. Apakah konsentrasi dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis yang memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri *Salamonella typhi* setara dengan kontrol positif Chloramphenicol?

C. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui kadar flavonoid total yang terdapat pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis.
2. Untuk membuktikan aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella thypi*.
3. Membandingkan kemampuan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis penghambatannya setara dengan kontrol positif Chloramphenicol.

D. Manfaat Penelitian

1. Dapat mengetahui kadar flavonoid total yang terdapat pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis.

2. Dapat mengetahui kemampuan antibakteri dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis sehingga dapat menambah sumber data ilmiah atau rujukan bagi penelitian selanjutnya dalam bidang kesehatan dalam upaya perkembangan obat tradisional.
3. Mendapatkan informasi pemanfaatan tanaman sebagai bahan baku obat yaitu dari tanaman daun jeruk nipis yang berfungsi sebagai antibakteri.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental mengenai penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) dan aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi*.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Acis BC 500), spatula, blender (Philips), *rotary evaporator* (IKA HB 10 basic), bejana maserasi (Maxi), *waterbath* (WNB), cawan porselin (herma), tabung reaksi (herma), corong pisah (pyrex), mikropipet (pyrex), cawan petri steril (pyrex), jarum ohse, korek api, gelas ukur (pyrex), beaker gelas (pyrex), labu ukur (pyrex), pipet volume (pyrex), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV mini-1240), silica gel GF 254 (ABM), chamber (herma), penutup chamber (herma), lampu UV 254 nm dan 366 nm (Acis BC 500), rak tabung reaksi (Mitra), botol semprot (exsi), kapas lidi steril, ayakan 40 mesh, pipet tetes, eppendorf, oven, *autoklaf*, inkubator, tabung reaksi, blank disk, jangka sorong.

2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.), bakteri uji *Salmonella typhi* berasal dari biakan bakteri murni yang ada di Laboratorium STIKES Nasional. Bahan kimia yang digunakan yaitu pelarut *n*-heksan (E. Merck), etil asetat (E. Merck), etanol 70% (Medika), kuersetin (Alrich Chemist), antibiotik chloramphenicol, spiritus, *blank paper disk*, aquadest (Medika), pelarut DMSO 10%, metanol p.a (Medika), asam sulfat pekat, pereaksi mayer, pereaksi dragendof, pereaksi mayer, asam asetat galsial (Chemist), FeCl₃ 10% (E. Merck), AlCl₃ 10% (E. Merck), serbuk magnesium (E. Merck), HCl pekat (E. Merck), HCl 1 N (E. Merck), HCl 5M (E. Merck), larutan H₂SO₄ (Merck), asetat anhidrat (E. Merck), cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D, NaCl 0,9%, reagen kovack, KOH 40%, HCl (E. Merck), BHI, minyak emersi, alkohol mikroskop. Bahan media yang digunakan NA (*Nutrien Agar*), MC (*Mac Conkey*), Caso, *Sulfide Indol Motilitas* (SIM), TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), Citrat, Urea, PAD (*Phenil Alanin Diaminase*), Glukosa, Manitol, Maltosa, Laktosa, Sukrosa.

C. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah seri konsentrasi dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.).
2. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid total dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis terhadap *Salmonella typhi*.
3. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kualitas bahan, penetapan waktu kestabilan serapan, media pertumbuhan bakteri, bakteri *Salmonella typhi*, lama inkubasi dan suhu inkubasi.

D. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Ekstrak etanol daun jeruk nipis adalah ekstrak yang diperoleh dari simplisia daun jeruk nipis dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol.
2. Fraksinasi merupakan proses pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Fraksi etil asetat daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) diperoleh dari partisi (ekstraksi cair-cair) ekstrak etanol daun jeruk nipis yang dilarutkan dengan akuades menggunakan pelarut berturut-turut n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan (1:1) difraksinasi menggunakan corong pisah.

3. Penetapan kadar flavonoid total dengan menggunakan larutan baku induk kuersetin. Kadar flavonoid total merupakan kadar flavonoid dalam sampel yang dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin (QE). Kadar flavonoid total didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus total flavonoid, dimana kadar flavonoid dalam sampel (sumbu x) diketahui dengan memasukkan absorbansi sampel ke dalam (sumbu y) pada persamaan regresi linear kuersetin.
4. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* adalah diameter zona radikal di mana bakteri tersebut tidak tumbuh di sekitar *blank disc* yang ditandai dengan adanya daerah bening yang diukur dengan satuan milimeter. Hasil tersebut dapat dilihat setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
5. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis dikatakan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* jika hasil diameter zona hambatnya berbeda bermakna dengan diameter zona hambat dari kontrol negatif yaitu DMSO 10%.
6. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis dikatakan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* yang setara dengan kontrol positif chloramphenicol 30 µg jika menunjukkan hasil interpretasi sensibilitas pada CLSI.

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman jeruk nipis

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah memastikan kebenaran tanaman jeruk nipis berkaitan dengan ciri-ciri morfologisnya yang ada pada tanaman jeruk nipis. Determinasi tanaman jeruk nipis dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Muhammadiyah Surakarta.

2. Persiapan bahan

Daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia* (Christm. & Panz.) Swingle.) ini adalah daun jeruk nipis berasal dari tanaman yang tumbuh di Desa Kemasan, Kartasura Sukoharjo. Teknik pengambilan daun yaitu memetik pada sore hari dengan mengambil daun yang tua, berwarna hijau, daun yang utuh serta tidak berlubang atau sobek-sobek. Daun diambil pada urutan ke empat sampai ke tujuh tiap ranting dari pucuk.

