

Optimasi Komposisi Pelarut Air–Etanol Pada Ekstraksi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dengan Metode *Simplex Lattice Design* Terhadap Aktivitas Antioksidan

*Optimization of Water-Ethanol Solvent Composition of Red Betel Leaf Extraction (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) Using Simplex Lattice Design Method on Antioxidant Activity*

Ria Indah Pratami¹, Sri Mulyaningsih^{2*}, Ichwan Ridwan Rais³

^{1,2,3}Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia
Email: sri.mulyaningsih@pharm.uad.ac.id

Abstrak

Latar Belakang: Radikal bebas menyebabkan stres oksidatif yang berkontribusi terhadap penyakit degeneratif dan penuaan dini. Daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) mengandung senyawa fenolik dan flavonoid dengan potensi antioksidan yang tinggi. **Tujuan:** Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui komposisi pelarut air-etanol yang optimal pada ekstraksi daun sirih merah berdasarkan kadar fenol total dan aktivitas antioksidan. **Metode:** Ekstraksi daun sirih merah dikerjakan dengan ultrasonikasi menggunakan beberapa rasio pelarut air dan etanol 96%, kemudian dioptimalkan menggunakan *Simplex Lattice Design*. Aktivitas antioksidan dievaluasi menggunakan metode 2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6 sulfonic acid (ABTS) yang diukur menggunakan *microplate reader*. Penetapan kadar fenol total menggunakan metode spektrofotometri. **Hasil:** Daun sirih merah yang diekstraksi dengan pelarut air-etanol (0:100) menunjukkan kadar fenol total tertinggi diperoleh sebesar $152,23 \pm 0,2$ mg GAE/g dengan IC_{50} sebesar 74,18 ppm yang termasuk kategori kuat. Analisis ANOVA menunjukkan model signifikan ($p < 0,05$) dengan $R^2 > 0,90$, menegaskan adanya korelasi kuat antara kandungan fenolik dan aktivitas antioksidan. Optimasi SLD menghasilkan nilai *desirability* mendekati 1,0, menunjukkan bahwa pelarut etanol merupakan sebagai pelarut paling optimal. **Kesimpulan:** Daun sirih merah berpotensi kuat sebagai sumber antioksidan alami dengan etanol sebagai pelarut optimal untuk ekstraksi senyawa bioaktif.

Kata kunci: ABTS; Radikal bebas; Sirih Merah; TPC; *Ultrasound-assisted extraction*.

Abstract

Background: Free radicals cause oxidative stress that contributes to degenerative diseases and premature aging. Red betel leaves (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) contain phenolic and flavonoid compounds with high antioxidant potential. **Objective:** This study aimed to determine the optimal water-ethanol solvent composition for red betel leaf extraction based on total phenol content and antioxidant activity. **Method:** Red betel leaf extraction was carried out by ultrasonication using several ratios of water and 96% ethanol solvents, then optimized using *Simplex Lattice Design*. Antioxidant activity was evaluated using the 2,2-azinobis(3-ethyl-benzothiazoline-6 sulfonic acid (ABTS) method, which was measured using a *microplate reader*. Total phenol content was determined using a spectrophotometric method. **Results:** Red betel leaves extracted with water-ethanol solvent (0:100) showed the highest total phenol content of 152.23 ± 0.2 mg GAE/g with an IC_{50} of 74.18 ppm, which is categorized as strong. ANOVA analysis showed a significant model ($p < 0.05$) with $R^2 > 0.90$, confirming a strong correlation between phenolic content and antioxidant activity. SLD optimization produced a *desirability* value close to 1.0, indicating that ethanol is the most optimal solvent. **Conclusion:** Red betel leaves have strong potential as a source of natural antioxidants with ethanol as the optimal solvent for the extraction of bioactive compounds.

Keywords: ABTS; Free radicals; Red Betel; TPC; *Ultrasound-assisted extraction*

*Corresponding author: Sri Mulyaningsih, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia

E-mail : sri.mulyaningsih@pharm.uad.ac.id

Doi : 10.35451/5d1c7339

Received : September 27, 2024. Accepted: October 19, 2025. Published: October 31, 2025

Copyright: © 2025 Sri Mulyaningsih. Creative Commons License This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

1. PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan molekul tidak stabil yang dapat menyebabkan stres oksidatif dalam tubuh sehingga kondisi ini berhubungan erat dengan timbulnya penyakit degeneratif seperti kanker, diabetes, aterosklerosis, hingga penuaan dini [1]. Ketidakstabilan elektron yang tidak berpasangan mendorong radikal bebas untuk berinteraksi dengan molekul biologis seperti lipid, protein, dan DNA, sehingga memicu stres oksidatif yang berkontribusi terhadap perkembangan kanker, penyakit kardiovaskular, serta gangguan neurodegeneratif [2]. Meskipun penuaan merupakan proses biologis alami yang dialami manusia, terjadinya dapat dipengaruhi oleh faktor internal maupun eksternal [3]. Salah satu faktor utama yang mempercepat penuaan adalah *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang terbentuk baik dari dalam tubuh maupun dari luar, seperti paparan sinar ultraviolet (UV) [4]. ROS berkontribusi besar dalam menimbulkan stres oksidatif pada jaringan ikat kulit [5]. Dalam kondisi stres oksidatif, ROS dapat meningkatkan ekspresi dan aktivitas enzim elastase yaitu enzim yang berperan dalam hidrolisis komponen protein pada jaringan ikat termasuk kolagen dan elastin [6]. Aktivitas elastase yang berlebihan mengakibatkan degradasi elastin sehingga struktur kulit melemah dan memicu terjadinya penuaan dini. Adanya pengaruh signifikan *Reactive Oxygen Species* (ROS) terhadap proses penuaan yang mendorong pemanfaatan agen antioksidan eksternal sebagai upaya pencegahan [7].

Daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) telah digunakan sejak lama sebagai bahan pengobatan tradisional. Tanaman herbal ini kaya akan komponen bioaktif, terutama senyawa fenolik yang berperan penting bagi kesehatan. [8]. Senyawa ini berperan penting dalam memberikan aktivitas antioksidan dengan mekanisme berbeda, seperti menetralkan radikal bebas, mengkelat ion logam transisi, dan menghambat pembentukan ROS baru [9]. Namun meskipun potensinya besar penelitian terkait komposisi air-etanol yang paling optimal belum ditemukan [10]. Senyawa fenolik cenderung bereaksi dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga mampu memberikan efek antioksidan. Interaksi ini membuat sifat radikal dari ROS hilang dan tidak lagi menimbulkan bahaya bagi sel manusia [11], [12]. Meskipun demikian, pemanfaatannya dalam bidang kesehatan, khususnya terkait aktivitas antioksidan masih terbatas dan belum banyak diteliti [13]. Untuk mengungkapkan aktivitas antioksidannya, kandungan bioaktif daun sirih merah dapat dianalisis melalui berbagai metode seperti ABTS dan pengujian kandungan fenolik total yang masing-masing menggambarkan mekanisme kerja antioksidan yang berbeda. Metode ABTS yang memanfaatkan senyawa 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-asam sulfonat) sebagai radikal bebas untuk menilai efektivitas antioksidan.

Keberhasilan ekstraksi senyawa bioaktif sangat dipengaruhi oleh jenis dan komposisi pelarut yang digunakan. Air efektif melarutkan senyawa polar, sedangkan etanol lebih mampu melarutkan senyawa semi polar seperti flavonoid dan tanin [14]. Kombinasi keduanya pada komposisi tertentu berpotensi menghasilkan ekstrak dengan kandungan senyawa bioaktif lebih tinggi dan aktivitas antioksidan yang lebih kuat. Oleh karena itu, diperlukan pendekatan sistematis untuk menentukan rasio pelarut yang paling optimal [15]. Dengan menggunakan SLD variasi kombinasi air dan etanol dapat diuji secara sistematis untuk pengaruhnya terhadap kandungan fenolik, serta aktivitas antioksidan ekstrak sirih merah [16]. Analisis hasil menggunakan perangkat lunak [17]. Design Expert memungkinkan peneliti memperoleh model matematis dan grafik respon permukaan, sehingga dapat ditentukan rasio pelarut optimal yang menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi.

2. METODE

Bahan

Bahan yang digunakan: daun sirih merah, ABTS (Sigma-Aldrich), kalium persulfat (Merck), trolox (Sigma), metanol p.a (Merck), etanol p.a (Merck), reagen Folin-Ciocalteu (p.a. E. Merck), asam galat (p.a. SigmaChem.Co.) dan aquadest.

Alat

Alat yang digunakan antara lain, *Ultrasonic bath* (Tagotrix Instrumentation Technologies), *vacuum rotary evaporator* (Heidolph), microplate 96-wells (Biologix), Varioskan *multimode microplate reader* (Thermo Fisher Scientific), Spektrofotometer (Shimadzu), neraca analitik (Mettler Toledo), *waterbath* (Memmert), oven (Memmert), mikropipet (Soccorex), dan alat-alat gelas (Pyrex).

Prosedur

Determinasi Dan Pengumpulan Bahan Tumbuhan

Determinasi tanaman dikerjakan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu Malang yang berpedoman pada buku *Flora of Java*. Sampel daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) diperoleh dari daerah Sewon, Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta.

Pembuatan Simplisia dan Ekstraksi

Daun sirih merah mula-mula dicuci dengan air mengalir, kemudian disortasi basah, ditiriskan, dan dikeringkan pada suhu 50°C hingga kering. Simplisia kering kemudian diblender dan diayak menggunakan ayakan berukuran 40 mesh. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan variasi komposisi campuran pelarut air dan etanol 96% yang ditentukan melalui metode *Simplex Lattice Design* (SLD). Komposisi pelarut pada masing-masing run adalah sebagai berikut: Run 1 dan Run 2 (50 bagian air : 50 bagian etanol), Run 3 (75 bagian air : 25 bagian etanol), Run 4 dan Run 5 (100 bagian etanol), Run 6 (25 bagian air : 75 bagian etanol), serta Run 7 dan Run 8 (100 bagian air). Ekstraksi dilakukan menggunakan metode ultrasonikasi pada suhu 50°C dengan perbandingan bahan dan pelarut sebanyak 25 g serbuk simplisia dalam 250 mL pelarut (1:10) selama 1 jam. Hasil ekstraksi disaring, kemudian filtrat diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang dihasilkan ditimbang, dihitung rendemennya, lalu disimpan untuk analisis lebih lanjut.

