

**KARAKTERISASI KOMPONEN EKSTRAK METANOL
DAUN SIRIH MERAH (*Piper Crocatum*) DAN UJI
AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

Oleh :

ADITYA PRAMUDYA WARDHANA

0610923002-92



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2011**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**KARAKTERISASI KOMPONEN EKSTRAK METANOL
DAUN SIRIH MERAH (*Piper Crocatum*) DAN UJI
AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

Oleh :
ADITYA PRAMUDYA WARDHANA
0610923002-92

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Drs. Suratmo, M.Sc
NIP. 19630706 199002 1 002

Pembimbing II

Dr. Rurini Retnowati, M.Si
NIP. 19601209 198802 2 001

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 19630404 198701 1 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : ADITYA PRAMUDYA WARDHANA

NIM : 0610923002-92

Jurusan : KIMIA

Penulis skripsi berjudul :

**KARAKTERISASI KOMPONEN EKSTRAK
METANOL DAUN SIRIH MERAH (*Piper Crocatum*)
DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima. Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,

Yang menyatakan,

(ADITYA PRAMUDYA WARDHANA)

NIM 0610923002-92

KARAKTERISASI KOMPONEN EKSTRAK METANOL DAUN SIRIH MERAH (*Piper Crocatum*) DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komponen senyawa ekstrak metanol daun sirih merah (*Piper Crocatum*) dan aktivitasnya sebagai antioksidan. Ekstrak diperoleh dengan cara ekstraksi Soxhlet serbuk daun sirih merah kering menggunakan pelarut metanol. Karakterisasi hasil yang diperoleh dilakukan dengan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa (KC-SM). Uji aktivitas ekstrak metanol daun sirih merah sebagai antioksidan ditentukan berdasarkan nilai IC_{50} menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*). Pengukuran dengan larutan standar DPPH dilakukan pada λ_{maks} 515 nm menggunakan Spektroskopi UV-Vis. Hasil karakterisasi dengan menggunakan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa menunjukkan bahwa adanya puncak dengan waktu retensi 15,197; 15,961; 19,781 yang masing-masing diduga komponen senyawa dalam ekstrak adalah hidrosikavikol- β -maltosida, asam oktadekanoat, 2,3-bis(hidroksi)propil ester- β -asetil maltosida, kavibetol asetat- β -asetil maltosida. Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan nilai IC_{50} untuk ekstrak metanol daun sirih merah sebesar 24,30 $\mu\text{g/ml}$ dan sebagai pembanding yaitu asam askorbat mempunyai nilai IC_{50} 5,10 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun sirih merah sangat besar.

Kata kunci: sirih merah, DPPH, antioksidan

CHARACTERIZATION OF COMPONENT METHANOL EXTRACT FROM RED SIRIH (*PIPER CROCATUM*) LEAF AND THE ACTIVITY TEST AS ANTIOXIDANT

ABSTRACT

Aim of this research is to characterize the component compounds in red sirih leaf (*Piper Crocatum*) extract and its activity as antioxidant. Extract was obtained use Soxhlet extraction with methanol solvent of dry red sirih leaf. Extract was characterized with Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy. Activity test of methanol extract red sirih leaf as antioxidant used DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method that stated in IC_{50} value. Measurement of DPPH at λ_{max} 515 nm using UV-Vis Spectroscopy. Characteristic result using Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy showed there is a peak with retention time 15.197; 15.961; 19.781 that there are hydroxicavicol- β -maltoside, oktadekanoat acid, 2,3-bis(hydroxi)propyl ester- β -asetil maltoside, cavibetol asetic- β -asetal maltoside. Activity test as antioxidant has been done using DPPH method obtained that methanol extract red sirih leaf has IC_{50} value at 24.30 $\mu\text{g/ml}$ and as comparison that is ascorbic acid has IC_{50} value at 5.10 $\mu\text{g/ml}$. IC_{50} value showed that antioxidant activity of methanol extract from red sirih is very high.

Key words: red sirih, DPPH, antioxidant

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena atas segala limpahan rahmat, karunia dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Karakterisasi Komponen Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) dan Uji Aktivitasnya sebagai Antioksidan”**, sebagai salah satu persyaratan dalam memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia MIPA Universitas Brawijaya.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada:

1. Drs. Suratmo, M.Sc dan Dr. Rurini Retnowati, M.Si selaku dosen pembimbing I dan II, atas bimbingan, pengarahan dan kesabaran yang diberikan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
2. Ulfa Andayani S.Si. M.Si. selaku dosen penasehat akademik yang telah memberikan semangat dan masukan kepada penulis selama masa studi.
3. Qonitah Fardiyah, S.Si., M.Si., Drs. Sutrisno, M.Si., Drs. M. Misbah Khunur, M.Si., dan Ir. Bambang Ismuyanto, MS. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran dalam perbaikan skripsi ini.
4. Ketua Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, staf pengajar, dan semua karyawan Jurusan Kimia atas semua bantuan yang diberikan.
5. Kedua orang tua dan keluarga penulis yang selalu memberikan doa, semangat, kasih sayang, dan dukungan hingga terselesainya skripsi ini.
6. Semua rekan – rekan di Jurusan Kimia, terutama angkatan 2006 yang telah memberikan semangat dan persahabatan selama ini.

Akhirnya dengan segala keterbatasan serta pengetahuan penulis, maka penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Dengan kerendahan hati penulis mengharapkan semoga skripsi ini dapat memberikan sumbangan yang bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Malang, Januari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tanaman Sirih Merah	4
2.2 Kandungan Kimia Daun Sirih Merah	5
2.2.1 Flavonoid	6
2.2.2 Senyawa Fenol	6
2.3 Antioksidan pada Daun Sirih Merah	7
2.4 Ekstraksi	8
2.5 Kromatografi Cair (KC) – Spektroskopi Massa (SM)	10
2.6 Spektrofotometri Ultraviolet-Visibel (UV-VIS)	13
2.7 Metode DPPH	13
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	16
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	16
3.2.1 Bahan Sampel	16
3.2.2 Bahan Penelitian	16
3.2.3 Alat Penelitian	16

3.3 Tahapan Penelitian.....	17
3.4 Cara Kerja Penelitian.....	17
3.4.1 Preparasi Bahan Penelitian.....	17
3.4.2 Ekstraksi Soxhlet Daun Sirih Merah.....	17
3.4.3 Identifikasi dengan KC-SM.....	18
3.4.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	18
a. Larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).....	18
b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH ...	18
c. Uji Aktivitas Antioksidan.....	19
3.4.5 Analisis Data.....	19
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Bahan.....	20
4.2 Analisis Komponen Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah Menggunakan KC-SM.....	20
4.3 Uji Aktivitas sebagai Antioksidan.....	29
BAB V. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	32
5.2 Saran.....	32
DAFTAR PUSTAKA.....	33
LAMPIRAN.....	37

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Sirih Merah (<i>Piper crocatum</i>).....	4
Gambar 2.2 Contoh Struktur Senyawa Flavonoid	6
Gambar 2.3 Struktur Senyawa Fenol dan Tuunannya	7
Gambar 2.4 Mekanisme Penghambatan Radikal DPPH	14
Gambar 4.1 Spektrum Massa Komponen Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah pada Waktu Retensi 19,781	21
Gambar 4.2 Pola Fragmentasi Komponen Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah pada Waktu Retensi 19,781	23
Gambar 4.3 Spektrum Massa Komponen Ekstrak Metanol Sirih Merah pada Waktu Retensi 15,961	24
Gambar 4.4 Pola Fragmentasi Komponen Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah pada Waktu Retensi 15,961	26
Gambar 4.5 Spektrum Massa Komponen Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah pada Waktu Retensi 15,197	27
Gambar 4.6 Pola Fragmentasi Komponen Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah pada Waktu Retensi 15,197	28
Gambar 4.7 Kurva Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah.....	30
Gambar 4.8 Kurva Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat.....	31

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah dan Vitamin C Menggunakan Metode DPPH ... 30

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Diagram Alir Tahapan Penelitian	37
Lampiran 2 Identifikasi Taksonomi Tumbuhan.....	38
Lampiran 3 Skema Kerja	39
L.3.1 Preparasi Bahan Penelitian	39
L.3.1.1 Preparasi Daun Sirih Merah	39
L.3.2 Identifikasi Menggunakan KC-SM	40
L.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan.....	40
L.3.3.1 Pembuatan Larutan DPPH 50 μ M.....	40
L.3.3.2 Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maks DPPH	40
L.3.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan.....	41
Lampiran 4 Perhitungan.....	42
L.4.1 Perhitungan Kadar Air dalam Daun Sirih Merah Setelah Pengeringan 4-5 Hari.....	42
L.4.2 Perhitungan Rendemen Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah	42
L.4.3 Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah Konsentrasi 1 mg/mL	43
L.4.4 Perhitungan Pembuatan Variasi Konsentrasi dari 1 mg/mL Ekstrak Daun Sirih Merah	43
L.4.4.1 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah Konsentrasi 10 μ g/mL	43
L.4.4.2 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah Konsentrasi 30 μ g/mL.....	43
L.4.4.3 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah Konsentrasi 50 μ g/mL.....	44
L.4.4.4 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirih Konsentrasi 70 μ g/mL	44
L.4.4.5 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Konsentrasi 90 μ g/mL.....	44
L.4.5 Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 1 mg/mL	45
L.4.6 Perhitungan Pembuatan Variasi Konsentrasi dari 1 mg/mL Asam Askorbat	45
L.4.6.1 Perhitungan Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 2 μ g/mL.....	45

L.4.6.2	Perhitungan Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 3 $\mu\text{g/mL}$	45
L.4.6.3	Perhitungan Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 4 $\mu\text{g/mL}$	46
L.4.6.4	Perhitungan Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$	46
L.4.6.5	Perhitungan Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 6 $\mu\text{g/mL}$	46
L.4.7	Perhitungan % Inhibisi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah Menggunakan Metode DPPH	47
L.4.7.1	Nilai % Inhibisi Untuk Ekstrak dengan Konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$	47
L.4.7.2	Nilai % Inhibisi Untuk Ekstrak dengan Konsentrasi 30 $\mu\text{g/mL}$	47
L.4.7.3	Nilai % Inhibisi Untuk Ekstrak dengan Konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$	47
L.4.7.4	Nilai % Inhibisi Untuk Ekstrak dengan Konsentrasi 70 $\mu\text{g/mL}$	48
L.4.7.5	Nilai % Inhibisi Untuk Ekstrak dengan Konsentrasi 90 $\mu\text{g/mL}$	48
L.4.8	Perhitungan % Inhibisi Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat Menggunakan Metode DPPH.....	48
L.4.8.1	Nilai % Inhibisi Untuk Asam Askorbat dengan Konsentrasi 2 $\mu\text{g/mL}$	48
L.4.8.2	Nilai % Inhibisi Untuk Asam Askorbat dengan Konsentrasi 3 $\mu\text{g/mL}$	49
L.4.8.3	Nilai % Inhibisi Untuk Asam Askorbat dengan Konsentrasi 4 $\mu\text{g/mL}$	49
L.4.8.4	Nilai % Inhibisi Untuk Asam Askorbat dengan Konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$	49
L.4.8.5	Nilai % Inhibisi Untuk Asam Askorbat dengan Konsentrasi 6 $\mu\text{g/mL}$	50
L.4.9	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah	50
L.4.10	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Asam Askorbat.....	51
Lampiran 5	Hasil Analisis Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah Menggunakan KC-SM	51
L.5.1	Kromatogram KC.....	51

L.5.2	Data Hasil Analisis Senyawa Menggunakan KC	51
L.5.3	Hasil Pindaian (<i>Scan</i>)	53
L.5.3.1	Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 15,197 menit (Puncak nomor 1)	53
L.5.3.2	Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 15,961 menit (Puncak nomor 2)	53
L.5.3.3	Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 19,781 menit (Puncak nomor 3)	53
Lampiran 6	Pustaka Spektrum Massa Komponen dalam Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah	54
L.6.1	Senyawa 4-alilfenol (kavikol)	54
L.6.2	Senyawa kavikol asetat	54
Lampiran 7	Foto-foto	55
L.7.1	Foto Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah	55
L.7.2	Foto Alat KC-SM Merk Shimadzu LC 10 AD-QP 8000	55
L.7.3	Larutan Ekstrak dengan Berbagai Konsentrasi Setelah Ditambahkan Larutan DPPH	56

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia mempunyai banyak keanekaragaman hayati. Tumbuhan-tumbuhan tersebut dapat memberikan manfaat dalam berbagai bidang antara lain bidang pertanian, perkebunan, kehutanan, dan industri bahan dasar obat-obatan herbal. Tumbuhan yang sering digunakan sebagai obat dikenal dengan nama obat tradisional. Salah satu tanaman obat tersebut adalah sirih merah yang merupakan jenis sirih yang merambat dan banyak tumbuh di daerah tropis. Tanaman sirih merah bermanfaat untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti diabetes, hipertensi, kanker payudara, peradangan, hepatitis, ambeien, asam urat, maag, dan luka. Pemanfaatan sirih merah dilakukan dengan cara mengkonsumsi daunnya atau diekstrak terlebih dahulu untuk mengambil bahan aktifnya (Sudewo,2005).