Daun jeruk nipis yang telah dikumpulkan dibersihkan dari pengotor, selanjutnya dicuci di bawah air mengalir sampai bersih kemudian ditiriskan. Daun jeruk nipis tersebut selanjutnya dikeringkan dengan pengeringan kombinasi sinar matahari dan oven. Daun dijemur dibawah sinar matahari dengan cara ditutup kain hitam hingga daun layu, lalu dilanjutkan dengan pengeringan dalam oven pada suhu $50\pm 3^{\circ}\text{C}$ untuk mendapatkan simplisia kering yang ditandai dengan daun ketika di remas akan remuk. Daun yang telah dikeringkan

kemudian dihaluskan dengan blender kemudian diayak menggunakan saringan berukuran 60 mesh (Wicaksono dan Ulfah, 2017).

3. Pembuatan ekstrak etanol daun jeruk nipis

Ekstrak daun jeruk nipis dibuat dengan mengekstraksi 500,0 gram serbuk daun jeruk nipis dalam bejana maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3750,0 mL dengan perbandingan 1:7,5 yaitu 1 bagian simplisia dimasukkan dalam 7,5 bagian penyari, didiamkan selama 3 hari dengan dilakukan pengadukan 1 kali dalam sehari. Hasil maserat disaring dengan kain flanel kemudian residu kembali dengan 1250,0 mL etanol didiamkan selama 1 hari. Hasil maserat yang diperoleh dari maserasi tahap pertama dan kedua disaring dan dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* yang diatur kecepatan putaran 200 rpm dengan suhu 50°C dilanjutkan dengan penguapan di atas penangas air, hingga diperoleh ekstrak kental daun jeruk nipis (Wicaksono dan Ulfah, 2017).

4. Pembuatan fraksi daun jeruk nipis

Ekstrak kental daun jeruk nipis difraksinasi menggunakan pelarut yang memiliki kepolaran berbeda. Sebelumnya 30 gram ekstrak daun jeruk nipis dilarutkan dengan aquadest hangat sebanyak 300 mL, diaduk sampai homogen. Ekstrak dimasukkan ke dalam corong pisah, difraksinasi secara bertingkat dengan ekstraksi cair-cair. Fraksinasi menggunakan pelarut non polar yaitu n-heksan sebanyak 50 mL dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, diperoleh fraksi n-heksan dan

residu air. Selanjutnya residu air difraksinasi menggunakan pelarut semi polar yaitu etil asetat sebanyak 50 mL, pisahkan fraksi etil asetat. Fraksinasi dilakukan hingga didapatkan larutan bening dengan menggunakan 50 mL pelarut untuk sekali penyarian, dengan tujuan mengoptimalkan pemisahan senyawa. Hasil fraksi etil asetat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*, kemudian dipekatkan dengan penangas air hingga diperoleh fraksi etil asetat kental (Muthmaina dkk, 2017).

5. Penapisan fitokimia

a. Pembuatan larutan uji fitokimia

Pembuatan larutan uji fitokimia untuk skrining fitokimia dengan melarutkan 250 mg ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis dalam 25 mL etanol 70% (Susanti, dkk., 2013).

b. Flavonoid

Larutan uji sebanyak 1,0 mL diuapkan, ditambahkan 1,0 mL etanol 70%, kemudian sedikit serbuk magnesium dan 2,0 mL HCl 5M. Warna merah hingga merah lempuyang menunjukkan adanya senyawa flavonol, flavonon, flavonolol, dan dihidroflavonol (Hanani, 2017).

c. Alkaloid

Larutan uji sebanyak 2 mL diuapkan diatas cawan porselin hingga diperoleh residu. Residu kemudian dilarutkan dengan 5

mL HCl. Larutan yang didapat dibagi ke 3 tabung lalu diujikan dengan uji Mayer (+ endapan putih) dan uji Dragendroff (+ endapan merah kecoklatan) (Alamsyah, 2014).

d. Saponin

Larutan uji sebanyak 10 mL dalam tabung reaksi dikocok vertikal selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 detik. Pembentukan busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit menunjukkan adanya saponin. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N, busa tidak hilang (Susanti, dkk., 2013).

e. Tanin

Larutan uji sebanyak 1 mL direaksikan dengan larutan FeCl_3 (+ warna biru kehitaman) (Simaremare, 2014).

f. Terpenoid dan steroid

Larutan uji sebanyak 2 ml diuapkan dalam cawan penguap. Residu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila muncul cincin hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid (Susanti, dkk., 2013).

6. Uji bebas etanol

Ekstrak sebanyak 0,5 g ditambah 2,0 mL asam asetat dan 2,0 mL H_2SO_4 , kemudian dipanaskan. Reaksi positif bebas etanol ditunjukkan dengan tidak tercium bau ester wangi, artinya masih ada kandungan etanol yang mengalami esterifikasi (Scrool, 1998).

7. Pengujian pendahuluan flavonoid secara KLT

Ekstrak etanol daun jeruk nipis, fraksi etil asetat daun jeruk nipis dan perbandingan kuersetin yang telah dilarutkan dengan etanol, ditotolkan bersama-sama pada lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF 254 nm dan fase gerak etil asetat:metanol (3:1). Bercak kromatogram (noda) yang dihasilkan diamati dengan penampak noda sinar ultraviolet 245 nm dan 366 nm, kemudian disemprot dengan $AlCl_3$ 5%. Bercak dengan fluoresensi warna kuning menunjukkan adanya flavonoid (Markham, 1988).

8. Penetapan kadar flavonoid

a. Pembuatan reagen untuk penetapan kadar flavonoid total

1. Pembuatan larutan $AlCl_3$ 10% .

Serbuk $AlCl_3$ sebanyak 5,0 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian dilarutkan dengan sebagian akuades hingga larut sempurna, dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

2. Pembuatan Asam asetat 5%

Asam asetat ditimbang sebanyak 5,0 gram diukur dan dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian dilarutkan dengan sebagian akuades hingga larut sempurna, dimasukkan labu ukur 100,0 mL ditambahkan akuades hingga tanda batas (Depkes RI, 1995).

3. Pembuatan larutan blanko

Alumunium klorida 10% sebanyak 1,0 mL ditambahkan 8,0 mL asam asetat 5% ke dalam labu ukur 10,0 mL dan ditambahkan etanol 70% hingga tanda batas.

