

# PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SERTA PENETAPAN KADAR FLAVONOID EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH MERAH (*Piper ornatum* N.E.Br.) DENGAN METODE EKSTRAKSI MASERASI DAN *ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION*

<sup>1</sup>Yani Lukmayani\*, <sup>1</sup>Giffar Abdiljabbar Najmudin, <sup>1</sup>Kiki Mulkiya Yuliawati

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Islam Bandung

## Info Article

## ABSTRAK

Submitted :  
16 November 2023

Revised :  
22 Desember 2023

Accepted :  
16 Juli 2024

Corresponding Author :  
Yani Lukmayani

Email :  
[lukmayani@gmail.com](mailto:lukmayani@gmail.com)

Tanaman sirih merah (*Piper ornatum* N.E.Br.) telah digunakan secara turun temurun (empiris) dan terbukti memiliki berbagai macam aktivitas farmakologi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan serta kadar flavonoid ekstrak etanol daun sirih merah dengan metode ekstraksi maserasi dan *ultrasound-assisted extraction* (UAE). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai IC50 sedangkan kadar flavonoid dinyatakan dalam nilai QE (*Quercetin equivalent*). Daun sirih merah diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi dan *Ultrasound-assisted extraction* (UAE) dengan variasi waktu 20, 30, 40 menit. Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH dan penetapan kadar flavonoid secara spektrofotometri dengan pereaksi Aluminium klorida (AlCl<sub>3</sub>). Hasil uji antioksidan ekstrak maserasi dan ultrasonik 20, 30 dan 40 menit menunjukkan nilai IC50 berturut-turut sebesar 36,54; 34,22; 32,00 dan 30,76 ppm. Hasil penetapan kadar flavonoid ekstrak maserasi dan ultrasonik 20, 30 dan 40 menit menunjukkan kadar flavonoid berturut-turut sebesar 4,07; 4,22; 4,27 dan 4,32 mgQE/g ekstrak. Hasil pengujian menunjukkan bahwa *Ultrasound-assisted extraction* merupakan metode ekstraksi yang menghasilkan aktivitas antioksidan serta kadar flavonoid yang lebih baik daripada metode maserasi, meskipun berdasarkan uji statistika perbedaan metode ekstraksi dapat berpengaruh signifikan terhadap kadar flavonoid, namun tidak berbeda signifikan terhadap aktivitas antioksidan.

**Kata Kunci:** antioksidan, flavonoid, *Piper ornatum*, maserasi, ultrasonik

## Access this article

## ABSTRACT



*Ornamental piper (Piper ornatum N.E.Br.) has been used empirically and has been shown to have various pharmacological activities. This study aims to determine the antioxidant activity and flavonoid content of ethanol extract of Ornamental piper leaves using maceration and ultrasound-assisted extraction (UAE) methods based on IC50 values and flavonoid levels expressed in QE (Quercetin equivalent). Ornamental piper leaves were extracted using 96% ethanol solvent by maceration and Ultrasound-assisted extraction*

(UAE) methods (20, 30, 40 minutes). Determination of antioxidant activity was carried out by the DPPH method and the determination of flavonoid levels by the spectrophotometric with Aluminium chloride (AlCl<sub>3</sub>) reagent. The results of the maceration and ultrasonic extract antioxidant tests for 20, 30 and 40 minutes showed IC<sub>50</sub> values of 36.54; 34.22; 32.00 and 30.76 ppm. The results of determining the flavonoid content of maceration and ultrasonic extracts for 20, 30 and 40 minutes showed flavonoid levels of 4.07; 4.22; 4.27 and 4.32 mgQE/g extract. The test results show that Ultrasound-assisted extraction is an extraction method that produces better antioxidant activity and flavonoid levels than the maceration method, although based on statistical tests differences in extraction methods can have a significant effect on flavonoid levels, but do not differ significantly on antioxidant activity.

**Keywords:** antioxidants, flavonoid, *Piper ornatum*, maceration, ultrasonic

## 1. PENDAHULUAN

Salah satu tanaman obat yang tumbuh subur di Indonesia dan telah digunakan secara empiris (turun temurun) adalah sirih merah dengan nama latin *Piper ornatum* N.E.Br atau *Piper crocatum* Ruiz & Pav.. Bagian tanaman sirih merah yang banyak dimanfaatkan adalah bagian daunnya. Sirih merah mengandung senyawa alkaloid, polifenol, tanin, flavonoid, steroid, monoterpen dan seskuiterpen. Pengujian farmakologi menunjukkan tanaman sirih merah memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, antimikroba, antijamur, antihiperqlikemi, antiproliferasi serta antioksidan (Parfati *et al.*, 2017). Hasil penelitian Sholikhah (2023) menunjukkan bahwa senyawa aktif antioksidan pada bunga honje hutan yang berhasil diisolasi adalah senyawa flavonoid golongan flavon.