Khasiat sirih merah tersebut disebabkan sejumlah senyawa aktif yang dikandungnya, antara lain flavonoid, alkaloid, polifenolat, tanin dan minyak atsiri. Senyawa flavonoid dan polifenol bersifat antioksidan, antidiabetik, antikanker, antiseptik dan antiinflamasi. Sedangkan senyawa alkaloid mempunyai sifat antineoplastik yang juga ampuh menghambat pertumbuhan sel-sel kanker (Sudewo,2005).

Menurut Alfarabi (2008), daun sirih merah mengandung senyawa flavonoid, tanin, dan alkaloid dalam ekstrak metanol sehingga dapat berpotensi membentuk efek antioksidan.

Pengambilan bahan aktif dari suatu tanaman, dapat dilakukan dengan ekstraksi. Dalam proses ekstraksi ini, bahan aktif akan terlarut oleh zat penyari yang sesuai sifat kepolarannya. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat, daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna (Parker, 1993).

Menurut Maitsuthisakul (2008), berdasarkan sifat kepolarannya metanol dapat digunakan untuk mengekstrak senyawa fenolik dari daun sirih (*Piper Lynn*). Ekstrak metanol dari daun sirih menunjukkan kandungan fenolik dengan aktivitas antioksidan yang cukup tinggi.

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas sehingga radikal bebas tersebut dapat dikurangi. Berdasarkan sumber perolehannya ada dua macam antioksidan, yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan (sintetik). Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih maka tubuh memerlukan antioksidan eksogen. Adanya kekhawatiran akan kemungkinan efek samping yang belum diketahui dari antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan (Ilham Kuncahyo, 2007).

Penelitian yang telah dilakukan Atta-ur-Rahman (2001), membuktikan bahwa senyawa-senyawa yang mempunyai potensi sebagai antioksidan umumnya merupakan senyawa flavonoid, fenolik dan alkaloid. Senyawa flavonoid dan fenolik bersifat antioksidan, antidiabetik dan antiseptik.

Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan persen penghambatan. Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah *Inhibition Concentration* (IC_{50}) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan konsentrasi awal DPPH sebesar 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga IC_{50} yang rendah yaitu kurang dari 200 $\mu\text{g/ml}$ (Molyneux, 2004).

Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap (Sunarni, 2005).

Berdasarkan uraian diatas, maka pada penelitian ini dilakukan dengan ekstraksi Soxhlet menggunakan pelarut metanol untuk mendapatkan komponen polar daun sirih merah. Komponen utama ekstrak metanol daun sirih merah hasil ekstraksi diidentifikasi menggunakan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa. Uji aktivitas ekstrak metanol daun sirih merah (*Piper Crocatum*) sebagai antioksidan dilakukan terhadap radikal DPPH yang dinyatakan dalam harga IC_{50} .

1.2. Rumusan Masalah

1. Komponen apa yang terdapat pada ekstrak metanol daun sirih merah?
2. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun sirih merah?

1.3. Batasan Masalah

1. Ekstraksi daun sirih merah dilakukan secara ekstraksi soxhlet dengan pelarut metanol
2. Karakterisasi komponen senyawa kimia aktif dalam daun sirih merah menggunakan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa
3. Uji aktivitas sebagai antioksidan dengan menggunakan DPPH

1.4. Tujuan Penelitian

1. Melakukan karakterisasi komponen ekstrak metanol daun sirih merah
2. Mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun sirih merah

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini untuk mengetahui informasi mengenai komponen senyawa dalam ekstrak metanol daun sirih merah serta kandungan senyawa kimia aktif dalam ekstrak metanol yang berperan sebagai antioksidan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Sirih Merah

Sirih merah secara ilmiah dikenal dengan nama *Piper crocatum* termasuk dalam familia Piperaceae. Nama lokal dari sirih merah yaitu *Guan Shang hu Jiao* (Cina), *Ornamental Pepper* (Inggris) dan sirih merah (Indonesia). Sedangkan nama daerah tanaman sirih yaitu suruh, sedah (Jawa), seureuh (sunda), ranub (Aceh), Cambai (Lampung), base (Bali), Nahi (Bima), mata (flores), gapura, dontile, gamnjeng, perigi (Sulawesi), bida (Maluku) (Mardiana, 2004).

Adapun kedudukan tanaman sirih merah menurut Dasuki (1994) dalam sistematik (taksonomi) tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Magnoliidae
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae
Genus	: Piper
Spesies	: <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.



Gambar 2.1 Sirih merah (*Piper crocatum*)

Menurut Syariefa (2006) sirih merah merupakan tanaman yang tumbuh merambat dan sosoknya mirip tanaman lada. Tinggi tanaman biasanya mencapai 10 m, tergantung pertumbuhan dan tempat merambatnya. Batang sirih berkayu lunak, beruas-ruas, beralur dan berwarna hijau keabu-abuan. Daun tunggal berbentuk seperti jantung hati, permukaan daun licin, bagian tepi rata dan pertulangannya menyirip. Bunga majemuk tersusun dalam bulir, merunduk dan panjangnya sekitar 5-15 cm.

Menurut Sudewo (2005) ciri dari tanaman yang termasuk dalam suku Araceae yaitu tumbuhan menjalar. Batangnya bulat berwarna hijau keunguan dan tidak berbunga. Daunnya bertangkai membentuk jantung dengan bagian atas meruncing bertepi rata dan permukaan mengkilap atau tidak berbulu. Panjang daunnya bisa mencapai 15-20 cm. Warna daun bagian atas hijau bercorak putih keabu-abuan. Bagian bawah daun berwarna merah hati cerah. Daunnya berlendir, berasa sangat pahit, dan beraroma wangi khas sirih. Batangnya berjalur dan beruas dengan jarak buku 5-10 cm. Disetiap buku tumbuh bakal akar.

2.2. Kandungan Kimia Daun Sirih Merah

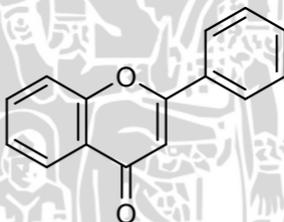
Menurut Sholikhah (2009) senyawa fitokimia yang terkandung dalam daun sirih merah yakni alkaloid, saponin, tannin dan flavonoid. Sedangkan menurut Sudewo (2005) bahwa dalam daun sirih merah mengandung senyawa flavonoid, polifenolat, tannin, dan minyak atsiri.

Sirih merah (*Piper crocatum*) dan sirih hijau (*Piper betle*) merupakan tanaman dalam genus yang sama. Senyawa penyusun daun sirih hijau dalam ekstrak air menggunakan KG-SM meliputi hidroksikavikol (39,31%), asam stearat (3,77%), asam palmitat (1,60%), asam hidroksibenzene asetat (3,96%), hidroksi ester dari asam stearat (24,49%), hidroksi ester dari asam palmitat (14,71%), dan hidroksi ester dari asam miristat (1,58%) (Nalina dan Rahim 2007).

2.2.1. Flavonoid

Flavonoid adalah kelompok senyawa fenol yang terbesar ditemukan di alam. Senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru dan sebagian kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan (Harborne, 1987). Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana dua cincin benzen (C_6) terikat pada suatu rantai propana (C_3) sehingga membentuk suatu susunan $C_6-C_3-C_6$. Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur senyawa flavonoida yaitu flavonoid, isoflavonoid dan neoflavonoid.

Istilah flavonoida diberikan untuk senyawa-senyawa fenol yang berasal dari kata flavon, yaitu nama dari salah satu jenis flavonoida yang terbesar jumlahnya dalam tumbuhan. Banyaknya senyawa flavonoida ini disebabkan oleh berbagai tingkat hidroksilasi, alkoksilasi atau glikosilasi dari struktur tersebut. Senyawa-senyawa isoflavonoida dan neoflavonoida hanya ditemukan dalam beberapa jenis tumbuhan, terutama suku leguminosae. Adapun contoh struktur senyawa dari golongan flavonoid tersebut disajikan sebagai berikut (Harborne, 1987):



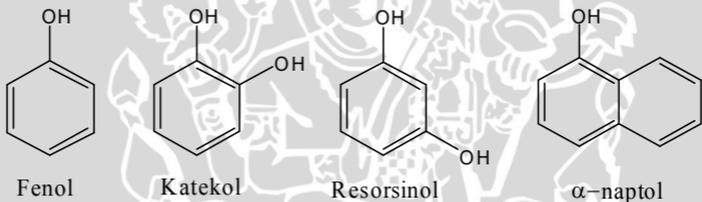
Gambar 2.2 Contoh struktur senyawa Flavanoid

2.2.2. Senyawa fenol

Fenol adalah senyawa dengan gugus OH yang terikat pada cincin aromatik (Fessenden dan Fessenden, 1986). Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang memiliki ciri-ciri yang sama, yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksi. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena sering berikatan dengan gula sebagai glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel (Harborne, 1987). Senyawa fenol merupakan kelas utama antioksidan yang berada dalam tumbuh-tumbuhan. Senyawa ini diklasifikasikan dalam dua bagian

yaitu fenol sederhana dan polifenol. Fenol sederhana disebut juga asam fenolat contohnya katekol dengan 2 gugus OH dan pirogalol dengan 3 gugus OH, sedangkan senyawa polifenol contohnya fenilpropanoid, kuinon, tanin, flavonoid dan beberapa terpenoid (Harborne, 1987). Kandungan senyawa fenolik banyak diketahui dapat mengurangi radikal bebas dan pada umumnya kandungan senyawa fenolik berkorelasi positif terhadap aktivitas antiradikal. Polifenol 13 berperan penting dalam stabilisasi oksidasi lipid dan berhubungan langsung dengan aksi antioksidan (Harborne, 1987).

Menurut Alberto *et al.* (2009), fenol menghasilkan warna coklat kemerahan, α -naptol berwarna abu-abu, katekol berwarna biru dan resorsinol berwarna hijau. Selain itu, Khan dan Saeed (1998) menyatakan bahwa pada ekstrak metanol tanaman *Salvia splendens* Sello menghasilkan terdapat kandungan senyawa fenol. Adapun struktur dari beberapa senyawa golongan fenol tersebut disajikan sebagai berikut (Wilson and Gisvold, 1962):



Gambar 2.3 Struktur senyawa fenol dan turunannya

2.3. Antioksidan Pada Daun Sirih Merah

Antioksidan biasanya senyawa organik yang lebih mudah dioksidasi dan karenanya dapat menghambat sifat oksidatif zat kedua itu bila ditambahkan kepadanya (Gupte, 1990).

Menurut Mardiana (2004) antioksidan adalah zat yang mampu mematikan zat lain yang membuat sel menjadi rapuh dan mampu memperbaiki sel yang rusak. Dengan cara mengonsumsi buah dan sayur yang mengandung antioksidan secara teratur dan sesuai dosis maka terbukti dapat mengurangi resiko terserang kanker. Antioksidan merupakan senyawa penting dalam menjaga kesehatan tubuh karena berfungsi sebagai penangkal radikal bebas yang banyak terbentuk dalam tubuh. Selain dikonsumsi dalam bentuk makanan, antioksidan juga dimanfaatkan untuk bagian luar tubuh.

Radikal bebas itu merupakan senyawa yang keadaannya bebas dan mempunyai satu atau lebih elektron bebas yang tidak berpasangan. Radikal lebih reaktif oleh karena sangat reaktif, radikal bebas mudah menyerang sel-sel yang sehat dalam tubuh. Bila pertahanan tubuh kurang maka sel-sel sehat menjadi sulit. Di sinilah peran antioksidan cukup penting dalam membantu pencegahan kerusakan sel-sel sehat akibat adanya radikal bebas.

Kandungan kimia senyawa aktif yang terdapat pada daun sirih merah adalah polifenolat dan tannin. Kedua senyawa tersebut termasuk golongan fenol dan aktivitas biologis sebagai penangkal radikal bebas sehingga dapat dimanfaatkan sebagai obat melawan penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas seperti kanker (Hanani, 2005). Menurut Fessenden & Fessenden (1989) Produk radikal bebas dari senyawa fenol ini terstabilkan secara resonansi.

2.4. Ekstraksi

Ekstraksi adalah salah satu metode untuk memisahkan suatu komponen dari campuran senyawa organik adalah dengan ekstraksi pelarut. Ekstraksi dari suatu campuran padat dilakukan untuk memisahkan senyawa alami dari sampel kering yang berasal dari tumbuhan, lemak, jamur, biji-bijian, bunga, dan lain-lain. Untuk mengekstraksi padatan ke dalam pelarut organik secara berkesinambungan dengan suatu pelarut panas biasanya digunakan alat ekstrator Soxhlet (Furnish, 1989).