4. Pembuatan larutan baku induk kuersetin 1000 ppm

Larutan baku induk 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang 25,0 mg kuersetin dan dilarutkan dengan etanol 70% hingga volume sampai 25,0 mL (Sari, dkk., 2019).

5. Pembuatan larutan baku kuersetin 100 ppm

Konsentrasi 1000 ppm dipipet 1,0 mL ditambahkan etanol 70% ke dalam labu ukur 10 mL hingga tanda batas dan didapatkan konsentrasi 100 ppm (Sari, dkk., 2019).

b. Penentuan *Operating Time* (OT)

Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1,0 mL ditambahkan dengan 1,0 mL AlCl_3 10% dan 8,0 mL asam asetat 5%. Larutan tersebut diukur absorbansinya dengan interval waktu

tiap menit pada panjang gelombang teoritis 414 nm hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Anna dan Noverda, 2017).

c. Penetapan panjang gelombang maksimum kuersetin

Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1,0 mL lalu direaksikan dengan 1,0 mL AlCl_3 10% dan 8,0 mL asam asetat 5% didiamkan selama *operating time*. Lakukan pembacaan dengan spektrofotometri UV-visible pada panjang gelombang 350-450 nm (Das, dkk., 2019).

d. Pembuatan kurva baku kuersetin

Larutan baku induk kuersetin 1000 ppm, kemudian dipipet sebanyak 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; 0,5 mL; 0,6 mL dan ditambahkan etanol 70% sampai volumenya 5 mL sehingga diperoleh konsentrasi yaitu 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, dan 120 ppm. Masing-masing konsentrasi dari seri baku kuersetin dipipet 1,0 mL, kemudian ditambahkan 1,0 mL AlCl_3 10% dan 8,0 mL asam asetat 5%, didiamkan selama *operating time*. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Sari & Ayuchecaria, 2017).

e. Penetapan kadar flavonoid total

Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis masing-masing ditimbang 100,0 mg dilarutkan dengan 100,0 mL etanol 70% kemudian diambil 1,0 mL larutan ekstrak etanol dan

fraksi etil asetat dilarutkan 1,0 mL AlCl_3 , 8,0 mL asam asetat 5% sampel didiamkan selama *operating time*. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Sari & Ayuchecaria, 2017).

9. Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan untuk pemeriksaan mikrobiologi terlebih dahulu disterilkan sebelum digunakan untuk menghindari terjadinya kontaminasi dalam pengujian. Pertama, alat-alat yang akan digunakan didetoks terlebih dahulu lalu dikeringkan. Selanjutnya alat yang telah didetoksifikasi bersama dengan bahan media disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat yang disterilkan menggunakan autoklaf biasanya alat-alat yang terbuat dari kaca seperti tabung reaksi, erlenmeyer dan cawan petri. Alat yang lain dapat disterilisasi dengan dipijarkan pada lampu bunsen atau dicelupkan ke dalam alkohol 70% dan dilewatkan di api bunsen (Kulla, 2016).

10. Karakterisasi bakteri

a. Pewarnaan Gram

- 1) Disiapkan objek glass yang bersih, kering, dan bebas lemak.
- 2) Diambil 1-2 ohse sampel bakteri *Salmomella typhi*, secara aseptis kemudian diratakan pada objek glass.
- 3) Preparat dikering anginkan lalu difiksasi di atas nyala api kemudian dikering anginkan.

- 4) Preparat ditetesi dengan cat Gram A Kristal Violet. Dibiarkan selama 1 menit. Zat warna dibuang dan dicuci dengan air mengalir.
- 5) Preparat ditetesi dengan cat Gram B lugol iodine. Dibiarkan selama 1 menit. Zat warna dibuang dan dicuci dengan air mengalir.
- 6) Preparat ditetesi dengan cat Gram C alkohol. Dibiarkan selama 30 detik lalu segera dibuang.
- 7) Preparat ditetesi dengan cat Gram D safranin. Dibiarkan selama 1 menit. Zat warna dibuang dan dicuci dengan air mengalir.
- 8) Preparat dikeringkan.
- 9) Diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 100×.
- 10) Dicatat hasil pengamatan.

b. Inokulasi bakteri pada media *Mac Conkey*

- 1) Kuman yang telah digoreskan pada media *Mac Conkey* Agar (MCA) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 2) Diamati pertumbuhan koloni pada media.
- 3) Hasil pertumbuhan koloni dicatat.

c. Uji biokimia

1. Uji (*Sulfide Indole Motility*) SIM (Dwinna, dkk., 2016)

- a. Secara aseptis diinokulasikan biakan bakteri dari media ke tryptophan broth, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
 - b. Indol : ditambah 3-4 tetes reagen kovack melalui dinding tabung reaksi. Uji indol positif, ditandai dengan terbentuknya cincin merah.
 - c. Motil : hasil positif jika terdapat pertumbuhan yang menyebar disekitar tusukan atau pada permukaan media atau media menjadi keruh.
 - d. H₂S : hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hitam pada media
2. Uji (*Methyl Red*) MR
 - a. Secara aseptis diinokulasikan biakan bakteri ke media MR, diinokulasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
 - b. Ditambah 2-3 tetes reagen MR. MR positif, jika terbentuk warna merah pada media.
3. Uji (*Voges Proskauer*) VP
 - a. Secara aseptis diinokulasikan biakan bakteri ke media VP, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
 - b. Ditambah 10 tetes reagen Barried dan 3-4 tetes KOH 40%.
 - c. Uji VP positif, jika terbentuk warna pada media.

4. Uji (*Kigler Inron Agar/Triple Sugar Iron Agar*) KIA/TSIA

Secara aseptis diinokulasikan biakan bakteri ke media TSIA diambil 1 ose dan ditanam dengan cara digores pada lereng media dan ditusukan sampai dasar media, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

5. Citrat

Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi tusukan dan gores kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna biru pada media.

6. Urea

Secara aseptis diinokulasikan biakan bakteri ke media, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji urease fermentasi positif ditandai dengan berubahnya warna media menjadi merah.