Penetapan Total Phenolic Content (TPC)

Pembuatan larutan stok ekstrak daun sirih dilakukan dengan membuat konsentrasi 400 µg/mL. Kemudian 1 mL larutan ditambah folin-ciocalteu (5 mL) yang selanjutnya diinkubasi selama 8 menit. Kemudian dilakukan penambahan 4 mL NaOH 1% dan didiamkan 1 jam. Setelah itu, dilakukan pembacaan pada panjang gelombang maksimum 734 nm. Perlakuan yang sama diulangi 3 kali. Kurva baku asam galat dibuat dengan konsentrasi 20, 40, 60, 100, dan 120 µg/mL yang kemudian hasilnya dinyatakan sebagai mg GAE/g.

Aktivitas Antioksidan dengan Metode ABTS

Analisis antioksidan dengan reagen ABTS diawali dengan pembuatan reagen ABTS 7 mM dengan cara ditimbang serbuk ABTS sejumlah 18 mg lalu dilarutkan hingga 5 mL dengan pelarut metanol, kemudian ditimbang serbuk kalium persulfat 2,24 mM sebanyak 3,3 mg dilarutkan hingga 5 mL dengan akuades. Kedua larutan tersebut dicampur, kemudian inkubasi selama 12-16 jam sebelum digunakan. Larutan ABTS yang telah diinkubasi diencerkan dengan metanol. Uji dilakukan terhadap seri konsentrasi trolox yaitu 5,10,15,20 dan 25 ppm dan seri konsentrasi sirih merah 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm. Dilakukan pencampuran sampel sebanyak 50 µL dari masing-masing konsentrasi dengan 250 µL reagen ABTS. Campuran diinkubasi selama operating time 22 menit kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 734 nm. Data aktivitas antioksidan dengan metode ABTS dinyatakan dalam IC₅₀. Untuk mendapatkan nilai *inhibition concentration* 50 (IC₅₀) terlebih dahulu dihitung persen inhibisi dari masing masing konsentrasi sampel dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ ditentukan dengan persamaan regresi linier antara konsentrasi terhadap % inhibisi. Nilai IC₅₀ dihitung untuk menentukan berapa konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk memiliki 50% kapasitas penghambatan [18].

3. HASIL

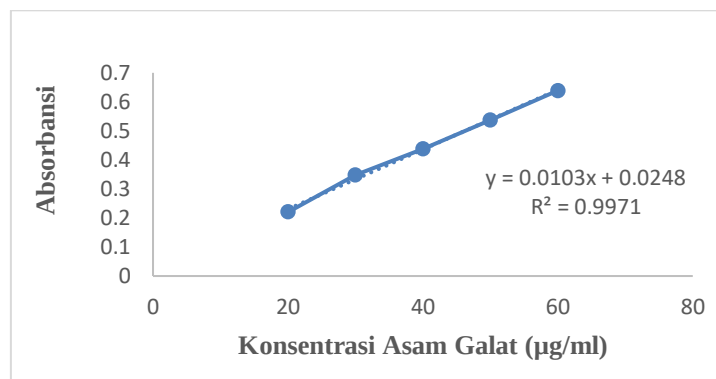
Hasil determinasi sirih merah ditunjukkan surat keterangan yaitu : 000.9.3/3434/102.2024 yang menunjukkan tanaman yang digunakan pada penelitian ini telah benar merupakan daun sirih merah. Hasil ekstraksi menunjukkan komposisi pelarut mempengaruhi hasil rendemen yang dihasilkan (Tabel 1). Pelarut air-etanol (0:100) menghasilkan rendemen ekstrak tertinggi (15%), sedangkan rendemen terendah (9%) diperoleh dengan air-etanol (100:0). Meningkatnya komposisi etanol pada pelarut kombinasi air-etanol meningkatkan rendemen ekstrak yang diperoleh.

Tabel 1. Pengaruh Komposisi Pelarut Air-Etanol Terhadap Hasil Rendemen Ekstrak Daun Sirih Merah

Komposisi	Pelarut	Komposisi	Rata-rata±SD (%)
Run 1	125 ml air + 125 ml etanol	50:50	12,56±0,1
Run 2	125 ml air + 125 ml etanol	50:50	12,30±0,2
Run 3	187,5 ml air + 62,5 ml etanol	75:25	10,07±1,4
Run 4	250 ml etanol	0:100	15,24±0,4
Run 5	250 ml etanol	0:100	15,26±0,7
Run 6	62,5 ml air + 187,5 ml etanol	25:75	11,83±0,1
Run 7	250 ml air	100:0	8,74±0,3
Run 8	250 ml air	100:0	8,76±0,1

Uji Kadar Fenol Total (TPC)

Dilakukan pembuatan kurva baku untuk memperoleh persamaan regresi linier yang digunakan dalam menghitung kadar fenolik pada sampel. Kurva baku asam galat menghasilkan persamaan $y = 0,0103x + 0,0248$ dengan nilai koefisien korelasi $R^2 = 0,9971$, yang menunjukkan hubungan linier antara konsentrasi asam galat dan nilai serapan. Hal ini menegaskan bahwa metode Folin-Ciocalteu yang digunakan memiliki akurasi dan presisi yang handal untuk menentukan kadar fenolik total. Hasil grafik kurva baru dilihat pada gambar 1.