Senyawa yang terkandung dalam tanaman dapat diperoleh melalui metode ekstraksi dengan metode dan pelarut yang sesuai sehingga senyawa dapat ditarik secara spesifik berdasarkan tingkat

kepolarannya. Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi seperti ukuran bahan, waktu ekstraksi, suhu ekstraksi, jenis dan jumlah pelarut (Masluhah *et al.*, 2016). Waktu ekstraksi memiliki pengaruh yang besar terhadap ekstraksi, waktu ekstraksi yang terlalu lama atau terlalu singkat dapat mempengaruhi sifat fisik dan kimia dari bahan yang terekstrak. Kojic *et al.*, (2011) melaporkan bahwa yang berperan yang penting dalam ekstraksi senyawa fenolat adalah suhu dan waktu ekstraksi. Proses ekstraksi dengan metode maserasi yang didasarkan pada kemampuan pelarut untuk dapat menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung berbagai komponen aktif dan metode *ultrasound assisted extraction* (UAE) merupakan metode ekstraksi dengan memanfaatkan efek gelombang ultrasonik yang dapat meningkatkan laju perpindahan massa serta dapat memecahkan dinding sel dengan banyaknya resonansi gelombang sehingga akan mempersingkat waktu proses ekstraksi (Marjoni, 2016 dan Fuadi, 2012).

Metode pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan radikal DPPH (2,2-difenil-2-pikrilhidrazil) merupakan pengujian antioksidan berdasarkan transfer elektron yang menghasilkan larutan berwarna ungu/violet dalam pelarut etanol. Radikal bebas ini stabil pada suhu kamar, namun dapat direduksi dengan adanya molekul antioksidan, yang mengakibatkan berkurangnya intensitasnya warna ungu/violet. Penggunaan uji DPPH merupakan cara pengujian yang mudah dan cepat untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dengan spektrofotometri UV-Sinar tampak (Garcia *et al.*, 2012). Penelitian yang dilakukan oleh Marwati, dkk. (2022) dalam menguji beberapa metode ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa metode sonikasi memberikan aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan metode refluks dan maserasi dengan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut 6,24 µg/mL; 6,97 µg/mL dan 15,33 µg/mL. Penelitian yang telah dilakukan oleh Tonahi *et al.*, (2014) dalam pengujian antioksidan dari daun sirih merah dengan metode maserasi diperoleh nilai IC<sub>50</sub> sebesar 47,45 ppm yang termasuk sangat kuat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan serta kadar flavonoid ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper ornatum* N.E.Br.) dengan metode maserasi dan *ultrasound-assisted extraction* (UAE) sehingga dari hasil penelitian ini dapat memberikan informasi dan menambah ilmu pengetahuan tentang metode ekstraksi yang berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan serta kadar flavonoid ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper ornatum* N.E.Br.).

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1 Alat

Alat yang digunakan terdiri dari maserator, alat ekstraksi ultrasonik (Branson 2800), *stopwatch*, *vacuum rotary evaporator*, penangas air, timbangan digital (OHAUS), spektrofotometer UV-Sinar tampak (Shimadzu UV-1800), vorteks, lemari pengering simplisia, blender, serta alat gelas yang umum digunakan di Laboratorium.

### 2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun sirih merah yang diperoleh dari Perkebunan Manoko, Lembang-Jawa Barat, etanol 96% (teknis), etanol (*pro analisis*, Merck®), DPPH (Merck®), vitamin C (Merck®), kuersetin (Merck®), Alumunium klorida (AlCl<sub>3</sub>), Besi (III) klorida (FeCl<sub>3</sub>), aquades, kertas saring dan alumunium foil.

### 2.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental di Laboratorium Riset Farmasi, FMIPA, Universitas Islam Bandung dengan tahapan sebagai berikut:

#### 2.3.1 Determinasi dan Preparasi Bahan

Determinasi daun sirih merah dilakukan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, dengan nomor determinasi tumbuhan 898/IT1.C11.2/TA/00/2023. Daun sirih merah dicuci kemudian dipisahkan antara daun dan batangnya, kemudian dilakukan pengeringan dalam lemari pengering dan dihaluskan dengan menggunakan blender kemudian diayak. Serbuk daun sirih merah disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

### 2.3.2 Ekstraksi Daun Sirih Merah (*Piper ornatum* N.E.Br.)

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan 2 metode ekstraksi yaitu maserasi dan *ultrasound-assisted extraction*. Pada metode maserasi ditimbang sebanyak 400 gram simplisia daun sirih merah kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 selama 3×24 jam, hasil yang diperoleh disaring kemudian diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada 60 rpm dan suhu 50°C, ekstrak diletakkan pada cawan porselen dan dikentalkan menggunakan penangas air pada suhu 60°C sehingga diperoleh ekstrak kental (Kemenkes RI, 2017). Pada metode *ultrasound-assisted extraction* ditimbang masing-masing 25 gram

simplisia daun sirih merah yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 pada 3 labu erlenmeyer, kemudian setiap labu erlenmeyer disimpan pada alat ekstraksi ultrasonik selama 20, 30 dan 40 menit dengan frekuensi sebesar 40 kHz amplitudo 40% (Kanifah, 2015). Ekstrak yang diperoleh disaring kemudian diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada 60 rpm dan suhu 50°C, kemudian ekstrak diletakkan pada cawan porselen dan dikentalkan menggunakan penangas air pada suhu 60°C sehingga diperoleh ekstrak kental (Kemenkes RI, 2017). Hasil dari kedua metode tersebut dilakukan perhitungan persen rendemen ekstrak dengan menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