Ekstraksi merupakan salah satu metode pemisahan senyawa dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ragam ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Metode ini didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara pelarut yang tidak saling bercampur, namun dapat melarutkan zat yang akan dipisahkan. Batasannya adalah zat terlarut dapat ditransfer pada jumlah berbeda dalam kedua fase pelarut (Khopkar, 1990).

Berdasarkan bentuk campurannya, ekstraksi dapat digolongkan menjadi dua yaitu ekstraksi cair padat, di mana substansi yang diekstraksi terdapat dalam campuran yang berbentuk padat dan ekstraksi cair-cair, di mana substansi yang diekstraksi terdapat dalam campuran yang berbentuk cair (Furnish, 1989).

Sedangkan berdasarkan proses ekstraksi dibedakan menjadi dua yaitu ekstraksi bertahap dimana pada proses ini tiap tahapannya menggunakan pelarut yang terus diperbarui hingga proses selesai dan ekstraksi berkesinambungan dimana pada proses ini, pelarut yang digunakan dapat dipakai secara berulang-ulang hingga proses selesai.

Salah satu contoh ekstraksi berkesinambungan adalah ekstraksi Soxhlet yang merupakan salah satu cara untuk memisahkan campuran padat cair. Prinsip yang dilakukan dalam ekstraksi Soxhlet ini adalah pemanasan (penguapan), kondensasi dan proses pengekstrakan. Sampel dikemas dalam timbel kertas saring, pelarut diuapkan lalu dikondensasi. Pelarut yang terkondensasi jatuh ke timbelyang berisi sampel sehingga terjadi proses pengekstrakan komponen non-volatil. Sistem pipa siphon mengakibatkan ekstrak jatuhkedalam labu didih dan pelarut volatil didihkan kembali. Proses ini terjadi secara berulang-ulang dengan pelarut yang tetap (Buche, 1986).

Prinsip dari ekstraksi adalah minyak dan pelarut dipisahkan dengan cara distilasi. Selain ekstraksi dalam ekstraktor Soxhlet melalui tahap-tahap evaporasi, kondensasi dan ekstraksi. Campuran yang diperoleh dipisahkan dari pelarut dengan evaporator vakum kemudian zat cair hasil ditimbang dan ditentukan berat jenis minyak yang sudah diuapkan dibawah 103°C (Parker, 1993).

Beberapa keuntungan dari ekstraksi soxhlet adalah efisiensi bahan, tenaga dan pelarut serta hasilnya bersih. Sedangkan kelemahannya yaitu jumlah bahan yang diekstraksi tidak bisa dalam skala besar, hasilnya juga tidak banyak (Harbone, 1987).

Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator vakum yang akan memekatkan larutan tanpa terjadinya percikan pada suhu $30^{\circ} - 40^{\circ}\text{C}$ (Harbone, 1987). Alat ini menggunakan pompa yang dihubungkan dengan suatu labu yang berputar dalam penangas air. Pemekatan larutan dengan cara menghilangkan pelarut perlu dilakukan untuk mendapatkan padatan non-volatil atau residu liquid (Ault, 1983).

Tekanan dalam labu yang lebih rendah daripada tekanan di luar labu menyebabkan temperatur penguapan relatif rendah. Rotasi labu selama evaporasi memastikan larutan selalu tercampur dan meminimalkan pemanasan yang berlebihan sehingga mencegah bumping. Dinding labu yang berputar selalu dibasahi oleh larutan sehingga dapat memperbesar luas permukaan penguapan. Pelarut

yang diuapkan dari permukaan dikondensasi oleh kondensor spiral dan ditampung dalam labu pelarut (Furnish, 1989).

Faktor yang paling menentukan dari keberhasilan selama proses ekstraksi adalah penggunaan pelarut yang tepat. Pelarut yang ideal harus mempunyai syarat yaitu pelarut dapat melarutkan semua komponen dalam bahan dengan cepat dan sempurna dan sedikit mungkin melarutkan bahan seperti lilin, pigmen, senyawa albumin, dengan kata lain pelarut harus bersifat selektif. Pelarut mempunyai titik didih yang cukup rendah agar mudah diuapkan kembali tanpa menggunakan suhu tinggi, namun juga tidak terlalu rendah karena akan mengakibatkan hilangnya sebagian pelarut saat diuapkan. Pelarut tidak dapat larut dalam air. Pelarut haruslah bersifat inert sehingga tidak bereaksi dengan komponen minyak. Pelarut mempunyai titik didih yang seragam, dan jika diuapkan tidak akan tertinggal di dalam minyak setelah proses penguapan sehingga mempengaruhi aroma minyak yang dihasilkan. Pelarut tidak mudah terbakar dan harganya murah (Guenther, 1992).

Beberapa keuntungan dari penggunaan ekstraktor soxhlet adalah efisiensi penggunaan larutan, efisiensi tenaga yang digunakan, kemurnian tinggi dan bersih dari jaringan bahan maupun bahan pengotor (Buche, 1986).

Ekstrak hasil evaporasi vakum yang diperoleh kemudian diperlakukan sedemikian rupa hingga diperoleh kristal. Untuk memurnikannya digunakan proses rekristalisasi. Rekristalisasi merupakan metode pemurnian kristal sehingga kristal perolehan lebih murni (Mc Kabe, 1990).

2.5. Kromatografi Cair (KC)- Spektrometri Massa (SM)

Kromatografi Cair (KC) merupakan istilah yang digunakan dalam kromatografi dimana fase geraknya berupa cairan. Berbeda dengan KG, penggunaan KC tidak dibatasi pada sifat volatil suatu senyawa atau stabilitasnya terhadap temperatur (Braithwaite dan Smith, 1985).

KC dapat dipakai untuk senyawa anorganik yang sebagian besar tidak atsiri dan senyawa dengan bobot molekul tinggi. KC biasanya dilakukan pada temperatur kamar sehingga senyawa yang tidak tahan panas dapat ditangani dengan mudah (Gritter *et al.*, 1991).

Di dalam KC dikenal istilah kromatografi fase normal dan fase terbalik. Pada fase normal, fase diam bersifat polar dan fase geraknya

nonpolar. Sedangkan pada fase terbalik, fase diam bersifat nonpolar dan fase geraknya polar sehingga senyawa polar akan keluar terlebih dahulu bersama eluen (Wagaw *et al.*, 2009).

Untuk membuat fase diam pada kromatografi fase terbalik pada pendukung berupa silika, silanol bebas direaksikan dengan klorosilan yang bersifat hidrofob agar permukaannya bersifat nonpolar. Silanol yang bereaksi biasanya hanya sepertiganya saja. Oleh karena itu, selanjutnya kolom direaksikan dengan klorotrimetilsilan yang bereaksi dengan silanol bebas yang akan meningkatkan efisiensi kolom (Wagaw *et al.*, 2009).

Kolom yang paling banyak digunakan pada kromatografi fase terbalik adalah oktadekil (C₁₈, ODS), yang berikatan kuat dengan analit nonpolar. Kolom ini berguna untuk analisis nukleosida, steroid, vitamin, asam lemak, dan senyawa-senyawa alam (Wagaw *et al.*, 2009).

Selain kolom, pemisahan juga dipengaruhi fase geraknya. Karena derajat kelarutan komponen dalam sampel bervariasi terhadap pelarut yang berbeda, pemilihan pelarut organik dapat mempengaruhi selektivitas dan resolusinya. Pelarut organik yang sering digunakan dalam kromatografi fase terbalik adalah metanol, tetrahidrofuran, dan asetonitril untuk meningkatkan kekuatan pelarutnya. Kekuatan pelarut merupakan kemampuan pelarut untuk menahan analit dalam fase gerak. Asetonitril merupakan pelarut aprotik yang sangat polar, memberikan resolusi yang baik pada pemisahan banyak senyawa (Wagaw *et al.*, 2009).

Spektrometer massa merupakan detektor yang baik untuk KC. Pemakaian spektrometer massa pada efluen kromatografi memungkinkan untuk mengukur spektra massa setiap komponen, atau sembarang bagian dari aliran, komponen murni atau campuran. Data jenis ini dapat dipakai untuk mendeteksi zat terlarut dan terutama untuk identifikasi kuantitatif (Gritter *et al.*, 1991).

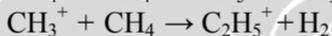
Spektrometri massa didasarkan pada penguraian senyawa organik dan pola fragmentasi menurut massanya. Pada spektrometri massa, sampel dalam bentuk gas ditembak dengan elektron berenergi tinggi (Fessenden dan Fessenden, 1992). Tabrakan antara sebuah molekul organik dan salah satu elektron berenergi tinggi menyebabkan lepasnya elektron dari molekul menghasilkan radikal kation. Ion molekuler tersebut biasanya terurai menjadi sepasang pecahan atau filamen yang dapat berupa radikal dan ion, atau molekul kecil dan

radikal kation. Spektra massa yang dihasilkan merupakan grafik antara limpahan relatif lawan perbandingan massa/muatan (m/z) (Sastrohamidjojo, 1991).

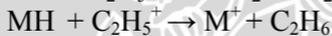
Dalam spektrometri massa, dikenal beberapa metode pengionan, yaitu (Anonymous, 2008):

1. Ionisasi kimia

Pada ionisasi kimia digunakan ion reagen untuk bereaksi dengan molekul analit. Ion reagen dihasilkan dari penembakan metana oleh sumber elektron pada *electron impact* (EI). Tumbukan elektron akan menghasilkan CH_4^+ dan CH_3^+ yang kemudian bereaksi dengan metana membentuk ion reagen CH_5^+ dan C_2H_5^+ . Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Ion reagen yang dihasilkan bereaksi dengan molekul analit melalui transfer proton maupun hidrida. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



2. *Electron Impact* (EI)

EI menggunakan sumber sinar elektron, yang biasanya dihasilkan dari filamen tungsten untuk mengionisasi atom atau molekul menjadi fase gas. Elektron sumber akan menumbuk elektron pada atom atau molekul analit sehingga menghasilkan ion.

3. *Electrospray Ionization* (ESI)

Sumber ESI terdiri dari jarum yang sangat kecil dan rangkaian penyaring. Larutan sampel disemprotkan untuk membentuk *droplet*. *Droplet* tersebut yang membawa muatan ketika keluar dari kapiler pada saat pelarut menguap. Metode ESI sangat berguna untuk ionisasi molekul biologi yang besar yang sangat sulit untuk menguap atau terionisasi.

KC-SM adalah perpaduan dua instrumen, yaitu kromatografi cair dan spektrometer massa. Masalah utama dari penggunaan KC-SM adalah adanya fase gerak berupa zat cair yang harus dihilangkan sebelum spektra dapat diukur (Gritter *et al.*, 1991).

2.6. Spektrofotometri Ultraviolet-Visibel (UV-VIS)

Identifikasi senyawa organik dengan spektrofotometri UV-VIS didasarkan pada serapan cahaya oleh molekul pada daerah spektrum UV-VIS. Serapan cahaya oleh molekul pada daerah UV-VIS tergantung pada struktur elektronik dari molekul (Sastrohamidjojo, 2001).

Menurut Sastrohamidjojo (2001), spektra UV senyawa organik berkaitan erat dengan transisi di antara tingkatan-tingkatan energi elektronik. Keadaan dasar suatu molekul organik mengandung elektron-elektron valensi dalam tiga tipe utama orbital molekul: orbital sigma (σ), orbital phi (π), dan orbital *non bonding* (n). Transisi elektron mencakup promosi salah satu elektron dari tiga keadaan dasar (σ , π , n) ke salah satu elektron dari dua keadaan eksitasi (σ^* atau π^*).

Menurut Markham (1988), senyawa flavonoid merupakan senyawa polifenol. Senyawa fenolik mengandung sistem aromatik terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak. Selain itu, secara khas senyawa fenolik menunjukkan pergeseran batokromik pada spektrumnya apabila ditambahkan basa. Hal ini dikarenakan, terjadi ionisasi pada gugus hidroksil sehingga memperpanjang sistem delokalisasi elektron. Akibat delokalisasi elektron, energi yang digunakan untuk transisi elektron akan lebih rendah, dengan demikian akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih besar (Markham, 1988). Adanya basa juga dapat menyebabkan oksidasi pada senyawa fenolik (Robinson, 1995).