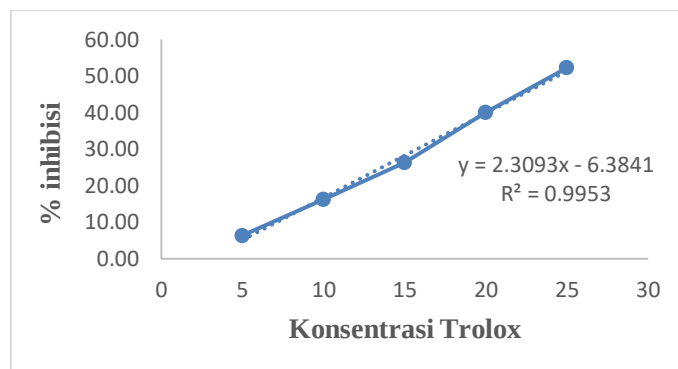
**Gambar 1.** Kurva Baku Asam Galat**Tabel 2.** Pengaruh Komposisi Pelarut Air-Etanol terhadap Kadar Fenol Total Ekstrak Daun Sirih Merah

Komposisi	Rata-rata Kadar Fenolik (mg GAE/gram) ± SD
Run 1	120,92± 0,2
Run 2	120,53±0,4
Run 3	109,60±0,6
Run 4	141,72±0,5
Run 5	152,23±0,2
Run 6	127,96±0,3
Run 7	113,68±1,6
Run 8	111,38±1,2

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar fenol total dipengaruhi oleh komposisi pelarut. Run 5 dengan air-etanol (0:100) menghasilkan kadar fenol tertinggi (152,23±0,2 mg GAE/g), sedangkan Run 8 dengan air-etanol (100:0) menghasilkan kadar fenol total terendah (111,38±1,2 mg GAE/g). Semakin meningkat komposisi etanol pada pelarut air-etanol, semakin meningkat kadar fenol yang diperoleh. Penelitian oleh [19] juga mendukung hasil ini, dengan kadar fenol menggunakan pelarut etanol 50% sebanyak 143 mg GAE/g, sedangkan dengan etanol 70% sebesar 157,61 mg GAE/g sejalan dengan penelitian ini.

Pengukuran Antioksidan ABTS Daun Sirih Merah

Intensitas perubahan warna diukur melalui penurunan nilai serapan semakin tinggi konsentrasi sampel, semakin besar kemampuan menangkap radikal bebas yang ditunjukkan dengan semakin rendahnya serapan ABTS. Analisis dilakukan menggunakan 96 well microplate reader yang dipilih karena mampu menganalisis banyak sampel secara keseluruhan membutuhkan waktu lebih singkat dan menggunakan volume sampel yang lebih sedikit. Data serapan kemudian diubah menjadi persen penangkapan radikal bebas dan nilai IC_{50} dihitung untuk menentukan efektivitas antioksidan. Pembacaan serapan dilakukan secara kolorimetri dengan microplate reader pada panjang gelombang 734 nm dengan operating time 22 menit. Pada Gambar 2 dilakukan pembuatan kurva baku untuk memperoleh persamaan regresi linier. Dari data kurva baku diperoleh persamaan $y = 2.3093x - 6.3841$ dengan nilai $R^2 = 0,9953$, yang menunjukkan hubungan linier antara kadar trolox dan nilai serapan.



Gambar 2. Grafik Kurva Baku Standar Trolox

Tabel 3. Rata-rata Nilai IC_{50} Ekstrak Daun Sirih Merah dan Pembanding Trolox Dengan Metode ABTS

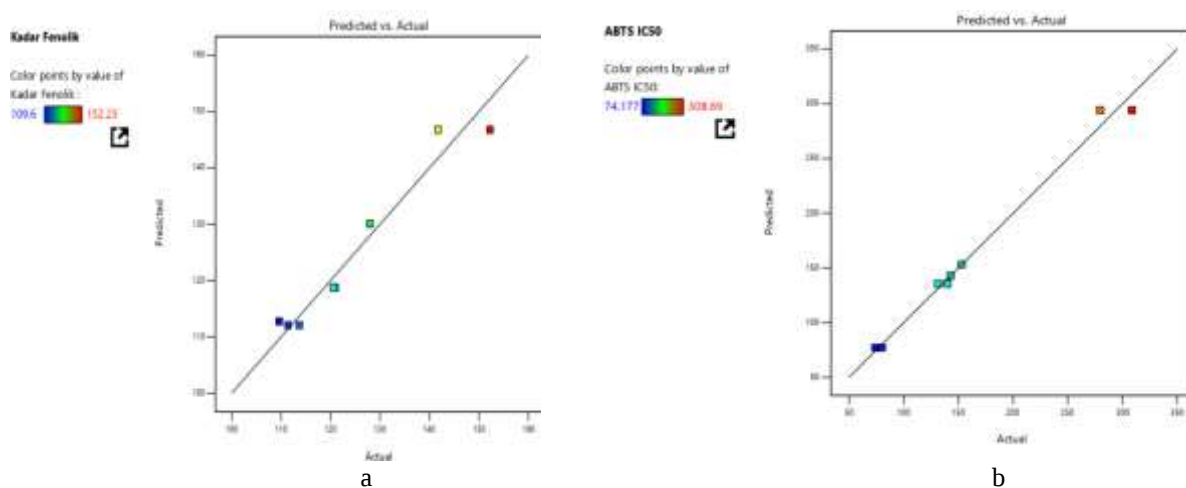
Sampel	Rata-rata nilai IC_{50} (ppm) $\pm$ SD
Trolox	24,42 $\pm$ 1.0
Run 1	139,966 $\pm$ 0.3
Run 2	131,363 $\pm$ 0.9
Run 3	153,089 $\pm$ 0.9
Run 4	80,16 $\pm$ 0.3
Run 5	74,177 $\pm$ 0.3
Run 6	142,839 $\pm$ 0.3
Run 7	279,676 $\pm$ 1.0
Run 8	308,690 $\pm$ 0.9