### 2.3.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan

#### a. Pembuatan Larutan Pereaksi DPPH

Sebanyak 6 mg serbuk DPPH dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL tertutup kemudian ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas didapat larutan induk DPPH 60 ppm. Kemudian ditentukan panjang gelombang maksimum DPPH dengan Spektrofotometer UV sinar tampak pada panjang gelombang 800 – 400 nm (Molyneux, 2004).

#### b. Pembuatan Larutan Standar Vitamin C

Ditimbang serbuk vitamin C sebanyak 10 mg lalu dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL dan dilarutkan dengan etanol p.a sebanyak 100 mL kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL

(100 ppm). Kemudian larutan standar dibuat menjadi beberapa konsentrasi yaitu 1, 2, 4, 8 ppm dari larutan standar kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Dipipet 2 mL dari masing-masing konsentrasi kedalam tabung reaksi tertutup kemudian ditambahkan 2 mL larutan DPPH 60 ppm, divorteks selama 1 menit dan diinkubasi selama 30 menit dalam suhu ruang kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV sinar tampak pada panjang gelombang yang telah ditentukan (Huliselan *et al.*, 2015).

#### c. Pembuatan Larutan Uji

Ditimbang sebanyak 10 mg ekstrak etanol daun sirih merah dari 4 sampel ekstrak, dilarutkan pada gelas kimia 100 mL dengan etanol p.a kemudian

dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL sehingga didapat larutan uji 100 ppm. Selanjutnya larutan uji dibuat variasi konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, dan 80 ppm, dipipet dari tiap larutan uji sebanyak 2 mL lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi tertutup, kemudian ditambahkan larutan DPPH 60 ppm masing-masing 2 mL. Sampel divorteks selama 1 menit dan diinkubasi selama 30 menit, sampel larutan uji diukur nilai absorbansi dengan spektrofotometer UV-Sinar tampak pada panjang gelombang maksimum DPPH.

#### d. Penentuan Nilai $IC_{50}$

Konsentrasi sampel pada sumbu x dan persen inhibisi y pada persamaan regresi linier, persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai  $IC_{50}$ . Seri pengenceran larutan uji, larutan seri perbandingan vitamin C dan blanko diukur serapan pada spektrofotometer dengan panjang gelombang maksimum 516,00 nm. Nilai persentase hambatan DPPH dihitung menggunakan nilai *Inhibition Concentration* 50% ( $IC_{50}$ ), yaitu konsentrasi bahan yang dapat menghambat radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Nilai % inhibisi dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{[\text{Absorbansi kontrol}] - [\text{Absorbansi sampel}]}{[\text{Absorbansi kontrol}]} \times 100\%$$

Nilai dari % inhibisi tersebut diplotkan dalam sebuah grafik. Dari grafik tersebut diperoleh persamaan garis regresi linier  $y = bx + a$ , dengan nilai  $y = 50$  dan nilai  $x =$  menunjukkan  $IC_{50}$  (Molyneux, 2004).

#### 2.3.4 Pengujian Antidepresan dengan Metode *Forced Swimming Test*

##### a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Sebanyak 10 mg kuersetin dimasukkan kedalam gelas kimia 100 mL dan dilarutkan dengan etanol p.a 100 mL, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur dan dihomogenkan sehingga didapat larutan standar kuersetin 100 ppm. Panjang gelombang maksimum kuersetin dilakukan dengan *running* larutan kuersetin dengan spektrofotometer UV-Sinar tampak pada rentang panjang gelombang 600 - 200 nm.

##### b. Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar Kuersetin

Pengenceran kuersetin dibuat menjadi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm dari larutan standar kuersetin 100 ppm. Dipipet tiap masing-masing konsentrasi ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan dengan etanol p.a 1 mL, 1 mL  $AlCl_3$  10%, 1 mL natrium asetat 1 M dan ditambahkan aquades hingga tanda batas dan diukur nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan. Kurva standar dibuat dengan konsentrasi pada sumbu x dan nilai absorbansi kuersetin pada sumbu y sehingga didapat persamaan regresi linier ( $y = bx + a$ ). Persamaan regresi tersebut digunakan untuk menghitung kadar flavonoid ekstrak (ppm) dengan mensubstitusi nilai absorbansi ekstrak yang diperoleh sebagai nilai y ke dalam persamaan regresi linier yang diperoleh (Aminah *et al.*, 2017).