7. Uji (*Phenil Alanin Diaminase*) PAD

Secara aseptis diinokulasikan biakan bakteri ke media, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan warna hijau pada media setelah ditambahkan HCl 0,1 N sampai media berwarna kuning dan ditambahkan 5 tetes FeCl₃ 10%.

8. Fermentasi karbohidrat

Secara aseptis diinokulasikan biakan bakteri ke media, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Gula-gula positif ditandai dengan media berwarna kuning. Adanya indikator Phenol Red akan menyebabkan media menjadi kuning. Gas (+) ditandai dengan kosongnya tabung durham.

11. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri dari hasil uji biokimia khas yaitu pada media TSIA dibuat suspensi bakteri dengan menggunakan larutan NaCl fisiologi. Dengan cara koloni bakteri diambil lima ohse bakteri uji *Salmonella typhi* kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10mL NaCl 0,9%, lalu dikocok sampai homogen. Kekeruhan suspensi bakteri tersebut lalu dibandingkan dengan standar Mac Farland 0,5 (Handayani, 2016).

12. Uji antibakteri ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis terhadap bakteri uji

Media agar NA yang telah disterilkan dimasukkan ke dalam cawan petri steril masing-masing sebanyak 10 mL dan dibiarkan memadat pada suhu kamar. Media tersebut ditambahkan dengan 100 μ L suspensi bakteri uji dan diratakan dengan menggunakan kapas lidi steril sampai rata. Medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Kertas cakram steril dengan diameter 6 mm ditetaskan ekstrak etanol dan fraksi etil

asetat daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) sebanyak 30 μL dengan masing-masing konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75% dan 100%, kemudian diletakkan pada media agar padat yang telah ditetesi 100 μL suspensi bakteri uji. DMSO 10% sebagai kontrol negatif, dan kertas cakram chloramphenicol 30 μg sebagai kontrol positif, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan setelah diinkubasi diukur zona hambat yang terbentuk yang ditandai dengan adanya zona bening kemudian diameter diukur menggunakan jangka sorong. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Prayoga, 2013).

F. Analisis Hasil

1. Perhitungan rendemen

Ekstrak etanol dan fraksi etik asetat yang diperoleh kemudian dihitung rendemennya dengan rumus:

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{bobot yang diperoleh}}{\text{bobot bahan awal}} \times 100\%$$

2. Analisis kualitatif flavonoid

Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat dan jeruk nipis dianalisis dengan pereaksi warna dan KLT. Uji reagen dengan etanol dan serbuk Mg ditambah dengan HCl jika berwarna merah lembayung maka positif mengandung flavonoid. Pengujian flavonoid menggunakan KLT, noda diamati dengan penampak noda sinar ultraviolet 254 nm dan 366 nm. Flavonoid dengan KLT diidentifikasi dengan penyemprotan AlCl_3 yang akan memberikan warna kuning, diukur

nilai Rf noda pada masing-masing sample standar kuersetin (Hanani, 2017).

3. Perhitungan regresi linier

Kadar flavonoid dihitung menggunakan persamaan linier berdasarkan kurva baku hasil pembacaan spektrofotometer UV-Vis. Data absorbansi diperoleh dari pengukuran dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier sebagai y dan nilai x sebagai konsentrasi larutan baku.

Persamaan regresi linier dinyatakan dengan: $y = bx + a$

Keterangan : y = absorbansi

x = konsentrasi (ppm)

b = slope

a = intersep

4. Perhitungan koefisien variasi (KV)

Data penetapan kadar flavonoid total tiap replikasi pada masing-masing proses ekstraksi dan fraksi etil asetat dihitung nilai koefisien variasi. Koefisien variasi (KV) digunakan untuk mengetahui kesesuaian analisis satu dengan hasil analisis lain dari suatu seri pengukuran yang diperoleh dari sampling acak secara berulang dari sampel homogenya. Koefisien variasi yang baik adalah kurang dari 2% (Snyder dan Kirkland, 2010).

$$\%KV = \frac{\text{standar deviasi}}{\text{rata-rata kadar sampel}} \times 100\%$$

5. Standar uji sensitivitas antibakteri

Antibiotik	Konsentrasi	Interpretasi Sensibilitas			Keterangan
		Sensitif	Intermediet	Resisten	
Chloramphenicol (cl)	30 μ g	≥ 18	13-17	≤ 12	<i>Salmonella typhi</i>