Aktivitas antioksidan dengan metode ABTS menunjukkan bahwa nilai IC_{50} ekstrak daun sirih merah dengan variasi komposisi pelarut air-etanol berkisar 74,18–308,69 ppm. Hasil uji sampel dan pembanding trolox dilihat Pada Tabel 3. Jika dibandingkan dengan Trolox sebagai positif kontrol ($IC_{50} = 24,42$ ppm), seluruh ekstrak memiliki aktivitas lebih rendah. Namun, run 4 (80,16 ppm) dan run 5 (74,18 ppm) masih termasuk kategori antioksidan kuat ($IC_{50} < 100$ ppm), sedangkan ekstrak run 7 (279,676 ppm) dan run 8 (308,690 ppm) dengan ($IC_{50} > 250$ ppm) termasuk sedang. Penelitian sebelumnya daun sirih merah dengan metode ABTS menghasilkan nilai IC_{50} daun sirih merah yang lebih kecil yaitu sebesar 8,43 μ g/mL [20].

Hasil Optimasi SLD

Hasil optimasi komposisi pelarut air-etanol terhadap kadar fenolik total dan efek antioksidan ditentukan dengan metode SLD menggunakan aplikasi Design Expert 13. Variabel bebas berupa komposisi/rasio pelarut (air dan etanol), sedangkan variabel terikat adalah kadar fenolik total (mg GAE/g) dan efek antioksidan yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Gabungan grafik model, ANOVA, dan *desirability* menunjukkan bahwa fenolik total dan ABTS saling berhubungan erat dalam menentukan aktivitas antioksidan ekstrak daun sirih merah. Grafik ABTS

memperlihatkan penurunan nilai IC_{50} pada komposisi pelarut seimbang, menandakan peningkatan aktivitas antiradikal. Grafik fenolik total juga menampilkan nilai tertinggi pada kondisi yang sama menguatkan bahwa keberhasilan ekstraksi fenolik sejalan dengan meningkatnya aktivitas antioksidan. Analisis ANOVA menunjukkan semua model signifikan ($p < 0,05$) dengan nilai F tinggi dan $R^2 > 0,90$. Kadar fenol total memiliki $R^2 > 0,95$, yang menegaskan konsistensi respon terhadap variasi pelarut. Nilai *desirability* mendekati 1 (0,90–0,95) menunjukkan bahwa titik optimasi telah tercapai dengan kondisi terbaik menghasilkan kadar fenolik >75 mg GAE/g dan IC_{50} sekitar 80–100 ppm (kategori antioksidan kuat). Temuan ini menegaskan bahwa kandungan fenolik merupakan faktor dominan yang menentukan aktivitas antioksidan ekstrak daun sirih merah, sebagaimana diperkuat oleh hasil uji ABTS.



Gambar 3. a. Grafik Kadar Fenol Total Hasil SLD; b. Grafik Antioksidan ABTS Hasil SLD

Nilai *desirability* dalam optimasi dengan metode SLD merupakan indikator yang menunjukkan seberapa baik suatu rumus memenuhi kriteria yang ditetapkan peneliti. Skala yang diinginkan berkisar antara 0 hingga 1, dimana nilai 0 menandakan formula tidak sesuai dengan tujuan optimasi, sedangkan nilai 1 menunjukkan formula sangat sesuai atau optimal. Pada penelitian ekstraksi daun sirih merah, nilai keinginan yang diperoleh mendekati 1,0 yang berarti komposisi pelarut etanol murni memberikan hasil paling optimal dengan kadar fenolik tinggi serta aktivitas antioksidan yang kuat. Dengan demikian, nilai *desirability* ini menegaskan bahwa etanol merupakan pelarut terbaik untuk mengekstraksi senyawa bioaktif daun sirih merah sehingga menghasilkan aktivitas antioksidan secara maksimal. Berdasarkan titik area optimum, diperoleh perbandingan komposisi pelarut optimum terhadap total kandungan fenolik, dan aktivitas antioksidan seperti pada Tabel 5.

Tabel 5. Komposisi Perbandingan Pelarut Optimum dari SLD

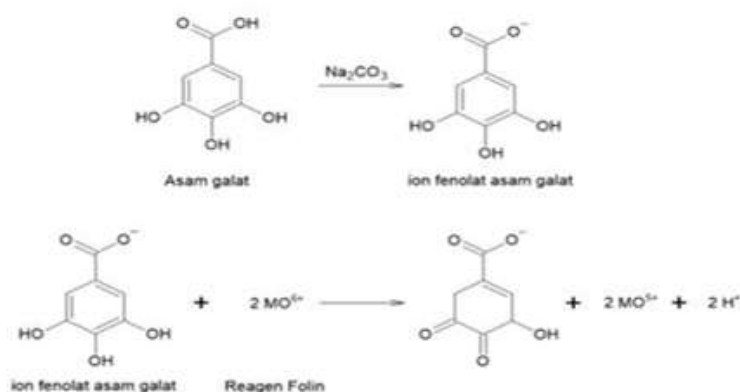
Air	Etanol	Kadar fenol total	IC_{50} ABTS	<i>Desirability</i>	Keterangan
0	1	146,772	77,153100%	1,000	Terpilih