### c. Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak

Ditimbang sebanyak 10 mg ekstrak etanol daun sirih merah dari 4 sampel ekstrak, dilarutkan pada gelas kimia dengan etanol p.a sebanyak 10 mL. Dipipet 1 mL  $\text{AlCl}_3$  10%, 1 mL natrium asetat 1 M dan aquades hingga tanda batas, kemudian dikocok dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimal kuersetin yang telah ditentukan. Nilai absorbansi yang didapat kemudian disubstitusikan ke dalam persamaan regresi linier dari kurva standar kuersetin. Dihitung kadar senyawa flavonoid (Kemenkes RI, 2017).

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bandungense, SITH-ITB untuk mengetahui identitas tumbuhan yang digunakan, hasil determinasi menunjukkan bahwa tumbuhan yang digunakan dalam penelitian adalah sirih merah dengan nama latin *Piper ornatum* N.E.Br. dari keluarga *Piperaceae*.

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dan *ultrasound-assisted extraction*. Prinsip kerja dari maserasi yaitu penyarian zat aktif dalam pelarut yang sesuai dan pelarut akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Ekstraksi dengan bantuan ultrasonik dilakukan pada 40 kHz yang terdiri dari 3 waktu ekstraksi yaitu 20, 30, dan 40 menit. Ekstraksi ultrasonik memiliki prinsip akustik kavitasi yang

dapat merusak dinding sel tanaman sehingga dapat membuat senyawa bioaktif lepas ke lingkungan. Penggunaan pelarut etanol 96% bertujuan untuk memisahkan komponen senyawa yang terdapat di dalam simplisia daun sirih merah berdasarkan kepolaran senyawa. Penelitian Sekarsari, dkk. (2019) melaporkan bahwa ekstrak daun jambu biji dengan menggunakan metode UAE pada suhu  $45^\circ\text{C}$  dengan waktu 20 menit memberikan hasil yang tertinggi dalam nilai rendemen, kadar total fenol, total flavonoid, total tanin dan aktivitas antioksidan, sedangkan penelitian Juniarti, dkk. (2017) menunjukkan bahwa kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan yang tinggi didapatkan pada ekstrak daun jati yang diekstraksi selama 30 menit menggunakan metode UAE dengan pelarut ethanol 70% dan ratio bahan : pelarut yaitu 1:5. Sehingga pada penelitian ini digunakan waktu 20, 30 dan 40 menit karena dibandingkan dengan metode maserasi yang menggunakan waktu ekstraksi 24 jam.

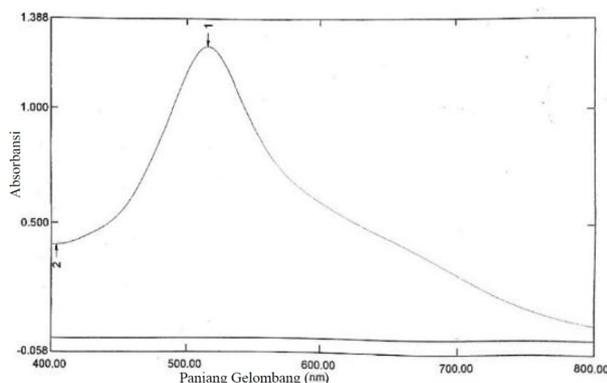
Rendemen ekstrak digunakan untuk mengetahui bobot ekstrak yang didapatkan setelah ekstraksi serta mengetahui jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam sampel tersebut, semakin besar nilai rendemen sampel yang dihasilkan maka semakin banyak senyawa yang terekstraksi dalam sampel pada proses ekstraksi. Hasil rendemen ekstrak dapat dilihat pada [Tabel 1](#).

Tabel 1. Rendemen Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

No.	Jenis Ekstrak	Rendemen (%)
1	Ekstrak Maserasi	14,095
2	Ekstrak UAE 20 menit	14,159
3	Ekstrak UAE 30 menit	14,242
4	Ekstrak UAE 40 menit	15,072

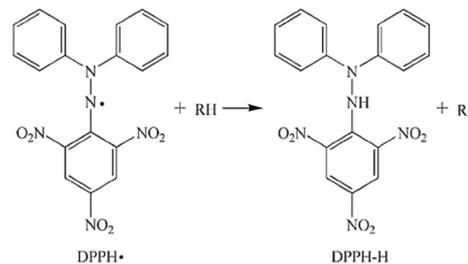
Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*). metode DPPH ini termasuk metode konvensional dan telah lama digunakan karena dalam pengerjaan yang mudah, cepat dan sensitif untuk penentuan aktivitas senyawa antioksidan dari ekstrak tanaman secara spektrofotometer (Bahriul *et al.*, 2014).

Pengukuran aktivitas antioksidan secara spektrofotometri dilakukan pada panjang gelombang 516 nm, yang merupakan panjang gelombang maksimum DPPH. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum sama dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Adrianta (2020), pada pengujian aktivitas antioksidan daun magenta. Panjang gelombang maksimum berfungsi untuk menentukan panjang gelombang suatu senyawa yang akan diukur dapat memberikan serapan yang maksimal. DPPH dapat memberi serapan karena memiliki gugus kromofor dan aoksokrom pada struktur kimianya.