Sumber: *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, 2019

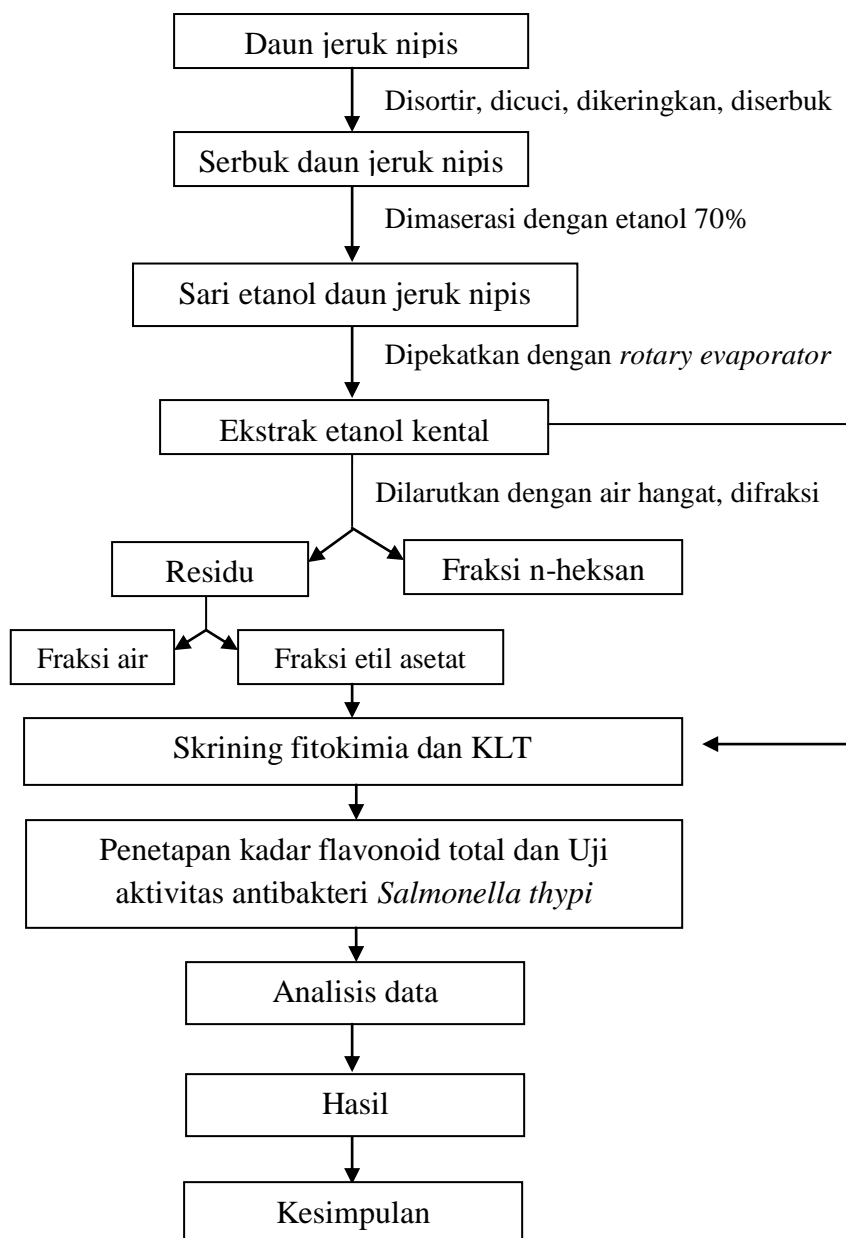
Tabel 1. Standar Sensitivitas Antibakteri

6. Uji statistika

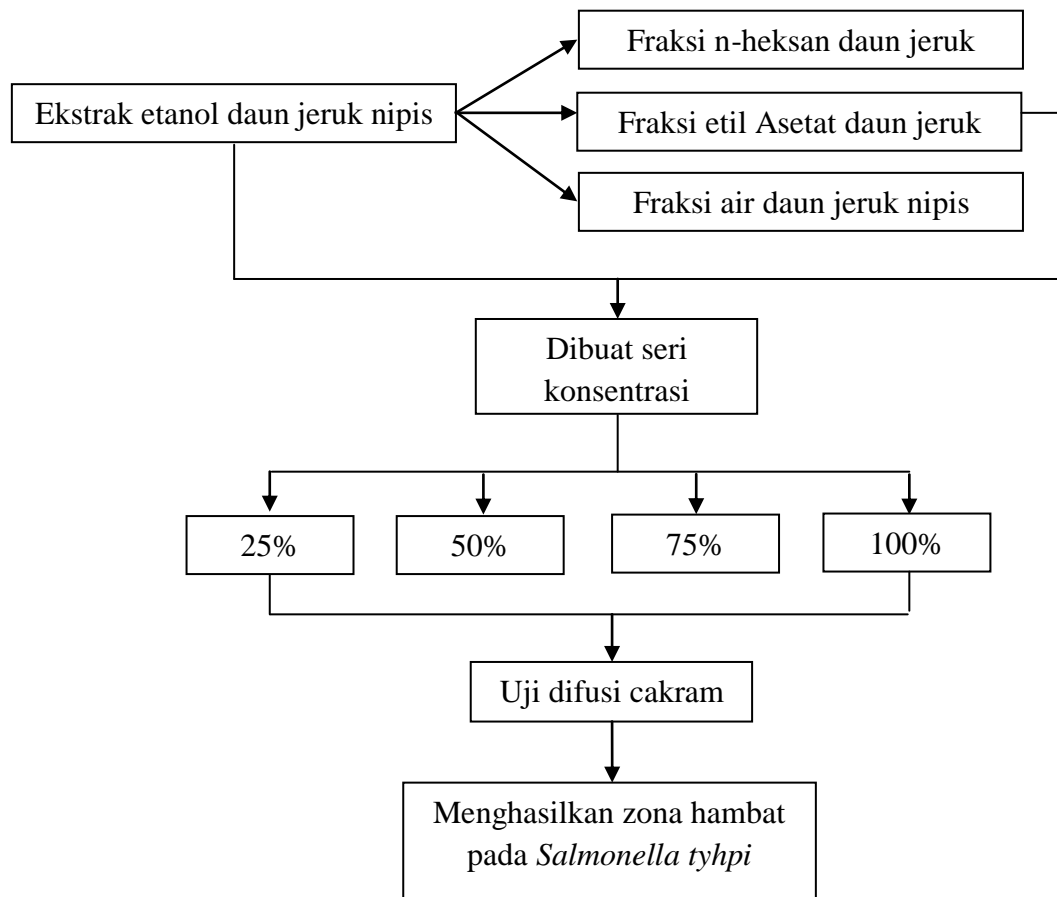
Uji analisis statistika kadar flavonoid total ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis dengan menggunakan uji *Independent T test* digunakan untuk menguji rata-rata anatar dua kelompok independen, sehingga uji ini digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan kadar flavonoid total yang signifikan antara sampel ekstrak etanol dan fraksi daun jeruk nipis (Riyanto, 2011).

Aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis terhadap bakteri *Salmonella typhi* data diameter zona hambatnya dapat dilihat dari hasil uji statistika *One Way Anova* menggunakan aplikasi SPSS. Uji ANOVA dilakukan atas dasar asumsi bahwa data terdistribusi normal dan varian data homogen. Jika $p < 0,05$ (ada beda nyata) pada uji ANOVA, maka analisis dilanjutkan uji Duncan. Jika $p < 0,05$ (tidak ada beda nyata) pada *Homogeneity of Variance* variasi data tidak homogen, maka analisis dilanjutkan dengan uji non parametrik *K-Independent* sampel (Febrianasari, 2018).