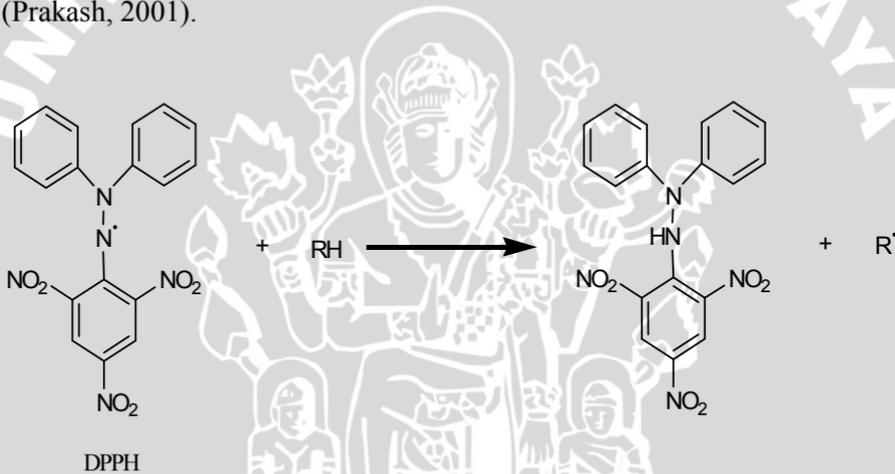
2.7. Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) adalah radikal bebas stabil berwarna ungu. Ketika direduksi oleh senyawa antiradikal, terjadi perubahan warna menjadi berwarna kuning (*difenilpikrilhidrazilin*). Metode DPPH berfungsi untuk mengukur elektron tunggal seperti aktivitas transfer hidrogen sekaligus juga untuk mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas. Metode ini sangat cocok untuk skrining awal berbagai sampel, terutama ekstrak tumbuhan (Prakash, 2001).

Campuran reaksi berupa larutan sampel dan DPPH yang dilarutkan dalam etanol absolut dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit dan dibaca pada panjang gelombang 520 nm. Metode ini sering digunakan untuk mendeteksi kemampuan

antiradikal suatu senyawa sebab hasilnya terbukti akurat, reliabel, relatif cepat dan praktis (Prakash, 2001).

Senyawa DPPH berwarna ungu karena adanya delokalisasi elektron pada atom nitrogen yang semula (N-N) menjadi (N=N). Hal ini mengakibatkan ikatan rangkap terkonjugasi menjadi lebih panjang sehingga panjang gelombang DPPH bergeser ke panjang gelombang yang lebih panjang (Hanani *et al.*, 2005). Peredaman tersebut dihasilkan oleh bereaksinya molekul *difenil pikril hidrazil* dengan atom hidrogen yang dilepaskan satu molekul komponen bahan uji sehingga membentuk senyawa *difenil pikril hidrazin* yang berwarna kuning. Penurunan absorbansi DPPH dari warna ungu ke kuning diukur pada λ 520 nm menurut reaksi pada Gambar 2.4 (Prakash, 2001).



Gambar 2.4 Mekanisme Penghambatan Radikal DPPH

Larutan DPPH berwarna ungu, sedangkan DPPH tereduksi tidak memiliki absorpsi maksimum pada panjang gelombang sinar tampak. Dengan demikian, semakin kuat kapasitas antioksidan suatu senyawa, maka semakin pudar warna ungu yang dihasilkan. Kapasitas antioksidan (%) dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

Keterangan:

A_{blanko} = absorbansi larutan DPPH

A_{sampel} = absorbansi larutan sampel



BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian Tugas Akhir ini dilaksanakan pada bulan Februari 2010 sampai bulan Agustus 2010 di Laboratorium Organik, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang. Analisis KC-SM dilaksanakan di Laboratorium Pengujian Balai Besar Riset Pengolahan Produk Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta; Uji aktivitas antioksidan dilaksanakan di Laboratorium Organik, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang mulai bulan Agustus-Oktober 2010.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan sampel

Bahan sampel sirih merah yang digunakan dalam penelitian ini adalah berupa daun sirih merah yang diambil dari Kota Malang - Jawa Timur.

3.2.2. Bahan penelitian

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol teknis, larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), kertas tissue, *aluminium foil*, plastik dan akuades.

3.2.3. Alat penelitian

Alat-alat digunakan dalam penelitian ini meliputi blender, statif, botol semprot, timbangan analitis (Mettler Toledo AL204), seperangkat ekstraktor Soxhlet, *rotary evaporator* pengurangan tekanan, corong pisah, mantel pemanas, batu didih, pipet ukur 10 mL, pipet ukur 1 mL, gelas arloji, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, labu takar 10 mL, labu takar 100 mL, satu set ekstraktor Soxhlet padat – cair 500 ml, satu set distilasi biasa, Spektrofotomer UV-VIS shimadzu dan seperangkat alat KC-SM merk Shimadzu LC 10 AD-QP 8000.

3.3. Tahapan Penelitian

Tahapan kerja dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Preparasi bahan penelitian
2. Ekstraksi soxhlet daun sirih merah
3. Karakterisasi menggunakan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa (KC-SM)
4. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH
5. Analisis Data

3.4. Cara Kerja Penelitian

3.4.1. Preparasi bahan penelitian

Daun sirih merah dicuci bersih dan diangin-anginkan selama \pm 4-5 hari, kemudian dihaluskan sampai membentuk serbuk.

3.4.2. Ekstraksi Soxhlet daun sirih merah

Ditimbang sebanyak 80 gram daun sirih merah yang sudah berbentuk serbuk, ditempatkan di dalam kertas saring kemudian dijahit. Dimasukkan kertas saring yang berisi daun sirih merah tersebut ke dalam ekstraktor soxhlet 500 mL, kemudian dimasukkan pelarut metanol 700 mL kedalam labu alas bulat berukuran 1000 mL. Dimasukkan beberapa butir batu didih ke dalam labu alas bulat. Pendingin dipasang dan air pendingin dialirkan melalui kran/pompa. Labu alas bulat dipanaskan dengan menggunakan mantel pemanas. Dilakukan ekstraksi sampai terjadi paling sedikit 20 kali sirkulasi pelarut. Setelah itu dihentikan proses ekstraksi dan dipindahkan alat ekstraksi dari mantel pemanas, didiamkan cairan hingga menjadi dingin. Selanjutnya diambil cairan hasil ekstraksi dan disaring dengan penyaring vakum kemudian pelarut metanolnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pengurangan tekanan. Selanjutnya ekstrak metanol dialiri gas N_2 , dilakukan penguapan sampai pelarut metanol benar – benar keluar semua dengan ditimbang ekstrak hingga beratnya konstan. Setelah itu diambil ekstrak daun sirih merah yang diperoleh.

3.4.3. Identifikasi dengan KC-SM

Dipipet 20 μL ekstrak metanol daun sirih merah kemudian diinjeksikan ke dalam alat KC-SM merk Shimadzu LC 10 AD- QP 8000 dengan fase diam C_{18} (Kolom Shimadzu Shim-Pack VP ODS 250 x 4,6 mm) dengan kondisi operasional:

Detektor : PDA, UV 320 nm

Eluen : A. Air HPLC
B. Asetonitril

Gradien :

t (menit)	10	49	51	61
% A	90	60	90	90
% B	10	40	10	10

Kecepatan alir : 0,2 mL/menit

Detektor : spektrometer massa (m/z 100-800)

Jenis pengionan : *electrospray ionization* (ESI)

3.4.4. Uji Aktifitas Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Sebanyak 2 mg DPPH dilarutkan dengan metanol di dalam labu ukur sampai 100 ml sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 50 μM .

b. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Sebanyak 3,8 ml larutan DPPH 50 μM ditambahkan dengan 0,2 ml metanol. Setelah itu dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 - 800 nm.

c. Uji Aktivitas Antioksidan

Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dengan 10 ml metanol dalam labu ukur 10 ml, maka didapatkan konsentrasi 1 mg/ml. Kemudian lakukan pengenceran dengan menambahkan metanol sehingga diperoleh sampel dengan konsentrasi (10, 30, 50, 70, 90 $\mu\text{g/ml}$). Untuk penentuan aktivitas antioksidan masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,2 ml larutan sampel dengan pipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3,8 ml larutan DPPH 50 μM . Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap, serapan diukur dengan spektrofotometer UV - Vis pada panjang gelombang 515 nm. Sebagai pembanding digunakan asam askorbat (konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6 $\mu\text{g/ml}$) dengan perlakuan yang sama dengan sampel uji.

3.4.5. Analisis Data

Berdasarkan karakterisasi menggunakan KC-SM, akan diperoleh pola fragmentasi senyawa-senyawa dalam ekstrak metanol daun sirih merah, dan dengan melakukan interpretasi terhadap pola fragmentasi senyawa tersebut, dapat ditentukan hubungan pola fragmentasi dengan struktur senyawanya. Data absorbansi yang diperoleh menggunakan spektrofotometer UV-VIS setelah pengukuran absorbansi dengan metode DPPH digunakan untuk menentukan % efisiensi. Dari kurva % efisiensi terhadap konsentrasi sampel, dapat diperoleh nilai IC_{50} ekstrak dengan analisis statistik menggunakan regresi linear.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Preparasi Bahan

Pada preparasi bahan penelitian, daun sirih merah diangin-anginkan pada temperatur 25 °C untuk mencegah rusaknya senyawa yang termolabil. Pengeringan ini untuk mengurangi kadar air yang terdapat dalam daun sirih merah sehingga dengan berkurangnya kadar air pada proses ekstraksi soxhlet menggunakan metanol dapat berlangsung lebih optimal. Kemudian daun sirih merah dihancurkan hingga menjadi serbuk kasar supaya memperbesar luas permukaan sehingga hasil yang diperoleh lebih banyak.

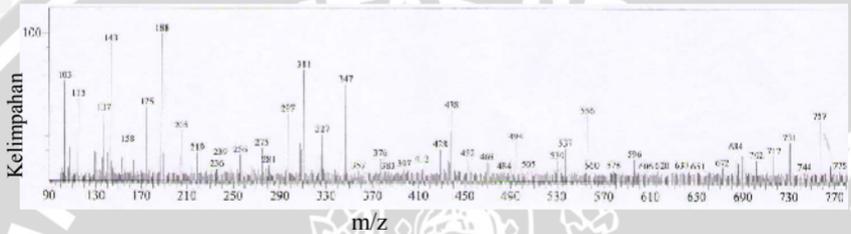
Ekstrak daun sirih merah diperoleh melalui metode ekstraksi soxhlet. Sebanyak 80 g serbuk daun sirih merah diekstraksi menggunakan pelarut metanol yang bersifat polar. Dalam hal ini dilakukan sebanyak 21 sirkulasi agar senyawa yang diinginkan dapat terpisahkan dari bahan sampelnya. Kemudian hasil ekstrak diuapkan menggunakan rotary evaporator pengurangan tekanan dan dilanjutkan dengan pengaliran N₂ untuk menghilangkan pelarut metanol yang terdapat pada ekstrak. Ekstrak daun sirih merah yang diperoleh adalah sebanyak 15,46 g atau dengan kata lain rendemen ekstrak daun sirih merah yang diperoleh adalah 19,33 % (dihitung dari berat serbuk daun sirih merah yang diekstraksi) (Lampiran L.4.2) Hasil dari ekstraksi berupa cairan berwarna hijau kehitaman.

4.2 Analisis Komponen Ekstrak Daun Sirih Merah Menggunakan KC-SM

Ekstrak daun sirih merah yang diperoleh dianalisis komponennya menggunakan KC-SM. Sebelum dilakukan analisis menggunakan Spektrometri Massa (SM), komponen-komponen di dalam ekstrak daun sirih merah dipisahkan menggunakan metode KC fase terbalik yang biasa digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa polar. Pada metode ini, fase gerak (asetonitril) bersifat polar sehingga senyawa yang lebih polar akan terelusi lebih dahulu bersama eluen dibandingkan senyawa yang kurang polar. Kromatogram KC ekstrak daun sirih merah disajikan pada lampiran L.5.1.

Berdasarkan kromatogram pada gambar pada Lampiran L.5.2, terdapat 3 komponen dengan konsentrasi tinggi. Hal ini ditunjukkan dengan nilai % absorbansi komponen tersebut yang tinggi, yaitu pada waktu retensi 19,781; 15,197 dan 15,961 menit.

Adapun hasil spektroskopi masa komponen ekstrak metanol daun sirih merah dengan waktu retensi 19,781 ditunjukkan pada gambar 4.1.