Gambar 1. Penetapan panjang gelombang maksimum DPPH

Metode uji menggunakan DPPH ini didasarkan pada penurunan absorbansi akibat perubahan warna larutan warna DPPH, dimana DPPH akan bereaksi dengan atom hidrogen dari senyawa peredam radikal bebas membentuk DPPH-Hidrazin yang lebih stabil. Reagen DPPH ketika ditambah dengan sampel yang mengandung senyawa antioksidan akan mengalami perubahan warna dari ungu ke kuning, intensitas warna tergantung kemampuan dari antioksidan (Molyneux, 2004).



Gambar 2. Reaksi penghambatan radikal DPPH (Prakash, 2001)

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak daun sirih merah (*Piper ornatum* N.E.Br.) ini digunakan larutan DPPH sebagai kontrol negatif yang digunakan untuk tujuan kalibrasi serta mengetahui besarnya serapan oleh zat bukan analit (Zheng, W.Z. & Wang, S.Y. 2001). Dari hasil pengukuran diperoleh rata-rata absorbansi sebesar 0,884 dan vitamin C digunakan sebagai larutan pembanding yang diketahui memiliki gugus pendonor elektron. Pada pengujian larutan vitamin C dibuat dalam seri 1,2,4 dan 8 ppm dicampurkan dengan DPPH kemudian

diukur nilai absorbansi serta dihitung nilai persen inhibisi dan nilai  $IC_{50}$ . Pada penelitian ini didapat persamaan regresi linier untuk larutan pembanding  $y = 4,2701x + 37,624$  dengan nilai  $R^2 = 0,9977$  setelah disubstitusikan terhadap persamaan tersebut didapat nilai  $IC_{50}$  vitamin C sebesar 2,90 ppm. Dengan hasil  $IC_{50}$  yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada vitamin C sangat kuat.

Pengamatan aktivitas antioksidan pada sampel ekstrak etanol daun sirih merah yang dibagi menjadi 4 sampel yaitu sampel ekstrak dari ekstraksi maserasi serta ekstraksi ultrasonik (UAE) waktu 20, 30, dan 40 menit. Hasil pengukuran penentuan aktivitas antioksidan pada sampel dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

No	Sampel	Nilai $IC_{50}$ (ppm)	Intensitas
1	Vitamin C	2,90	Sangat kuat
2	Ekstrak maserasi 24 jam	36,54	Sangat kuat
3	Ekstrak UAE 20 menit	34,22	Sangat kuat
4	Ekstrak UAE 30 menit	32,00	Sangat kuat
5	Ekstrak UAE 40 menit	30,76	Sangat kuat

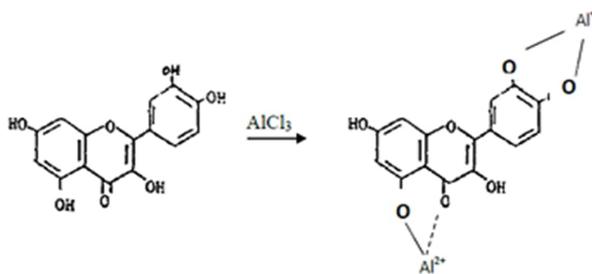
Berdasarkan pengujian aktivitas antioksidan sampel di atas menghasilkan nilai  $IC_{50}$  yang berbeda pada tiap metode ekstraksi. Bila dibandingkan dengan ekstrak hasil metode maserasi, metode ultrasonik dapat meningkatkan aktivitas antioksidannya sehingga seiring bertambahnya waktu ekstraksi ultrasonik nilai dari  $IC_{50}$  akan semakin rendah. Untuk melihat perbedaan efek dari empat perlakuan metode ekstraksi maka digunakan uji statistika nonparametric yaitu uji Kruskal Wallis. Hasil uji Kruskal Wallis diperoleh nilai  $\text{sig} > \alpha$ , yang artinya tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari keempat perlakuan terhadap aktivitas antioksidannya.

Menurut Wang (2006) ultrasonik merupakan metode ekstraksi yang efektif dan efisien, waktu ekstraksi yang cepat, mengurangi konsumsi pelarut serta menghasilkan persentase rendemen yang lebih tinggi. Metode ultrasonik memiliki

kemampuan yang lebih cepat dan lebih sempurna dalam proses ekstraksi dibandingkan dengan metode maserasi dan soxhlet. Efek mekanis yang ditimbulkan dari gelombang ultrasonik dapat meningkatkan kemampuan penetrasi pelarut ke dalam sel sehingga dapat meningkatkan jumlah komponen sel yang berdifusi ke dalam larutan penyari (Brennan, 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Osorio-Tobón (2020) yang membandingkan teknik ekstraksi alternatif, yaitu *microwave-assisted extraction* (MAE), *pressurized liquid extraction* (PLE), *supercritical fluid extraction* (SFE) dan *ultrasonic-assisted extraction* (UAE) terhadap kadar senyawa fenolat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa MAE dan UAE merupakan metode ekstraksi yang lebih singkat dibandingkan PLE dan SFE. MAE menghasilkan kandungan total fenolat tertinggi (227,63 mg GAE/g), diikuti oleh PLE (173,65 mg GAE/g), UAE (92,99 mg GAE/g) dan SFE (37 mg GAE/g).