4. PEMBAHASAN

Uji kandungan fenol total dilakukan dengan metode *Folin Ciocalteu* yang prinsipnya berdasarkan reaksi reduksi gugus hidroksi fenol terhadap reagen *Folin-Ciocalteu* dengan standar asam galat. Senyawa fenolik termasuk fenol sederhana mampu mereduksi campuran *fosfotungstat-fosfomolibdat* dalam reagen tersebut, meskipun semuanya tidak berfungsi sebagai penangkap radikal efektif [21]. Pada kondisi basa fenol mengalami disosiasi proton menjadi ion fenolat yang kemudian bereaksi dengan reagen, menghasilkan warna kuning yang berubah menjadi biru setelah penambahan natrium karbonat. Intensitas warna biru yang semakin gelap menunjukkan daya serap yang lebih tinggi dan berbanding lurus dengan kadar fenolik dalam sampel [22]. Senyawa fenolik memiliki peran penting dalam aktivitas antioksidan. Umumnya, semakin tinggi kandungan fenol semakin kuat pula kemampuan antioksidannya. Hal ini terkait dengan keberadaan gugus hidroksil ($-OH$) pada struktur fenolik [23]. Gugus

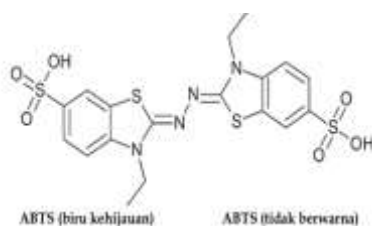
hidroksil tersebut mampu berinteraksi dengan radikal bebas melalui mekanisme pelepasan atom hidrogen sehingga menghentikan reaksi oksidasi berati. Dengan cara ini senyawa fenolik dapat melindungi sel dari kerusakan akibat paparan radikal bebas [24].

Pada tahap reaksi, gugus hidroksil fenolik dalam asam galat berperan sebagai agen pereduksi yang mereduksi heteropoliasam (fosfomolibdat-fosfotungstat) dalam pereaksi *Folin-Ciocalteu* [25]. Reduksi ini menghasilkan senyawa kompleks molibdenum-tungsten berwarna biru. Intensitas warna biru tersebut berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa fenolik dalam sampel, sehingga dapat dianalisis secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Selain itu, penambahan NaOH menciptakan kondisi basa yang memungkinkan proton dari gugus hidroksil fenolik terdisosiasi menjadi ion fenolat. Hal ini meningkatkan kemampuan senyawa fenolik untuk berinteraksi dengan pereaksi *Folin-Ciocalteu* sehingga memperjelas reaksi reduksi [26]. Mekanisme reaksi antara asam galat dan pereaksi *Folin-Ciocalteu* dijelaskan pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi asam galat dengan reagen Folin-Ciocalteu [27].

Metode uji aktivitas antioksidan yang umum digunakan salah satunya adalah metode ABTS. Pada metode ini, senyawa antioksidan dapat langsung berinteraksi dengan larutan radikal bebas 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) yang memiliki sensitivitas tinggi dalam mendeteksi aktivitas pengurangan radikal bebas [28]. Keunggulan metode ABTS dibandingkan metode lainnya adalah prosedurnya yang sederhana, cepat, efektif, serta mudah direplikasi, sehingga sering dijadikan pilihan dalam penelitian aktivitas antioksidan [29].



Gambar 6. Reduksi ABTS oleh Senyawa Penangkap Radikal Bebas [29].

Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi komposisi pelarut berpengaruh signifikan terhadap rendemen, kadar fenolik total, dan aktivitas antioksidan ekstrak daun sirih merah. Pelarut etanol etanol tanpa kombinasi air memberikan hasil terbaik dengan kadar fenolik tertinggi ($152,23 \pm 0,2$ mg GAE/g) dan aktivitas antioksidan kuat (IC_{50} 74,18 ppm, metode ABTS), sedangkan pelarut air air tanpa kombinasi etanol menghasilkan nilai terendah. Hal ini sesuai dengan sifat senyawa fenolik dan flavonoid yang lebih larut dalam etanol dibandingkan air. Kadar fenolik yang tinggi berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan karena gugus hidroksil fenolik mampu mendonorkan atom hidrogen untuk menetralkan radikal bebas. Analisis menggunakan SLD dan uji ANOVA menunjukkan model yang signifikan ($p < 0,05$) dengan $R^2 > 0,90$, mengkonfirmasi adanya korelasi kuat antara

kadar fenolik dan aktivitas antioksidan ABTS. Nilai *desirability* 1,0 menyatakan bahwa etanol merupakan pelarut paling optimal untuk mengekstraksi senyawa bioaktif. Dengan demikian, daun sirih merah berpotensi besar sebagai sumber antioksidan alami yang mendukung aplikasi kesehatan dan farmasi, terutama dalam pencegahan penyakit degeneratif terkait stres oksidatif [30].