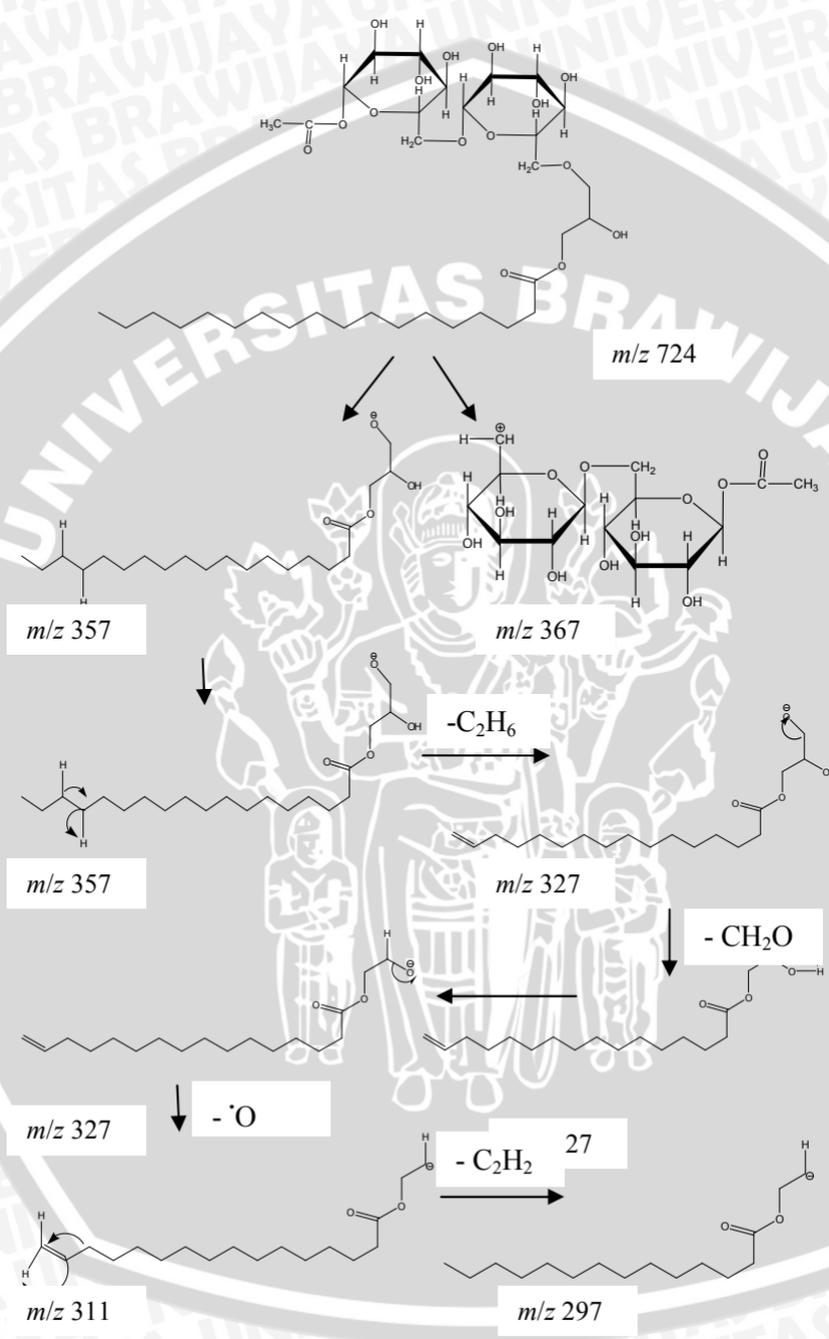


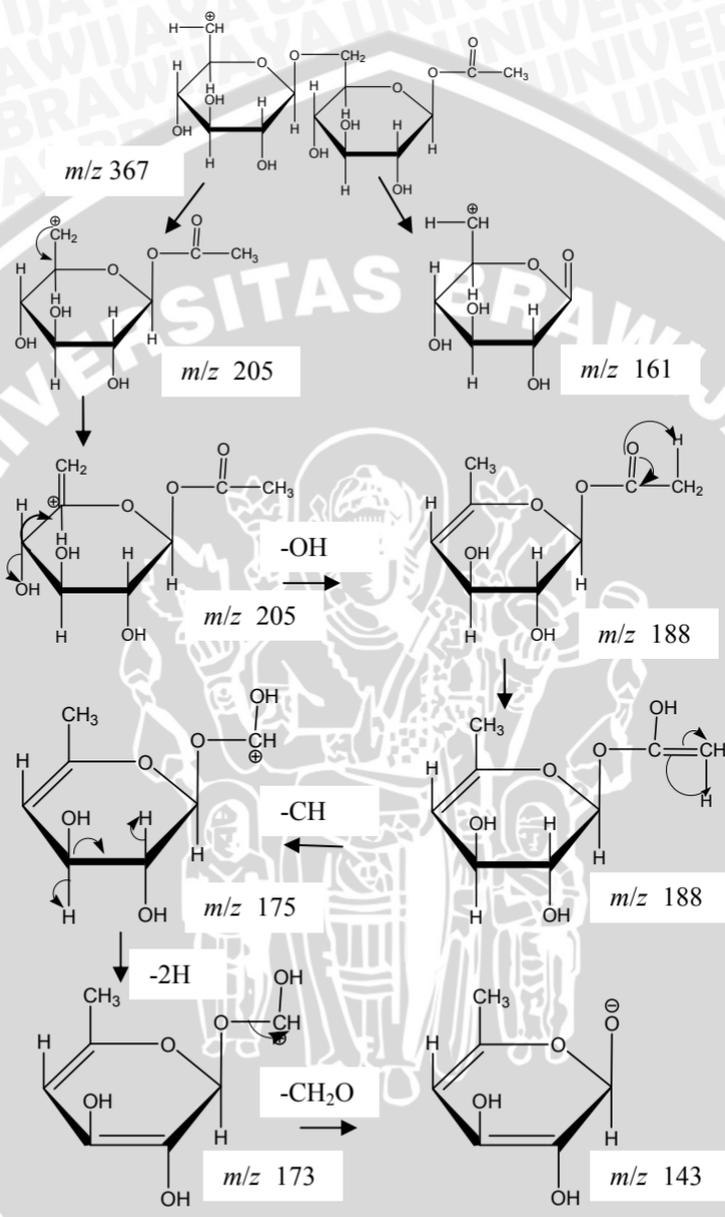
Gambar 4.1 spektrum massa komponen dengan waktu retensi 19,781

Hasil spektra massa menunjukkan puncak m/z 357 diperoleh setelah senyawa ditembak oleh elektron berenergi tinggi sehingga ikatan glikosida dalam senyawa tersebut terputus membentuk senyawa β -asetil maltosida dan ion asam oktadekanoat,2,3-bis(hidroksi) propil ester (M-367). Puncak m/z 327 dihasilkan dari pelepasan C_2H_6 (M-30) pada molekul asam oktadekanoat,2,3-bis(hidroksi) propil ester dan dilanjutkan dengan pelepasan molekul CH_2O (M-30) menghasilkan puncak m/z 297. Puncak m/z 281 dihasilkan dari pelepasan radikal O (M-16), sedangkan puncak m/z 256 diperoleh dari pelepasan molekul C_2H_2 (M-26).

Sedangkan puncak m/z 205 dihasilkan dari pelepasan molekul $C_6H_9O_5$ (M-161) pada glikosida β -asetil maltosida. Puncak m/z 188 dihasilkan dari pelepasan radikal OH (M-17), dilanjutkan dengan pelepasan CH (M-13) yang menghasilkan puncak m/z 175. Dan puncak m/z 143 dihasilkan dari pelepasan 2H (M-2) dilanjutkan dengan pelepasan CH_2O (M-32).

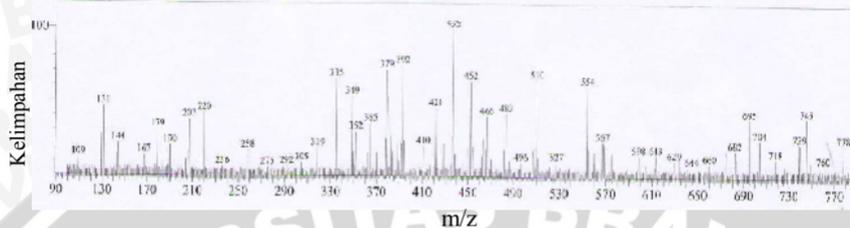
Berdasarkan pola fragmentasi tersebut diusulkan senyawa penyusun ekstrak daun sirih merah dengan waktu retensi 19,781 adalah senyawa asam oktadekanoat,2,3-bis(hidroksi)propil ester- β -asetil maltosida. Pola fragmentasi yang disarankan tersaji pada gambar 4.2.





Gambar 4.2 Pola fragmentasi komponen ekstrak metanol daun sirih merah pada waktu retensi 19,781

Hasil spektroskopi masa komponen ekstrak metanol daun sirih merah dengan waktu retensi 15,961 ditunjukkan pada gambar 4.3.

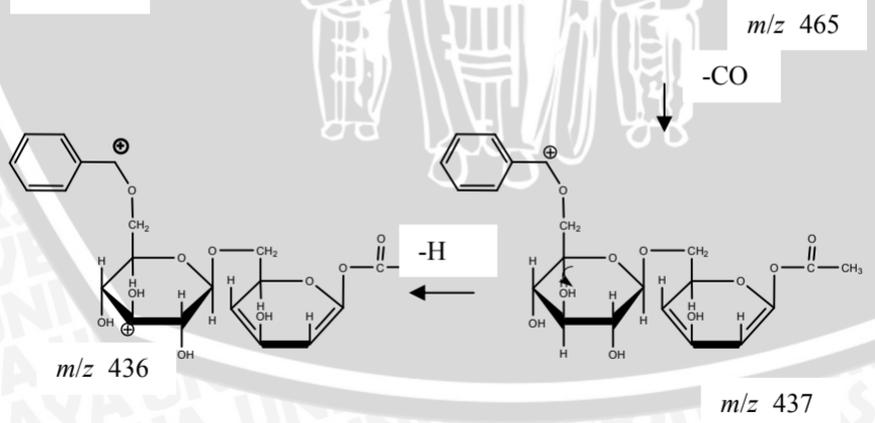
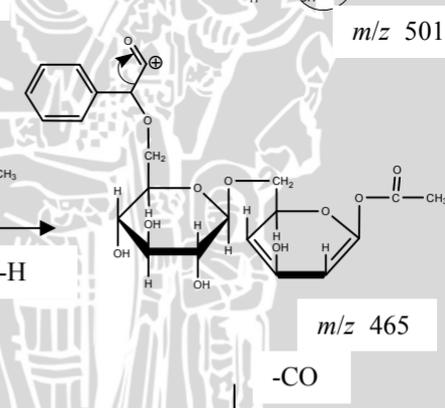
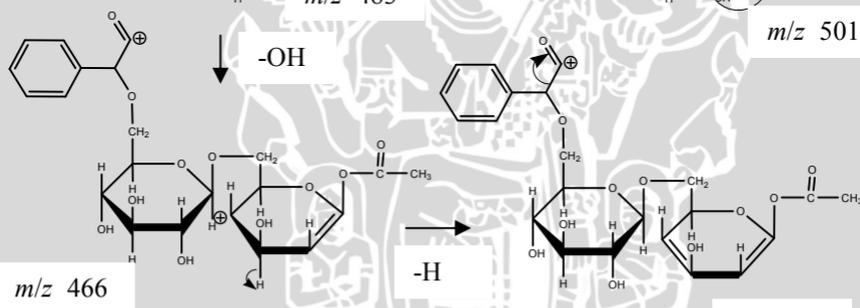
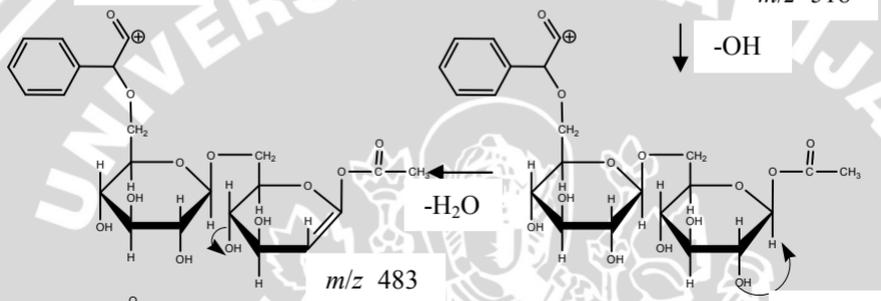
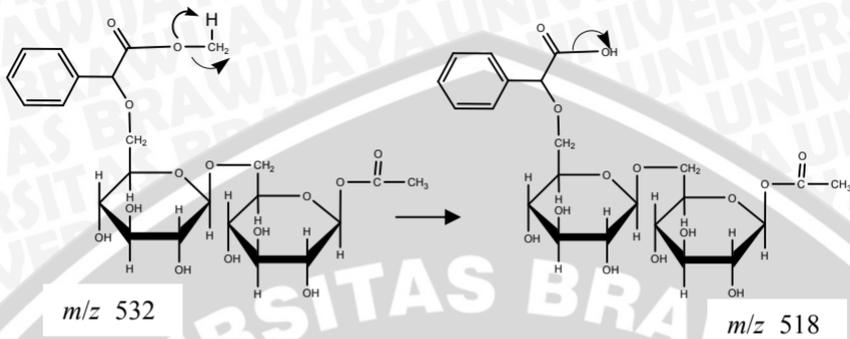