Berdasarkan pernyataan di atas ekstrak etanol daun sirih merah memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat, dengan penanganan sampel yang benar serta metode dan waktu ekstraksi yang tepat akan menghasilkan aktivitas yang maksimal.

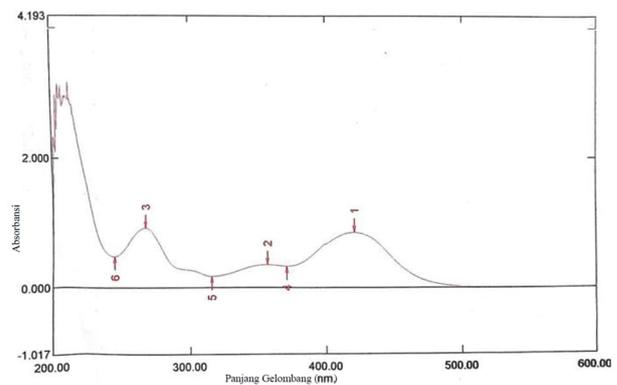
Penetapan kandungan senyawa flavonoid bertujuan untuk menentukan kadar senyawa flavonoid yang terdapat pada ekstrak daun sirih merah (*Piper ornatum* N.E.Br.) secara spektrofotometri dengan pereaksi  $\text{AlCl}_3$ . Kuersetin digunakan sebagai larutan standar untuk menentukan kadar flavonoid karena kuersetin termasuk flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keton pada atom C-4 dan terdapat gugus hidroksi pada atom C-3 dan C-5 yang saling berdekatan, sehingga dapat bereaksi dengan  $\text{AlCl}_3$  membentuk kompleks asam (Azizah *et al.*, 2014).



Gambar 3. Reaksi pembentukan kompleks (Azizah *et al.*, 2014).

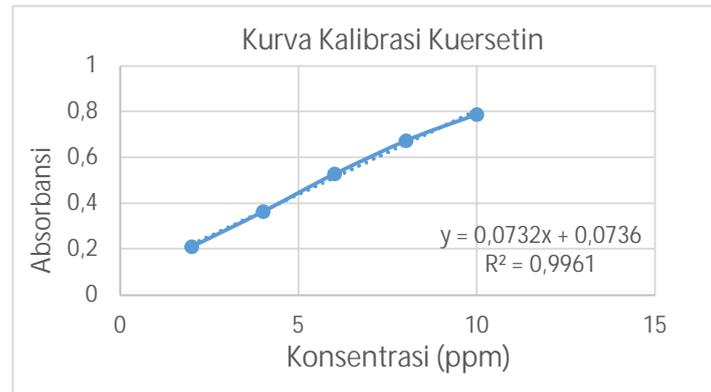
Penetapan kadar flavonoid ditentukan pada panjang gelombang maksimum kuersetin yang menunjukkan bahwa serapan senyawa hasil reaksi yang terbentuk memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 421 nm dan 267 nm. Panjang maksimum digunakan karena

dapat memberikan absorbansi paling maksimum sehingga dapat memberikan nilai penyerapan dengan sensitivitas pengukuran paling tinggi, bentuk kurva serapan yang dihasilkan berbentuk datar, dan jika diulang kesalahan yang dapat terjadi akan kecil. Serapan khas senyawa flavonoid yaitu memiliki dua pita, pada pita I pada rentang 300 – 550 nm yang diduga adanya ikatan C=C terkonjugasi, sedangkan pada pita II pada rentang 210 – 285 nm, dapat diperkirakan adanya ikatan seperti C=C terkonjugasi serta ikatan berupa kromofor tunggal seperti ikatan C=O (Sastrohamidjojo, 1991).



Gambar 4. Penetapan panjang gelombang maksimum Kuersetin

Penetapan kadar dilakukan dengan mengukur absorbansi dari larutan kuersetin yang telah direaksikan pada panjang gelombang 421 nm. Penentuan kurva standar kuersetin menggunakan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm, sehingga didapatkan persamaan regresi linier  $y = 0,0732x + 0,0736$  dan nilai  $R^2 = 0,9961$  dengan  $y$  merupakan nilai absorbansi dan  $x$  merupakan nilai konsentrasi kuersetin. Hasil kurva kalibrasi seperti pada Gambar 5.