5. KESIMPULAN

Ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terbukti mengandung senyawa fenolik dengan aktivitas antioksidan yang signifikan. Pelarut etanol tanpa kombinasi pelarut air menghasilkan kadar fenol total tertinggi ($152,23 \pm 0,2$ mg GAE/g) serta aktivitas antioksidan kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 74,18 ppm. Optimasi menggunakan SLD menghasilkan nilai *desirability* mendekati 1,0, sehingga etanol ditetapkan sebagai pelarut optimal. Dengan demikian, daun sirih merah berpotensi besar dikembangkan sebagai sumber antioksidan alami yang mendukung aplikasi di bidang kesehatan maupun farmasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Direktorat Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat (DPPM), Direktorat Jendral Riset dan Pengembangan Kementerian Pendidikan Tinggi, Sains dan Teknologi (No: 126/c3/DT.05.00/PL/2025) dan Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Ahmad Dahlan (No: 109/PTM/LPPM.UAD/VI/2025).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] D. E. Jewell, L. A. Motsinger, and I. Paetau-Robinson, "Effect of dietary antioxidants on free radical damage in dogs and cats," *J Anim Sci*, vol. 102, Jan. 2024, doi: 10.1093/jas/skae153.
- [2] P. Chaudhary *et al.*, "Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases," 2023, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fchem.2023.1158198.
- [3] F. Ebrahimirad *et al.*, "Antioxidant strategies against cellular senescence: unveiling the power of synthetic versus natural antioxidants in a systematic review," 2025, *Frontiers Media SA.* doi: 10.3389/fragi.2025.1543360.
- [4] U. Chae, J.-W. Park, S.-R. Lee, H. J. Lee, H.-S. Lee, and D.-S. Lee, "Reactive oxygen species-mediated senescence is accelerated by inhibiting Cdk2 in Idh2-deficient conditions," *Aging*, vol. 11, no. 17, pp. 7242–7256, Sep. 2019, doi: 10.18632/aging.102259.
- [5] L. Deng *et al.*, "The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2021, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1155/2021/8852759.
- [6] C. Jirachayamaethasakul *et al.*, "In vitro screening of elastase, collagenase, hyaluronidase, and tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of 22 halophyte plant extracts for novel cosmeceuticals," *Fish Aquatic Sci*, vol. 23, no. 1, Mar. 2020, doi: 10.1186/s41240-020-00149-8.
- [7] H. Wahyudi, Adlim, and M. Nasir, "Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Srikaya (*Annona Squamosa* L.) Muda dan Matang dengan Metode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)," *Al-Kimia*, vol. 10, no. 1, Jun. 2022, doi: 10.24252/al-kimia.v10i1.27391.
- [8] S. G. Tumilaar, A. Hardianto, H. Dohi, and D. Kurnia, "A Comprehensive Review of Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants: Overview, Clinical Applications, Global Perspectives, Future Directions, and Mechanisms of Antioxidant Activity of Flavonoid Compounds," *J Chem*, vol. 2024, pp. 1–21, May 2024, doi: 10.1155/2024/5594386.
- [9] R. Oktavia, R. Saputri, P. S. Studi, and F. Kesehatan, "Aktivitas Antioksidan Dan Penetapan Kadar Flavonoid Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav) Dengan Variasi Ukuran Partikel Serbuk Simplisia," *Journal of Pharmaceutical Care and Sciences*, vol. 4, p. 25, 2023, doi: 10.33859/jpcs.
- [10] S. A. Prayitno, J. K. Kusnadi, and E. S. Murtini, "Karakteristik (Total Flavonoid, Total Fenol, Aktivitas Antioksidan) Ekstrak Serbuk Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)," *FOODSCITECH*, vol. 1, no. 2, p. 26, Dec. 2018, doi: 10.25139/fst.v1i2.1355.
- [11] D. A. Maya-Cano, S. Arango-Varela, and G. A. Santa-Gonzalez, "Phenolic compounds of blueberries (*Vaccinium* spp) as a protective strategy against skin cell damage induced by ROS: A review of antioxidant potential and antiproliferative capacity," *Heliyon*, vol. 7, no. 2, p. e06297, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06297.
- [12] B. Aguiar, H. Carmo, J. Garrido, J. M. Sousa Lobo, and I. F. Almeida, "In Vitro Evaluation of the Photoreactivity and Phototoxicity of Natural Polyphenol Antioxidants," *Molecules*, vol. 27, no. 1, p. 189, Dec. 2021, doi: 10.3390/molecules27010189.
- [13] M. A. Johari and H. Y. Khong, "Total Phenolic Content and Antioxidant and Antibacterial Activities of *Pereskia bleo*," *Adv Pharmacol Sci*, vol. 2019, pp. 1–4, Jan. 2019, doi: 10.1155/2019/7428593.
- [14] I. Susana, A. Ridhay, and S. Bahri, "Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Batang Kecombrang (*Etlingera*