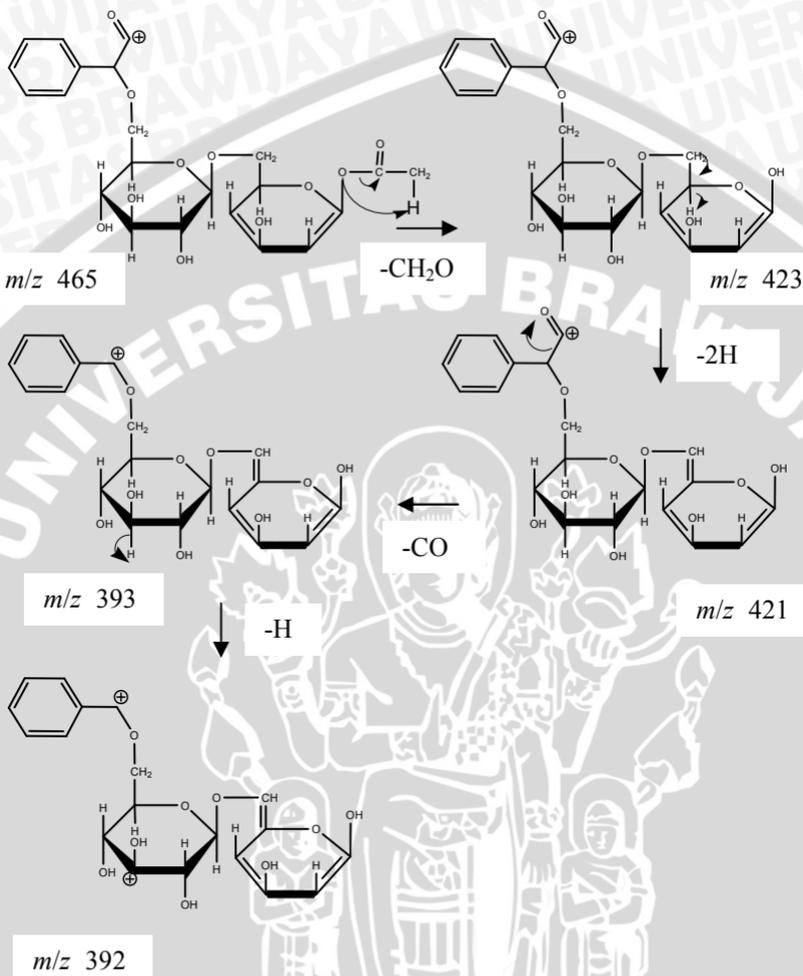
Gambar 4.3 spektrum massa komponen ekstrak daun sirih merah dengan waktu retensi 15,961

Spektra massa hasil analisis spektroskopi massa terhadap puncak senyawa dengan waktu retensi 15,961 menit disajikan pada gambar 4.3. Hasil spektra masa menunjukkan puncak-puncak seperti pada gambar. Puncak m/z 518 diperoleh setelah senyawa ditembak dengan electron berenergi tinggi sehingga terputusnya CH_2 (M-14) dan puncak m/z 483 diperoleh dari terputusnya OH (M-17) menghasilkan m/z 518 dilanjutkan dengan terputusnya satu molekul H_2O (M-18). Puncak m/z 466 diperoleh dari lepasnya hidroksil (M-17) dan puncak m/z 436 diperoleh dari terputusnya H (M-1) dan CO (M-28) dilanjutkan dengan terlepasnya H (M-14).

Selain pola fragmentasi tersebut, terdapat pola fragmentasi lain pada m/z 465 yang melepaskan CH_2O (M-32) dilanjutkan dengan terlepasnya 2 atom H menghasilkan m/z 421. Puncak m/z 492 diperoleh dari terlepasnya CO (M-28) menghasilkan m/z 493 dilanjutkan dengan terlepasnya H (M-1) menghasilkan m/z 492.

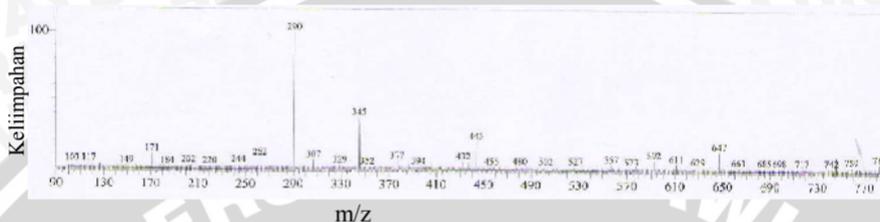
Berdasarkan pada pola fragmentasi tersebut dapat diusulkan bahwa senyawa penyusun ekstrak daun sirih merah dengan waktu retensi 15,961 menit adalah senyawa kavibetol asetat- β -asetil maltosida. Adapun pola fragmentasinya disajikan pada gambar 4.4.





Gambar 4.4 pola fragmentasi komponen ekstrak daun sirih merah dengan waktu retensi 15,961 menit

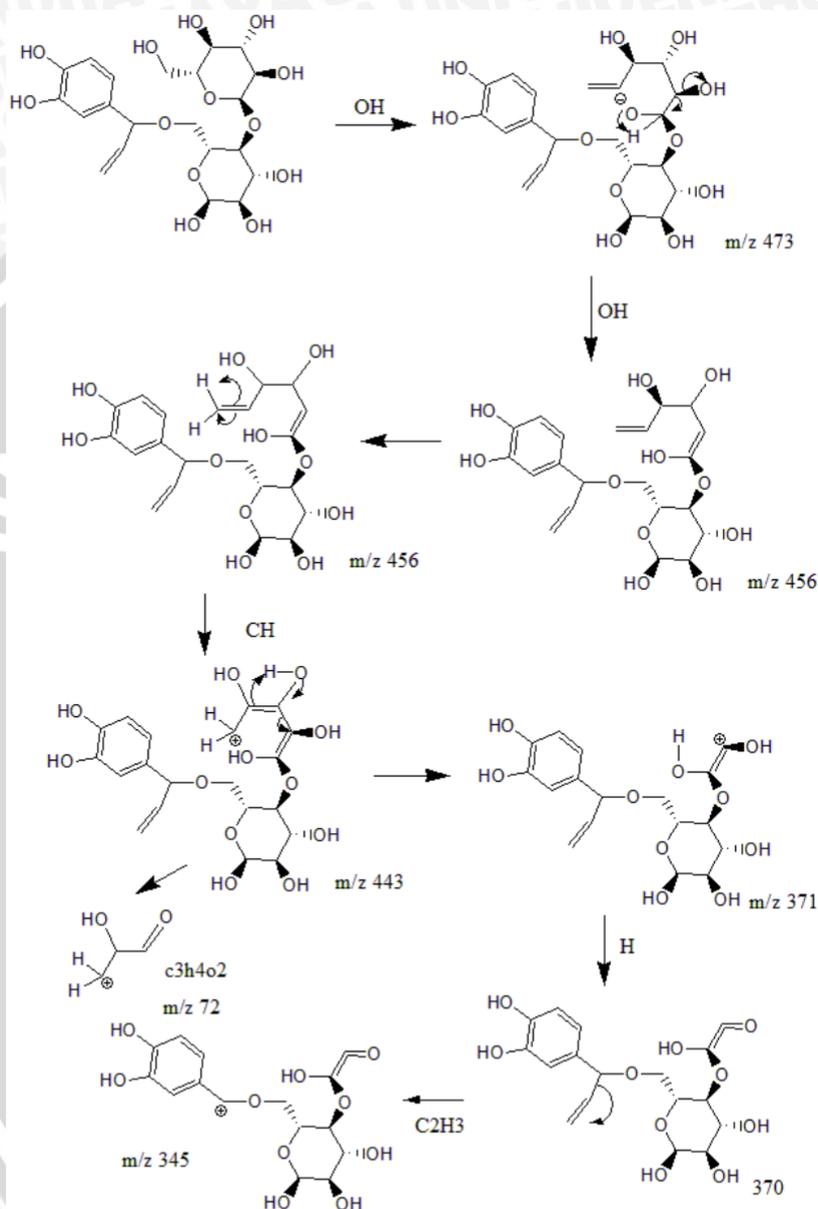
Spektra komponen dengan waktu retensi 15,197 ditunjukkan pada gambar 4.5.



Gambar 4.5 spektrum massa komponen ekstrak daun sirih merah dengan waktu retensi 15,197

Hasil spektra diatas menunjukkan puncak m/z 456, 443, 345, dan 290. Puncak m/z 456 dihasilkan dari pelepasan 2 molekul hidroksil secara radikal (M-34). Selanjutnya pada m/z 443 menunjukkan pelepasan molekul CH_2 (M-24). Kemudian pada m/z 345 menunjukkan lepasnya 3 molekul sekaligus yaitu $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$ (M-72) satu atom H (M-1) dan C_2H_3 (M-27). Dan pada m/z 290 menunjukkan pelepasan molekul $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}$ (M-55).

Berdasarkan pola fragmentasi diatas maka dapat di usulkan senyawa penyusun daun sirih merah dengan waktu retensi 15,197 menit adalah hidroksikavikol dengan maltosida sebagai glukosidanya dengan berat molekul 490 . Berikut merupakan mekanisme pola fragmentasi yang terjadi pada komponen dengan waktu retensi 15,197 menit.



Gambar 4.6 Pola fragmentasi komponen ekstrak metanol daun sirih merah pada waktu retensi 15,197

4.3 Uji Aktivitas sebagai antioksidan

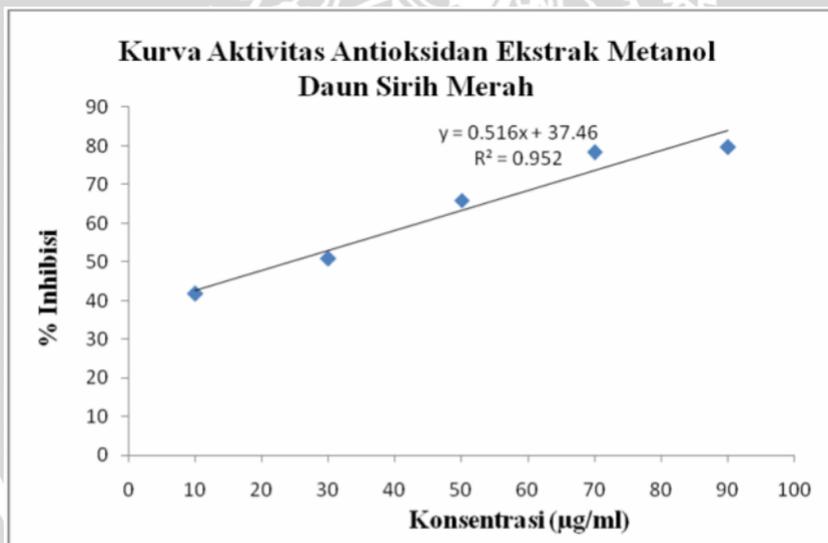
Metoda yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metoda serapan radikal DPPH karena merupakan metoda yang sederhana, mudah, dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat (Hanani, E,2005). Pengukuran aktivitas antioksidan sampel dilakukan pada panjang gelombang 515 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum DPPH, dengan konsentrasi DPPH 50 μ M. Adanya aktivitas antioksidan dari sampel mengakibatkan perubahan warna pada larutan DPPH dalam metanol yang semula berwarna violet pekat menjadi kuning pucat. Aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol daun sirih merah ini dinyatakan dalam persentase inhibisinya terhadap radikal DPPH. Persentase inhibisi ini didapatkan dari perbedaan serapan antara absorbansi DPPH dengan absorbansi sampel yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % radikal bebas DPPH. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH terhadap ekstrak metanol pada konsentrasi 10, 30, 50, 70 dan 90 μ g/ml, diperoleh IC_{50} sebesar 24,30 μ g/ml lebih besar dari vitamin C yaitu 5,10 μ g/ml. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak dan vitamin C mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat karena mempunyai IC_{50} kurang dari 200 μ g/ml (Molyneux, 2004). Sehingga zat yang mengandung aktivitas antioksidan yang tinggi mempunyai nilai IC_{50} yang rendah.

Pengujian aktivitas antioksidan pada berbagai konsentrasi ternyata pada konsentrasi yang tertinggi menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi tetapi apabila dibandingkan dengan vitamin C, sampel mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih rendah. Hal ini dapat dikarenakan ekstrak metanol daun sirih merah masih terdapat campuran senyawa-senyawa selain senyawa fenolik.

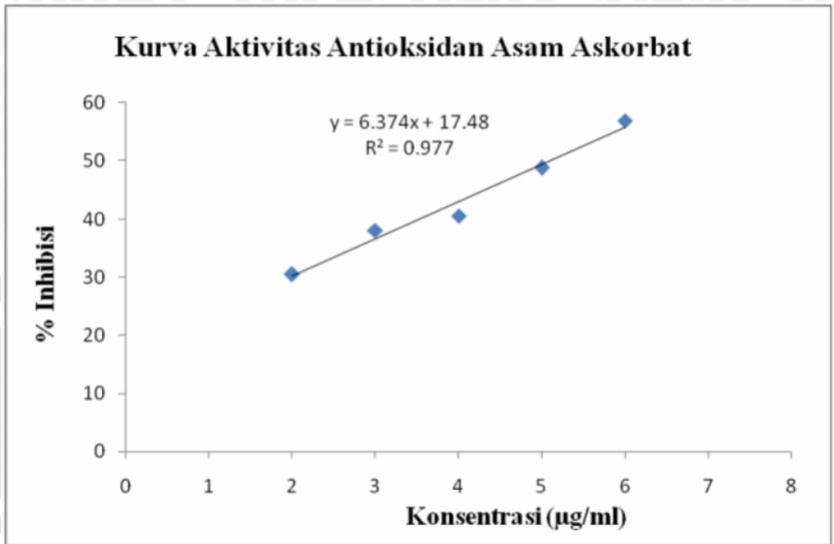
Efek antioksidan terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti flavonoid dan asam fenolat. Senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi orto dan para terhadap gugus -OH dan -OR.