G. Alur Penelitian



Gambar 5. Bagan pembuatan ekstrak dan fraksi daun jeruk nipis serta penetapan kadar Flavonoid Total



Gambar 6. Bagan uji aktivitas antibakteri

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa

1. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis memiliki rata-rata kadar flavonoid total sebesar 1,0324 %QE dan 1,2702%QE. Kadar flavonoid total dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis memiliki perbedaan signifikan $p=0,000$ ($p<0,05$) berdasarkan uji statistik menggunakan *Independent Samples T-Test*.
2. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis pada semua konsentrasi mampu menghambat bakteri *Salmonella typhi* dengan diameter rata-rata sebesar 10,4 mm dan 12,63 mm ($p=0,000$), yang artinya data tersebut memiliki perbedaan bermakna dengan kontrol negatif DMSO 10% ($p<0,05$).
3. Kemampuan daya hambat bakteri *Salmonella typhi* dari sampel ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun jeruk nipis belum setara dengan kontrol positif chloramphenicol yang memiliki diameter rata-rata sebesar 34,5 mm.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut lagi mengenai kandungan flavonoid dalam bentuk sediaan serta melakukan isolasi senyawa aktif yang terdapat dalam daun jeruk nipis yang bertanggung jawab sebagai antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar U Zage1., Sani Tajo., and Muhammad Ali., 2018, Antibacterial Activity of Citrus Aurantifolia Leaves Extracts Against Some Enteric Bacteria of Public Health Importance, *Lupine publishare*, ISSN: 2641-6921
- Adi, P., Noorhamdani, A. S., & Irene, G. C., 2010, Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bawang Putih (*Allium sativum*) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* Penyebab Karies Secara in vitro, *Tesis*, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Afif, S. 2013. Ekstraksi Uji toksisitas dengan Metode BSLT dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah (*eucheuma Spinosum*) dari perairan Sumenep Madura. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
- Alamsyah, H. K., Ita W., Agus S, 2014, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut Sargassum cinereum (J.G.Agaradh) Dari Perairan Pulau Panjang Jepara Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermidis*, *Journal Of Marine Research*, 3 (2) : 69-78.
- Alpriansyah, Siska Musiam, Amaliyah Wahyuni, 2012, Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak Metanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan Metode Spektrofotometri UV-Visible. *Jurnal Ilmiah*, 14 (2), 14-21.
- Anief, M 2006, *Ilmu meracik obat: teori dan praktik*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Asmorowati, Hani dan Lindawaty N., Y., 2019, Penetapan Kadar Flavonoid Total Alpikat (*Persea americana* Mill.) dengan Metode Spektrofotometri. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 15 (2), 51-63.
- Arum, Supartono, Sudarmin., 2012, Isolasi dan Uji Daya Antimikroba Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*), *Jurnal MIPA* 35 (2):165-174.
- Arwin, M., F. G. Ijong, dan R. Tumbol., 2016, Characteristics of *Aeromonas hydrophila* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic science & management*, 4(2):58.