Gambar 5. Penetapan kurva kalibrasi Kuersetin

Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa kurva kalibrasi yang dihasilkan linier dengan persamaan regresi didapatkan  $Y = 0,0732x + 0,0736$  dengan  $r=0,9961$ . Kurva yang linier dapat diperoleh jika konsentrasi dengan absorbansi berbanding lurus sehingga konsentrasi meningkat diikuti dengan peningkatan nilai absorbansi (Suharyanto *et al.*, 2021).

Penetapan kadar flavonoid pada ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper ornatum* N.E.Br.) diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimal 421,00 nm yang dinyatakan dalam berat ekuivalen kuersetin (QE) tiap gram ekstrak (mgQE/g ekstrak). Hasil penetapan kadar seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Penetapan Kadar Flavonoid

No	Sampel	Rataan Absorbansi	Kadar Flavonoid (mgQE/g)
1	Ekstrak maserasi 24 jam	0,371	4,07
2	Ekstrak UAE 20 menit	0,382	4,22
3	Ekstrak UAE 30 menit	0,387	4,27
4	Ekstrak UAE 40 menit	0,395	4,32

Hasil menunjukkan rata-rata kadar flavonoid ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper ornatum* N.E.Br.) tertinggi terdapat pada ekstraksi ultrasonik selama 40 menit yang menghasilkan kadar sebesar 4,32 mgQE/gram ekstrak. Kadar flavonoid ekstrak UAE menunjukkan adanya peningkatan kadar seiring pertambahan waktu ekstraksi, namun belum terlihat pada waktu maksimum berapa penambahan waktu tidak berpengaruh terhadap peningkatan kadar flavonoid. Untuk melihat perbedaan efek dari empat perlakuan metode ekstraksi maka digunakan uji statistika Anova dilanjutkan dengan uji post hoc (tukey). Hasil uji

statistika diperoleh nilai  $\text{sig} < \alpha$  untuk semua kelompok perlakuan, yang artinya semua perlakuan memberikan efek yang berbeda terhadap kadar flavonoid.

Berdasarkan hasil penelitian bahwa peningkatan kadar flavonoid ekstrak UAE diduga yang menyebabkan peningkatan aktivitas antioksidan. Meskipun secara uji statistika perbedaan metode ekstraksi memberikan perbedaan signifikan pada kadar flavonoid namun tidak berbeda signifikan terhadap aktivitas antioksidan. Hal ini telah sesuai dengan pernyataan Hardiana *et al.*, (2012) dimana kadar flavonoid berbanding lurus dengan

aktivitas antioksidan dan hasil penelitian Sholikhah, dkk. (2023) senyawa flavonoid golongan flavon merupakan senyawa aktif antioksidan yang berasal dari bunga honje hutan. Sedangkan menurut Lim *et al.*, (2010), senyawa flavonoid merupakan komponen bioaktif yang sensitif sehingga waktu ekstraksi yang terlalu lama juga meningkatkan dekomposisi dan oksidasi senyawa flavonoid karena paparan yang lama terhadap faktor lingkungan seperti suhu, cahaya, dan oksigen sehingga semakin kecil potensi senyawa flavonoid pada bahan yang dapat terekstrak. Oleh karena itu, bahwa penetapan hasil kadar senyawa flavonoid ekstrak daun sirih merah dengan perlakuan ekstraksi maserasi lebih rendah dibanding dengan ekstraksi ultrasonik.

#### 4. KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun sirih merah dengan metode maserasi memberikan aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  36,54 dan kadar flavonoid 4,07 mgQE/g sedangkan ekstrak dengan metode *Ultrasound-assisted extraction* (UAE) selama 20, 30 dan 40 menit memberikan aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  berturut-turut sebesar 34,22; 32,00 dan 30,76 dan kadar flavonoid berturut-turut sebesar 4,22; 4,27 dan 4,32 mgQE/g ekstrak. Ekstrak UAE 20, 30 dan 40 menit menunjukkan aktivitas antioksidan serta kadar flavonoid yang lebih tinggi dari ekstrak maserasi. Namun berdasarkan uji statistika perbedaan metode ekstraksi dapat berpengaruh signifikan terhadap kadar flavonoid, namun tidak berbeda signifikan terhadap aktivitas antioksidan.

#### 5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Program Studi Farmasi Universitas Islam Bandung yang telah memberikan fasilitas serta dukungannya dalam penyusunan penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adrianta, K. A. (2020). Aktivitas Antioksidan Daun Magenta (*Peristrophe Bivalvis* (L.) Merr) Sebagai Salah Satu Kandidat Pengobatan Bahan Berbasis Herbal Serta Bioaktivitasnya Sebagai Analgetik. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 6(1).
- Aminah, A., Tomayahu, N., & Abidin, Z. (2017). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(2), 226–230.
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., & Faramayuda, F. (2014). Penetapan kadar flavonoid metode AICI<sub>3</sub> pada ekstrak metanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2), 33-37.
- Bahriul, P., Rahman, N., & Diah, A. W. M. (2014). Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dengan menggunakan 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil. *Jurnal Akademika Kimia*, 3(3), 143-149.
- Brennan & G. James, (2006). *Food Processing Handbook*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany
- Fuadi A. (2012). Ultrasonik Sebagai Alat Bantu Ekstraksi Oleoresin Jahe. *Jurnal Teknologi*, Vol. 12, No. 1, April 2012: 14-21 14.
- Hardiana, R., & Rudiyansyah, T. A. (2012). Aktivitas antioksidan senyawa golongan fenol dari beberapa jenis tumbuhan famili Malvaceae. *Jurnal*