Tabel 4.1 Aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun sirih merah dan vitamin C menggunakan metode DPPH

Pembanding	Konsentrasi (µg/ml)	A	% Inhibisi	IC ₅₀ (µg/ml)
Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah	10	0,1622	41,72	24,30
	30	0,1368	50,84	
	50	0,0947	65,97	
	70	0,0603	78,33	
	90	0,0566	79,66	
Vitamin C	2	0,1935	30,47	5,10
	3	0,1724	38,05	
	4	0,1653	40,60	
	5	0,1424	48,83	
	6	0,1198	56,95	



Gambar 4.7 Kurva aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun sirih merah



Gambar 4.8 Kurva aktivitas antioksidan asam askorbat

BAB V PENUTUP

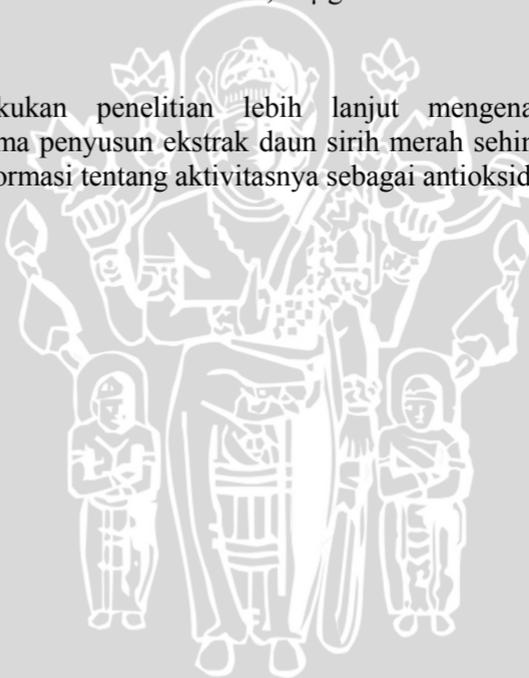
5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Komponen penyusun ekstrak methanol daun sirih merah diduga adalah hidoksikavikol- β -maltosida, asam oktadekanoat, 2,3-bis(hidroksi)propil ester- β -asetil maltosida, kavibetol asetat- β -asetil maltosida.
2. Ekstrak metanol daun sirih merah mempunyai aktivitas sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 24,30 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan vitamin C sebesar 5,10 $\mu\text{g/mL}$.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi komponen utama penyusun ekstrak daun sirih merah sehingga nanti didapatkan informasi tentang aktivitasnya sebagai antioksidan.



DAFTAR PUSTAKA

- Alberto, K., Gatchalian, M., and Ildefonso, E., 2009, **Qualitative Analysis**, www.scribd.com/doc/13569421/exp_8, diakses tanggal 28 Maret 2010
- Alfarabi, M., 2008, **Aktivitas Antioksidasi Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper Crocatum)**, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Anonymous, 2010, **Mass Spectrometry Ionization Methods, Department of Chemistry**, The University of Adelaide, Australia,
www.chemistry.adelaide.edu.au/external/socrel/content/ionizatn.htm, diakses tanggal 12 Januari 2010
- Atta-ur-Rahman dan M.I. Choudhary, 2001, **Bioactive Natural Products a Potential of Pharmacophores, A Theory of Memory**, *Pure Application. Chemistry*, 73, 555-560
- Ault, A., 1983, **Technique And Experiments For Organic Chemistry**, 4th Edition, Allyn & Bacon, Inc., Boston
- Braithwaite, A. and F. J. Smith, 1985, **Chromatographic Methods**, Chapman & Hall, England
- Buche, 1986, **Ilmu Pangan**, UI Press, Jakarta
- Dasuki, U., 1994, **Sistematika Tumbuhan Tinggi**, Universitas Bidang Ilmu Hayati. ITB, Bandung
- Fessenden & Fessenden, 1989, **Kimia Organik**, Jilid 1, Erlangga, Jakarta
- Furnish, B.S., 1989, **Vogel's Text Book of Practical Organic Chemistry**, 5th Edition, Longman Group Ltd., England
- Gritter, R. J., J. M. Bobbit, dan A. E. Schwarting, 1991, **Pengantar Kromatografi**, Edisi Kedua, Penerbit ITB, Bandung

Guenther, E., 1992, **The Essential Oil**, Van Nostrand Reinhold Company, New York

Gupte, S., 1990, **Mikrobiologi Dasar**, Binarupa Karya, Jakarta

Hanani, E, A. Mun'im, R. Sekarini, 2005, **Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons Callyspongia SP Dari Kepulauan Seribu**, Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol II, No 3 (2005). Hal 127-133

Harborne, J. B., 1987, **Metode Fitokimia**, ITB, Bandung.

Ilham Kunchahyo, S., 2007, **Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi*, l.) Terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazyl (DPPH)**, Seminar Nasional Teknologi, Yogyakarta, hlm 1-9.

Khan, Z., F., and Saeed, A., M., 1998, **Phytochemical And Antimicrobial Studies Of *Salvia Splendens* Sello**, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 11(2), pp.13-21

Khopkar, S. M., 2002, **Konsep Dasar Kimia Analitik**, UI Press, Jakarta

Maisuthisakul, P., 2008, **Phenolic antioxidants from Betel Leaf (*Piper betel* Linn.) extract obtained with different solvents and extraction time**, Univ, Thai Chamber of Commerce

Mardiana, L., 2004, **Kanker pada Wanita : Pencegahan dan Pengobatan dengan Tanaman Obat**, Penebar Swadaya, Jakarta.

Markham, K. R., 1988, **Cara Mengidentifikasi Flavonoid**, Alih Bahasa: Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung

Mc. Kabe, 1990, **Operation Technical Chemistry**, 4th Edition, Van Nonstrand Reinhold Co., New York

Molyneux, P., 2004, **The Use of The Stable Free Radical Diphenyl Picrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity**, Journal Science Technology

Nalina, T. and Z.H.A. Rahim, 2007, **The Crude Aqueous Extract of *Piper betle* L. and its Antibacterial Effect Towards *Streptococcus mutans***, American Journal of Biotechnology and Biochemistry, Vol. 3(1), pp. 10-15

Parker, S., P., 1993, **Encyclopedia of Chemistry**, Mc. Graw Hill Inc., New York

Prakash, A., 2001, **Antioxidant Activity**, Medallion Laboratories : Analithical Progres Vol 19 No : 2. 1 – 4

Robinson, T., 1991, **Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi**, Edisi ke - 6, a.b.Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung

Sastrohamidjojo, H., 1991, **Spektroskopi**, Penerbit Liberty, Yogyakarta

Sholikhah, A., 2009, **Sirih Merah Menurunkan Glukosa Darah**. <http://www.pustakatani>, diakses tanggal : 10 Oktober 2010

Sudewo, B., 2005, **Basmi Penyakit dengan Sirih Merah**, PT. AgroMedia Pustaka, Jakarta.

Syarief, E. 2006. **Resep sirih Wulung untuk Putih Merona Hingga Kanker Ganas**, dalam Majalah Trubus No.434, tahun XXXVII Januari 2006, hlm 88.

Wagaw, S., J. Tedrow, T. Grieme, L. Bavda, W. Wang, S. Viswanath, D. Barnes, and M. McLaughlin, **HPLC Guide**, http://chemgroups.northwestern.edu/scheidt/PDFs/HPLC_guide.pdf, diakses tanggal 11 September 2010

Wilson, C. O. and O. Gisvold, 1962, **Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, J. B. Lippincott Company, USA

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN

LAMPIRAN 1

DIAGRAM ALIR TAHAPAN PENELITIAN



LAMPIRAN 2



UNIVERSITAS GADJAH MADA FAKULTAS BIOLOGI

LABORATORIUM TAKSONOMI TUMBUHAN

Jl. Teknika Selatan Sekip Utara Yogyakarta 55281, Telp. (0274) 649277/6492262; Fax. (0274) 580839

SURAT KETERANGAN

Nomer : 0111 / T.Tb. / XI / 2007

Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi UGM, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa :

Nama : Suratmo
NIM : 24189/1-4/1962/06
Jurusan : Ilmu-Ilmu MIPA Program Pascasarjana
Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

telah melakukan identifikasi tumbuhan dengan hasil sebagai berikut :

Familia : Piperaceae
Genus : *Piper*
Spesies : *Piper crocatum* Ruiz & Pav.
Nama Lokal : Sirih Merah

identifikasi tersebut dibantu oleh Dra. Slamet Sutanti Budi Rahayu, M.Sc.
Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperfunya.

Yogyakarta, 28 November 2007

Mengetahui,
Dekan Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada



Dr. Siti Sumarni
NIP. 131860991

Kepala Laboratorium
Taksonomi tumbuhan
Fakultas Biologi UGM

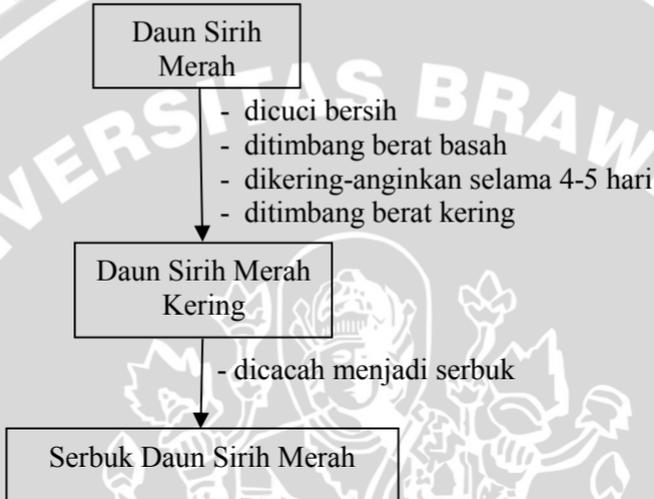
Dr. Rina Sri Kastamandari
NIP. 132086688

LAMPIRAN 3

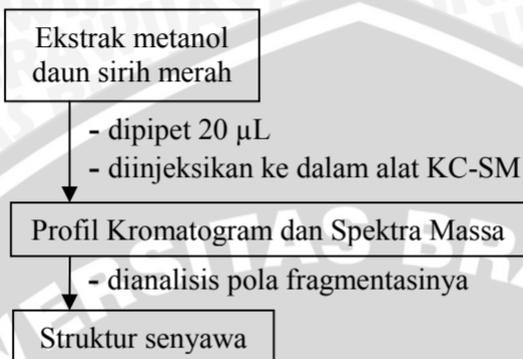
SKEMA KERJA

L.3.1 Preparasi Bahan Penelitian

L.3.1.1 Preparasi Daun Sirih Merah

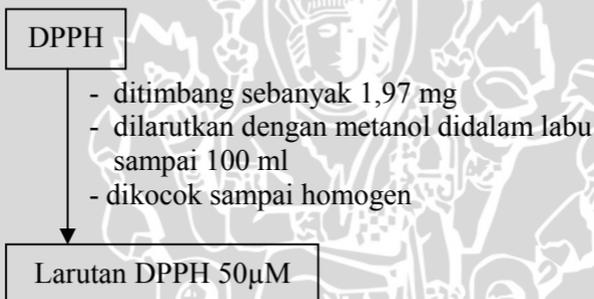


L.3.2 Identifikasi Menggunakan KC-SM

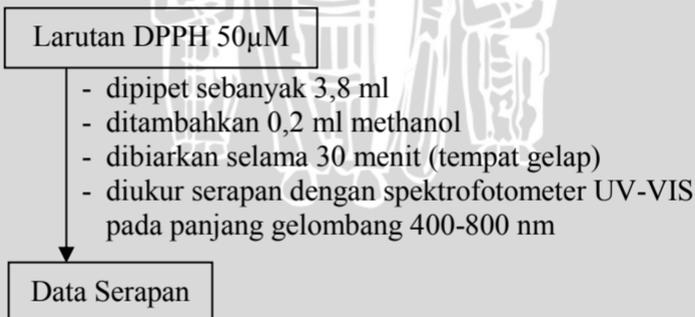


L.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan

L.3.3.1 Pembuatan Larutan DPPH 50 μM



L.3.3.2 Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maks DPPH



L.3.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah

- ditimbang sebanyak 10 mg
- dilarutkan dengan 10 mL metanol dalam labu ukur 10 mL (konsentrasi 1mg/ml)
- dilakukan pengenceran dengan menambahkan metanol sehingga diperoleh sampel dengan konsentrasi (10, 30, 50, 70 dan 90 $\mu\text{g/ml}$)
- masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,2 mL larutan sampel
- ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 50 μM
- dihomogenkan
- dibiarkan selama 30 menit (tempat gelap)
- serapan diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada $\lambda = 515 \text{ nm}$
- sebagai pembanding digunakan asam askorbat (konsentrasi 2, 3, 4, 5 dan 6 $\mu\text{g/ml}$) dengan perlakuan yang sama dengan sampel uji