- Ayu, Dewi dan Sjahrini, Dewi Andini Kunti Mulangsri, 2014, Aktivitas Antibakteri Beberapa Fraksi Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Semarang.
- Azizah, B., dan Salamah, N., 2013, Standarisasi Parameter Non Spesifik dan Perbandingan Kadar Kurkumin Ekstrak Etanol dan Ekstrak Terpurifikasi Rimpang Kunyit, *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 3 (1), 21-30.
- Benigna, Maria, 2015, Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Keji Beling (*Srobillanthes crispa* Bl.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella typhi* Secara In Vitro, *Skripsi*, Fakultas MIPA Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Binawati, D. K., dan Amilah, S., 2013, Effect of Cherry Leaf (*Muntingia calabura* L.) Bioinsecticides Extract Towards Mortality of Worm Soil (*Agrotis ipsilon*) and Armyworm (*Spodoptera exiqua*) on Plant Leek (*Allium fistolum*), *Wahana*, 61(2): 51-57.
- Brink, B., 2013, *Urease test Protocol*. American society for microbiology. 5 Juli 2020).
- Brooks, G.F., Butel, J.S., and S.A. Morse., 2008, Jawetz, Melnick JL, Adelberg, EA. *Mikrobiologi Kedokteran*. 20th Ed. Salemba Medika, Jakarta.
- Brooks, G. F., Janet S Butel, Stephen A Morse. 2013. *Mikrobiologi kedokteran jawetz, melnick, dan adelberg*. Edisi ke-23. Jakarta: EGC.
- Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC) . 2009. *Jeruk Nipis (Citrus aurantiifolia)*. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. <http://ccrcfarmasiugm.wordpress.com/>
- Cappucino, J. G., & Sherman, N., 2014, *Manual Laboratorium Mikrobiologi*, Edisi 8, Jakarta, EGC.
- Cushnie, T. P. & Lamb, A. J., 2005, Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- Das, N., Md. E. Islam., N. Jahan., M. S. Islam., A. Khan, Md. R. Islam, & Mst. S. Parvin. 2014. *Antioxidant Activities of Ethanol Extracts and Fractions of Crescentia cujete Leaves and Stembark and The Involvement of Phenolic Compounds*. BMC Complementary and Alternative Medicine.14-45.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2018, *Pengujian Mikrobiologi Pangan.*, <http://www.pikiran-rakyat.com>. Diakses pada tanggal 17 Desember 2019.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995, *Materia Medika Indonesia Jilid VI*, Departemen Kesehatan RI : Jakarta.
- Dewi Andini Kunti Mulangsri, Riza Laksanasari, Rizqi Amaliyah, Assyifatul Fitri dan Awal P. Kusumadewi., 2018, Aktivitas Antibakteri Beberapa Fraksi Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*
- Ditjen POM. 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Cetakan Pertama, Departemen Kesehatan RI. Halaman 3-5, 10-11, Jakarta.
- Dwinatari, I.K., dan Murti, Y.B., 2015, Pengaruh waktu Pemanenan dan Tingkat Maturasi Daun terhadap Kadar Voteksikarpin dalam Daun Legundi (*Vitex trifolia* L.), *Traditional medicine journal*.
- Dyozem, J. P., Hamamoto, H., Ngameni, B., Ngadjui, B. T., dan Sekimizu, K., 2013, *Antimicrobial Action Mechanism of Flavonoids from Dorstenia species*, *Drug Discoveries & Therapeutics*, 7(2): 66-72.
- Edawati, Z., 2012, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol *Ascidia Didemnum* sp. Dari Kepulauan Seribu dengan Metode 1,1-Difenil-2- Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi Teraktif. *Skripsi*. FMIPA UI. Depok.
- Ergina, Siti N., dan Indarini D.P., 2014, Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Diekstraksi dengan Pelarut Air dan Etanol, *Jurnal Akademi Farmasi*, 3(3), 165:172.
- Firizki, F. 2014. *Pola Kepekaan Escherichia coli and Klebsiella sp. To Antibiotic Sefalosporin Period Of Year 2008-2013 Di Bandar Lampung*. Bandar Lampung Medical Journal of Lampung University
- Gandjar, I. G., dan Rohman, A., 2017, *Kimia Farmasi Analisis*, Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Gu, T., 2000, *Liquid-Liquid Partitioning Methods for Bioseparations*, Academic Press, 2,329-364.
- Gunawan, I W. G., Gede Bawa, I G. A., Sutrisnayanti, N. L., 2008, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang Aktif Antibakteri pada Herba Meniran (*Phyllanthus niruri Linn*), *Jurnal Kimia*, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana.
- Hanani, E., 2017, *Analisis Fitokimia*, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Handayani, V., 2016, Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*) Terhadap Bakteri Penyebab Jerawat, *Skripsi*, Universitas Muslim Indonesia, Makassar.
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, ITB: Bandung.
- Hardjoeno, H., dkk., 2007, *Interprestasi hasil tes laboratorium diagnostik*, Hasanuddin University Press (LEPHASS), Makassar.
- Hastuti, F.I., 2017, Uji Efektivitas Penangkapan Radikal Bebas DPPH dari Kombinasi Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum L.*) dan Ekstrak Daun Bayam Hijau (*Amaranthus hybridus*), *Karya Tulis Ilmiah*, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Surakarta.
- Huda, N., 2001, Pemeriksaan Kinerja Spektrofotometer UV-Vis, GBC 911A Menggunakan Pewarna Tartrazine CI 19140, *Sigma Epsilon ISSN 0859013 No. 20-21*.
- Indrayani, Lani dkk, 2007 “Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis L. Vahl*) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach.” *Jurnal Fakultas MIPA Universitas Kristen Satya Wacana*.
- ITIS (*Integrated taxonomic information system*), 2011, Taxonomic Hierarchy: *Citrus aurantiifolia.*, https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=506403#null,23 November 2020
- Jamilah, 2015, Evaluasi Keberadaan Gen cat P terhadap Resistensi Kloramfenikol Pada Penderita Demam Tifod
- Jansen, A. M., C. V. Lockatell, D. E. Johnson, and H. L. Mobley., 2013, Visualization of *Proteus mirabilis* morphotypes in the urinary tract: the

elongated swarmer cell is rarely observed in ascending urinary tract infection, *Infect Immun*, 71:3607–3613.

Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg E. A., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran, terjemahan dari Medical Microbiology oleh Mudihardi, Kuntaman, Warsito, Mertaniasih, Harsono, dan Alimsardjono*, Salemba Medika, Surabaya.

Kharismayanti, A. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) Terhadap *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 Secara In Vitro. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*. FKIP Universitas Mataram.

Kulla, P.D., 2016, Uji Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Bawang Lanang (*Allium sativum L*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *S aureus* dan *E coli*, *Skripsi*, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.

Kusuma, P., 2013, Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Daya antioksidasi dari Ekstrak Etanol buah Pare (*Momordica charantia L.*), *Skripsi*, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri *Alauddin*, Makasar.

Lumempouwa, L.I., E. Suryantoa, and J.J.E. Paendonga, Aktivitas Anti UV-B Ekstrak Fenolik dari Tongkol Jagung (*Zea mays L.*). *Jurnal Mipa Unsrat Online*, 2012. 1(1): p. 1-4.

Machfud Ibrahim, Putri Avnita, Muhammad, Nurul A., Leliana, S.D.P., 2014, *Efektifitas Ekstrak Daun Belimbing Wuluh Sebagai Bahan Inhibitor Korosi Pada Kawat Ortodonti*, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember, Jember.

Markham., 1988, *Cara Identifikasi Flavonoid*, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB : Bandung

Marliana, S., Suryanti, Suyono, 2005, *Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (Sechium edule Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol*, Surakarta: Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Sebelas Maret.

Misnardiary, dan Husjain Djajaningrat, 2014, *Mikrobiologi Untuk Klinik dan Laboratorium*, PT Rineka Cipta, Jakarta hal 130-135.