*Kimia Khatulistiwa, 1(1).*

- Huliselan, Y. M., Runtuwene, M. R. J., & Wewengkang, D. S. (2015). Antioxidant Activity of Ethanol, Ethyl Acetate and n-Hexane Extract from Seswanua Leaves (*Clerodendron squamatum* Vahl.). *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi, 4(3)*, 155–163.
- Juniarti, I.B., A. Santoso., dan A.S. Razak. (2017). Ekstraksi senyawa flavonoid daun jati (*Tectona grandis* L.) dengan metode ultasonik (kajian rasio bahan : pelarut dan lama ekstraksi). *Media Farmasi Indonesia. 12(2)* : 1259 – 1266.
- Kanifah, U. (2015). Karakterisasi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) Menggunakan Metode Ekstraksi Ultrasonik (Kajian Perbandingan Jenis Pelarut Dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis, 3(1)*, 73-79.
- Kementerian Kesehatan RI. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia* Edisi II. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Kojic, A.B., P. Mirela, T. Srecko, K. Stela, M. Ibrahim, B. Mate dan V. Darko. (2011). Effect of extraction conditions on the extractability of phenolic compounds from lyophilised fig fruits (*Ficus carica* L). *Journal Food Nutrition Science 61(3)*: 195-199.
- Lim, H. K., Tan, C. P., Karim, R., Ariffin, A. A., & Bakar, J. (2010). Chemical composition and DSC thermal properties of two species of *Hylocereus cacti* seed oil: *Hylocereus undatus* and *Hylocereus polyrhizus*. *Food Chemistry, 119(4)*, 1326-1331.
- Marjoni, R. (2016). *Dasar-Dasar Fitokimia untuk Diploma III Farmasi*. Jakarta: CV. Trans Info Media.
- Marwati, Nur, S., Khairi, N., Nursamsiar. (2022). Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk) dengan Metode DPPH. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa, 5(2)*:183-191.
- Maslukhah, Y. L., Widyaningsih, T. D., Waziroh, E., Wijayanti, N., & Sriherfyna, F. H. (2016). Faktor pengaruh ekstraksi cincau hitam (*Mesona palustris* bl) skala pilot plant: kajian pustaka [in press Januari 2016]. *Jurnal Pangan dan Agroindustri, 4(1)*.
- Molyneux, P. (2004). The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology. 211–219*.
- Osorio-Tobón, J. F. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*.
- Parfati, N., & Windono, T. (2017). Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Kajian Pustaka Aspek Botani, Kandungan Kimia, dan Aktivitas Farmakologi. *MPI (Media Pharmaceutica Indonesiana), 1(2)*, 106-115.
- Prakash, A., (2001), Antioxidant Activity, *Medallion Laboratories Analytical Progress*, vol. 19, No.2.
- Rutkowska, M., Namiesnik, J. & Konieczka, P. (2017). Ultrasound-assisted extraction. In: Pena-Pereira F, Tobiszewski M (eds) *The application of green solvents in separation processes*. Elsevier, Amsterdam, pp 301–324.
- Sastrohamidjojo. H., (1991). *Spektroskopi*. Yogyakarta: Liberty
- Sekarsari, S., I.W.R. Widarta., A.A.G.N.A Jambe. (2019). Pengaruh suhu dan waktu ekstraksi dengan gelombang ultrasonik terhadap aktivitas

- antioksidan ekstrak daun jambu biji (Psidium guajava L.). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 8(3) : 267 – 277.
- Sholikhah, K.P., Riyanti, S. & Wahyono. (2023). Potensi Antioksidan Alami Rempah Bunga Honje Hutan (Etilingera hemisphaerica (Blume) R. M. Sm.) dan Isolasi Senyawa Aktifnya. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*, 6(2):137-149
- Tonahi, J. M. M., Nuryanti, S., & Suherman, S. (2014). Antioksidan dari daun sirih merah (Piper crocatum). *Jurnal Akademika Kimia*, 3(3), 158-164.
- Voight, R., (1994), *Buku Pengantar Teknologi Farmasi*, 572-574, diterjemahkan oleh Soedani, N., Edisi V, Yogyakarta, Universitas Gadjah Mada Press.
- Zheng, W.Z. and Wang, S.Y. (2001) Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170.



Copyright © 2024 The author(s). You are free to Share — copy and redistribute the material in any medium or format. Adapt — remix, transform, and build upon the material. Under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use. NonCommercial — You may not use the material for commercial purposes. ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. No additional restrictions — You may not apply legal terms or technological measures that legally restrict others from doing anything the license permits.