- Elatior*) Berdasarkan Tingkat Kepolaran Pelarut,” Kovalen: Jurnal Riset Kimia, vol. 4, no. 1, pp. 16–23, May 2018, doi: 10.22487/kovalen.2018.v4.i1.10178.
- [15] W. Hajrin, W. A. Subaidah, Y. Julianoni, and D. G. Wirasisya, “Application of Simplex Lattice Design Method on The Optimisation of Deodorant Roll-on Formula of Ashitaba (*Angelica keiskei*),” *Jurnal Biologi Tropis*, vol. 21, no. 2, pp. 501–509, Jul. 2021, doi: 10.29303/jbt.v21i2.2717.
- [16] N. U. M. Br. Turnip, Ratih Anggraeni, Y. R. Sihombing, and Suci Wulandari, “Test to Determine The Quercetin Content of Tenggiang (*Polystichum setiferum*) Using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method and Its Antifungal Activity Against *Pityrosporum ovale*,” *JURNAL FARMASIMED (JFM)*, vol. 7, no. 2, pp. 135–142, Apr. 2025, doi: 10.35451/jfm.v7i2.2361.
- [17] I. K. Kartika, I. Fataya, M. Yunus, and N. D. Yuliana, “Optimasi Proses Ekstraksi Minyak Dan Resin Nyampung Dengan Pelarut Binermenggunakan Response Surface Method,” *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, pp. 21–31, 2022, doi: 10.24961/j.tek.ind.pert.2022.32.1.21.
- [18] Ika Julianti Tambunan and Siti Muliani, “Formulation and Antioxidant Activity Test Of Body Lotion Preparation of Ethanol Extract of Sky Mustard Leaves (*Cyanthillium cinereum* (L) H.Rob) As A Moisturizer,” *JURNAL FARMASIMED (JFM)*, vol. 7, no. 2, pp. 187–194, Apr. 2025, doi: 10.35451/jfm.v7i2.2441.
- [19] S. A. Prayitno, J. Kusnadi, and E. S. Murtini, “Karakteristik (Total Flavonoid, Total Fenol, Aktivitas Antioksidan) Ekstrak Serbuk Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.),” *Piper crocatum* Ruiz & Pav, 2018.
- [20] I. N. E. Lister *et al.*, “Antioxidant properties of red betel (*Piper crocatum*) leaf extract and its compounds,” *Journal of Natural Remedies*, vol. 19, no. 4, pp. 198–205, Oct. 2019, doi: 10.18311/jnr/2019/23633.
- [21] K. Kurniawan, A. T. Pertiwi, and I. T. Lestari, “Analisa Absorbansi Kadar Flavonoid Total Ekstrak Maserasi Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.),” *Pharmaceutical Journal of Islamic Pharmacy*, vol. 5, no. 1, p. 80, Mar. 2021, doi: 10.21111/pharmasipha.v5i1.5707.
- [22] K. Anwar, F. M. Lokana, and A. Budiarti, “Antioxidant Activity of Dewandaru Leaf (*Eugenia Uniflora* L.) Ethanol Extract and Determination of Total Flavonoid and Phenolic Content,” *Jurnal Ilmiah Sains*, pp. 161–171, Oct. 2022, doi: 10.35799/jis.v22i2.43913.
- [23] M. Spiegel *et al.*, “Antioxidant Activity of Selected Phenolic Acids–Ferric Reducing Antioxidant Power Assay and QSAR Analysis of the Structural Features,” *Molecules*, vol. 25, no. 13, p. 3088, Jul. 2020, doi: 10.3390/molecules25133088.
- [24] B. Guo *et al.*, “Electron structure variations in hindered phenolic antioxidant induced enhancement of thermo-oxidative aging performance in polyamide 6,” *RSC Adv*, vol. 15, no. 19, pp. 14594–14603, 2025, doi: 10.1039/D5RA01209K.
- [25] I. L. Dominguez, M. Pérez, and R. M. Lamuela-Raventós, “Total (poly)phenol analysis by the Folin-Ciocalteu assay as an anti-inflammatory biomarker in biological samples,” *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 64, no. 27, pp. 10048–10054, Oct. 2024, doi: 10.1080/10408398.2023.2220031.
- [26] I. L. Lawag, E. S. Nolden, A. A. M. Schaper, L. Y. Lim, and C. Locher, “A Modified Folin-Ciocalteu Assay for the Determination of Total Phenolics Content in Honey,” *Applied Sciences*, vol. 13, no. 4, p. 2135, Feb. 2023, doi: 10.3390/app13042135.
- [27] A. Agustin *et al.*, “Penetapan Kadar Fenol Total Ekstrak Etanol Berbagai Biji Buah Salak Bali (*Salacca zalanca* var. *ambonensis*) Menggunakan Metode Folin Ciocalteu Total Phenolic Content Determination of Ethanolic Extract from Various Salak Bali Seeds (*Salacca zalanca* var. *ambonensis*) Using the Folin Ciocalteu Method,” 2022.
- [28] A. Ulfa *et al.*, “Potensi Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* forma *typica*) dan Uli (*Musa paradisiaca* *sapientum*) Menaikkan Aktivitas Superoksida Dismutase dan Menurunkan Kadar Malondialdehid Organ Hati Tikus Model Hiperkolesterolemia,” *Acta Vet Indones*, vol. 8, no. 1, pp. 40–46, 2020, [Online]. Available: <http://www.journal.ipb.ac.id/index.php/actavetindones>
- [29] B. Bekdeşer and R. Apak, “Colorimetric Sensing of Antioxidant Capacity via Auric Acid Reduction Coupled to ABTS Oxidation,” *ACS Omega*, vol. 9, no. 10, pp. 11738–11746, Mar. 2024, doi: 10.1021/acsomega.3c09134.
- [30] E. Listiowati *et al.*, “Analisis Aktivitas Senyawa Antioksidan Pada Berbagai Daun Tanaman Herbal dengan Metode DPPH,” vol. 11, no. 1, pp. 98–114, 2024, [Online]. Available: <https://ppjp.ulm.ac.id/journal/index.php/pharmascience>