Mulyati, Endah Sri., 2009, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus (L.) Skeels*) Terhadap *Staphylococcus aureus*

Dan Escherechia coli Dan Bioautografinya. Skripsi. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

- Muthmaina, Ina., Sri, Harsodjo, WS., Maifitrianti, 2017, Aktivitas Penyembuhan Luka Bakar Fraksi Dari Ekstrak Etanol 70% Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Pada Tikus. *Farmasains vol 4 no2.* Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA Islamic Center, Jakarta Timur.
- Mutiasari, I. R., 2012, Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Aktif, *Journal.* Jakarta : FMIPA-UI.
- Neldawaati., Ratnawulan., Gusnedi., Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid Berbagai Jenis daun Tanaman Obat. Padang : Pillar Physics, Vol (2).
- Oktavia, Nita, 2013, Pemanfaatan Daun Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) Danbatang Serai (*Andropogon Nardus L*) Untuk Insektisida Alami Pembasmi Kutu Beras (*Sitophilus Oryzae*). *Skripsi.* Fakultas Biologi, Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Ola Beda, Theodorus., 2018, Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides [L.] Presl*) Dengan Metode Kolorimetri $AlCl_3$. *Skripsi.* Bandar Lampung : Fakultas Farmasi, Universitas Lampung.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G.S., dan Vyvyan, J. R. 2009. *Introduction to Spectroscopi.* Sauders College: Philladelphia.
- Pelczar & Chan., 2008, *Mikrobiologi Dasar Jilid 1.* Jakarta: Gramedia Pustaka.
- Pelczar, M. J., Chan E. C. S. and Pelczar, M. F., 1986, *Dasar-dasar Mikrobiologi,* Penerjemah: Hadioetomo, R. S. dkk, Jilid I, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Pratiwi, I. D. 2017. Uji Efektivitas *Andrographis paniculata* (Sambiloto) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Skripsi.* Bandar Lampung : Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung.
- Prayoga, Eko., 2013, Perbandingan Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) Dengan Metode Difusi Disk Dan Sumuran Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Skripsi,* Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.

- Radji, Maksum., 2010, *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*, Jakarta: EGC.
- Rahayu, SA dan Muhammad, HG, 2017, Uji Cemar Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*. *IJPST*, 4(2):50-56.
- Ramdani, Salmiwanti., 2016, Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi N-Heksana Daun Pegagan (*Centella asiatica* L. *Urban*) Dan Uji Antibakteri Terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, *Skripsi*, Fakultas Sains Dan Teknologi UIN Alauddin Makassar
- Ramadhani, N., Agung Giri S., Lea Wati I. P., 2020, Analisis Penetapan Kadar Flavonoid Sari Jeruk Kalamansi (*Citrofortunella microcarpa*) Dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS, *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, Vol 6.No.1
- Razak, Abdul, dkk. 2013. Uji Daya Hambat Air Perasan Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* s.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus* Secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2013; 2(1)
- Sangi, M., M. R. J. Runtuwene., H. E. I. Simbala, dan V. M. A. Makang, 2008, Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chem, Prog.*, 1 (1) : 47-45.
- Sari, A. K., & Ayuchecaria, N. (2017). Penetapan kadar fenolik total dan flavonoid total ekstrak beras hitam (*Oryza Sativa* L) dari Kalimantan Selatan. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 2(2), 327– 335
- Schoorl., 1998. *Materi Pelengkap Kemurnian Cara Pemisahan Obat*. Yogyakarta. Gajah Mada University Press.
- Sepahpour, S., Selamat, J., Manap, M. Y., & Razis, A. F., 2018, Comparative Analysis of Chemical Composition,. *Jounal Molecules V (23) Ed 402* , 2 - 17.
- Sertini, F. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Dan Fraksi n-Heksan serta Etil Asetat Buah Sawo terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi*. *Skripsi*. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Halaman 8-20.
- Sholeh S.N., 2009, Uji Aktivitas Ekstrak n-heksanaa dan Etanol Daun Sirih terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Basillus Subtillis*

- dan Identifikasi Senyawa Aktifnya, *Skripsi*, Fakultas Saintek UIN Suka, Yogyakarta.
- Silvia Sari Prastiwi dan Ferry Ferdiansyah, 2014, Review Artikel: Kandungan Dan Aktivitas Farmakologi Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia S.*), *Jurnal Farmaka*. Siplemen Volume 15 Nomor 2.
- Simaremare, dkk, 2014, *Formulasi dan evaluasi daun gatal (Laportea decumana (Roxb.) Wedd) sebagai kandidat antinyeri*, Tanaman Obat Indonesia.
- Snyder, R.L., Kirkland, J.J., 2010, *Introduction Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Sudirman, T., A., 2014, Uji Efektivitas Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro, *Skripsi S1*, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hasanuddin, Makasar.
- Sukadana, I. M., 2010, Aktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Kulit Akar Awar-Awar (*Ficus septica* Burm F), *Jurnal Kimia*, 4(1): 63-70.
- Susi R, Muhamad G., 2017, Uji Cemaran Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung Dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*, *Jurnal farmasi akademi bumi farmasi Siliwangi*, Volume 4, Nomor 2.
- Syamsiah, 2011. *Taksonomi Tumbuhan Tinggi*. Universitas Negeri Makassar Press.
- Syamsudin., dan Warono, D., 2013, *Unjuk kerja spektrofotometer untuk analisis zat aktif ketoprofen*, Fakultas Tekni: Universitas Muhammadiyah Jakarta.
- Talaro, K. P., 2008, *Foundation in Microbiology: Basic Principles*, Sixth Edition, Mc Graw Hill, New York.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur G. & Kaur H., 2011, Phytochemical Screening And Extraction: A Review, *International Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 98-106.
- Waluyo dan Lud, 2010, *Mikrobiologi Lingkungan*, Universitas Muhammadiyah Malang, Malang Press.
- Watson, Rachel, 2012, *Sulfur Indole Motility Media (SIM)*, Available, (16 Juli 2020).

- Wicaksono, B. I., dan Ulfah, M., 2017, Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak etanol Daun Sirsak dan Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) dengan Metode DPPH. *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*, Vol (2), No. 1.
- Wulandari Syuriati dan Suryani Lilis., 2008, Deteksi Kuman Salmonella pada Ayam Goreng yang Dijual di Warung Makan dan Pola Kepekaan terhadap Berbagai Zat Antibiotik, *Jurnal Mutiara Medika*, Vol. 8. No 2: 102-106.
- Zirconia, Nunung Kurniasih, Vina Amalia, 2015, Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Kembang Bulan (*Tithonia Diversifolia*) dengan Metode Pereaksi Geser, *Jurnal Ilmu Kimia dan Terapan*, Vol(2), No 1.