Data Serapan

LAMPIRAN 4

PERHITUNGAN

L.4.1 Perhitungan Kadar Air dalam Daun Sirih Merah Setelah Pengeringan 4-5 hari

No	Penimbangan	Massa (g)
1	Daun Sirih merah basah	1378,39
2	Daun sirih merah yang telah dikering-anginkan 4-5 hari	374,29

Perhitungan kadar air dalam daun sirih merah

$$\begin{aligned}\text{Kadar air} &= \frac{\text{Massa DSM basah} - \text{massa DSM setelah pengeringan}}{\text{Massa DSM basah}} \times 100\% \\ &= \frac{1378,39 \text{ g} - 374,29 \text{ g}}{1378,39 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 72,85\%\end{aligned}$$

L.4.2 Perhitungan Rendemen Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{Massa Ekstrak metanol DSM}}{\text{Massa serbuk DSM yang diekstraksi}} \times 100\% \\ &= \frac{15,46 \text{ g}}{80 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 19,33\%\end{aligned}$$

Keterangan: DSM = Daun Sirih Merah

L.4.3 Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah Konsentrasi 1mg/mL

$$\begin{aligned} \text{Larutan Ekstrak 1mg/mL} &= \frac{\text{Massa Ekstrak}}{\text{Volume Metanol}} \\ &= \frac{10 \text{ mg Ekstrak}}{10 \text{ mL Metanol}} \end{aligned}$$

L.4.4 Perhitungan Pembuatan Variasi Konsentrasi Dari 1 mg/mL Ekstrak Daun Sirih Merah

L.4.4.1 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah Konsentrasi 10 µg/mL

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 10 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mL} \times 10 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL}}{1 \text{ mg/mL}}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ mL}$$

L.4.4.2 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah Konsentrasi 30 µg/mL

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 30 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mL} \times 30 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL}}{1 \text{ mg/mL}}$$

$$V_1 = 0,3 \text{ mL}$$

L.4.4.3 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah Konsentrasi 50 µg/mL

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 50.10^{-3} \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mL} \times 50.10^{-3} \text{ mg/mL}}{1 \text{ mg/mL}}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

L.4.4.4 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah Konsentrasi 70 µg/mL

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 70.10^{-3} \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mL} \times 70.10^{-3} \text{ mg/mL}}{1 \text{ mg/mL}}$$

$$V_1 = 0,7 \text{ mL}$$

L.4.4.5 Perhitungan Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Sirih Merah Konsentrasi 90 µg/mL

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 90.10^{-3} \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mL} \times 90.10^{-3} \text{ mg/mL}}{1 \text{ mg/mL}}$$

$$V_1 = 0,9 \text{ mL}$$

L.4.5 Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 1mg/mL

$$\begin{aligned} \text{Larutan Asam Askorbat} &= \frac{\text{Massa Asam Askorbat}}{\text{Volume Metanol}} \\ 1\text{mg/mL} &= \frac{10 \text{ mg Asam Askorbat}}{100 \text{ mL Metanol}} \end{aligned}$$

L.4.6 Perhitungan Pembuatan Variasi Konsentrasi Dari 1 mg/mL Asam Askorbat

L.4.6.1 Perhitungan Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 2 µg/mL

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 2 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mL} \times 2 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL}}{1 \text{ mg/mL}}$$

$$V_1 = 0,02 \text{ mL}$$

L.4.6.2 Perhitungan Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 3 µg/mL

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 3 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mL} \times 3 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL}}{1 \text{ mg/mL}}$$

$$V_1 = 0,03 \text{ mL}$$

L.4.6.3 Perhitungan Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 4 µg/mL

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 4.10^{-3} \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mL} \times 4.10^{-3} \text{ mg/mL}}{1 \text{ mg/mL}}$$

$$V_1 = 0,04 \text{ mL}$$

L.4.6.4 Perhitungan Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 5 µg/mL

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 5.10^{-3} \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mL} \times 5.10^{-3} \text{ mg/mL}}{1 \text{ mg/mL}}$$

$$V_1 = 0,05 \text{ mL}$$

L.4.6.5 Perhitungan Pembuatan Larutan Asam Askorbat Konsentrasi 6 µg/mL

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1 \text{ mg/mL} = 10 \text{ mL} \times 6.10^{-3} \text{ mg/mL}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mL} \times 6.10^{-3} \text{ mg/mL}}{1 \text{ mg/mL}}$$

$$V_1 = 0,06 \text{ mL}$$

L.4.7 Perhitungan % Inhibisi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah Menggunakan Metode DPPH

L.4.7.1 Nilai % Inhibisi Untuk Ekstrak dengan Konsentrasi 10 µg/mL

$$\begin{aligned}\% \text{ Inhibisi} &= \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2783 - 0,1622}{0,2783} \times 100\% \\ &= 41,72\%\end{aligned}$$

L.4.7.2 Nilai % Inhibisi Untuk Ekstrak dengan Konsentrasi 30 µg/mL

$$\begin{aligned}\% \text{ Inhibisi} &= \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2783 - 0,1368}{0,2783} \times 100\% \\ &= 50,84\%\end{aligned}$$

L.4.7.3 Nilai % Inhibisi Untuk Ekstrak dengan Konsentrasi 50 µg/mL

$$\begin{aligned}\% \text{ Inhibisi} &= \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2783 - 0,0947}{0,2783} \times 100\% \\ &= 65,97\%\end{aligned}$$

L.4.7.4 Nilai % Inhibisi Untuk Ekstrak dengan Konsentrasi 70 µg/mL

$$\begin{aligned}\% \text{ Inhibisi} &= \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2783 - 0,0603}{0,2783} \times 100\% \\ &= 78,33\%\end{aligned}$$

L.4.7.5 Nilai % Inhibisi Untuk Ekstrak dengan Konsentrasi 90 µg/mL

$$\begin{aligned}\% \text{ Inhibisi} &= \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2783 - 0,0566}{0,2783} \times 100\% \\ &= 79,66\%\end{aligned}$$

L.4.8 Perhitungan % Inhibisi Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat Menggunakan Metode DPPH

L.4.8.1 Nilai % Inhibisi Untuk Asam Askorbat dengan Konsentrasi 2 µg/mL

$$\begin{aligned}\% \text{ Inhibisi} &= \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2783 - 0,1935}{0,2783} \times 100\% \\ &= 30,47\%\end{aligned}$$

L.4.8.2 Nilai % Inhibisi Untuk Asam Askorbat dengan Konsentrasi 3 µg/mL

$$\begin{aligned}\% \text{ Inhibisi} &= \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2783 - 0,1724}{0,2783} \times 100\% \\ &= 38,05\%\end{aligned}$$

L.4.8.3 Nilai % Inhibisi Untuk Asam Askorbat dengan Konsentrasi 4 µg/mL

$$\begin{aligned}\% \text{ Inhibisi} &= \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2783 - 0,1653}{0,2783} \times 100\% \\ &= 40,60\%\end{aligned}$$

L.4.8.4 Nilai % Inhibisi Untuk Asam Askorbat dengan Konsentrasi 5 µg/mL

$$\begin{aligned}\% \text{ Inhibisi} &= \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2783 - 0,1424}{0,2783} \times 100\% \\ &= 48,83\%\end{aligned}$$

L.4.8.5 Nilai % Inhibisi Untuk Asam Askorbat dengan Konsentrasi 6 µg/mL

$$\begin{aligned}\% \text{ Inhibisi} &= \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2783 - 0,1198}{0,2783} \times 100\% \\ &= 56,95\%\end{aligned}$$

L.4.9 Nilai IC₅₀ (µg/mL) Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah

Pada uji aktivitas antioksidan metode DPPH ini, digunakan ekstrak dengan variasi konsentrasi sebesar 10, 30, 50, 70, dan 90 µg/mL. Variasi konsentrasi tersebut masing-masing diukur absorbansinya pada $\lambda = 515 \text{ nm}$. Data absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menentukan % inhibisi. Dari kurva % inhibisi terhadap konsentrasi, dapat diperoleh nilai IC₅₀ ekstrak dengan analisis statistik menggunakan regresi linear sebagai berikut:

$$\begin{aligned}y &= ax + b \\ y &= 0,516x + 37,46 \\ 50 &= 0,516x + 37,46 \\ 12,54 &= 0,516x \\ x &= \frac{12,54}{0,516} \\ x &= 24,30 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

L.4.10 Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) Asam Askorbat (Vitamin C)

Pada uji aktivitas antioksidan metode DPPH ini, sebagai pembanding digunakan asam askorbat dengan variasi konsentrasi sebesar 2, 3, 4, 5, dan 6 $\mu\text{g/mL}$. Variasi konsentrasi tersebut masing-masing diukur absorbansinya pada $\lambda = 515 \text{ nm}$. Data absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menentukan % inhibisi. Dari kurva % inhibisi terhadap konsentrasi, dapat diperoleh nilai IC_{50} asam askorbat dengan analisis statistik menggunakan regresi linear sebagai berikut:

$$y = ax + b$$

$$y = 6,374x + 17,48$$

$$50 = 6,374x + 17,48$$

$$32,52 = 6,374x$$

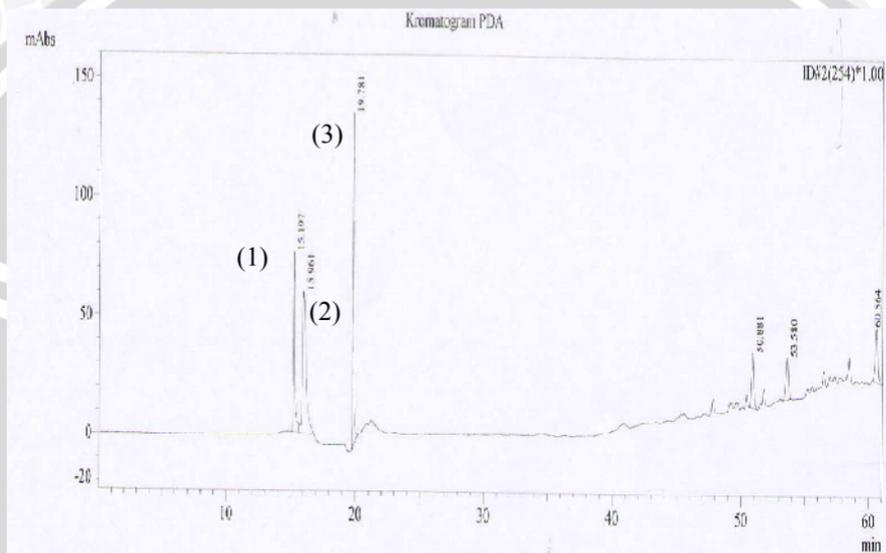
$$x = \frac{32,52}{6,374}$$

$$x = 5,1 \mu\text{g/mL}$$

LAMPIRAN 5

HASIL ANALISIS EKSTRAK METANOL DAUN SIRIH MERAH MENGGUNAKAN KC-SM

L.5.1 Kromatogram KC

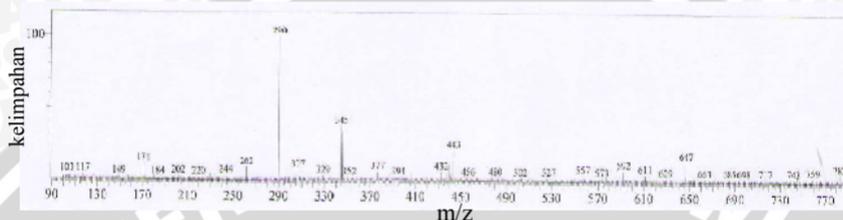


L.5.2 Data Hasil Analisis Senyawa Menggunakan KC

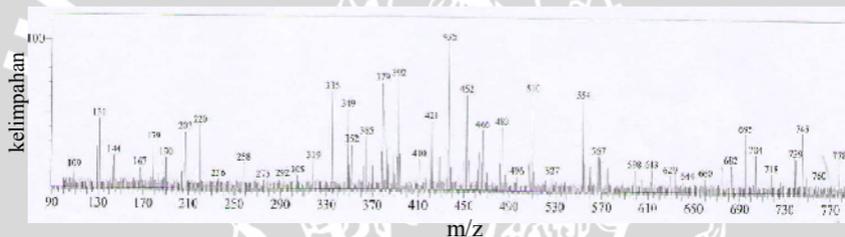
No Puncak	Waktu Retensi (menit)
1	15,197
2	15,961
3	19,781

L.5.3 Hasil Pindaian (Scan)

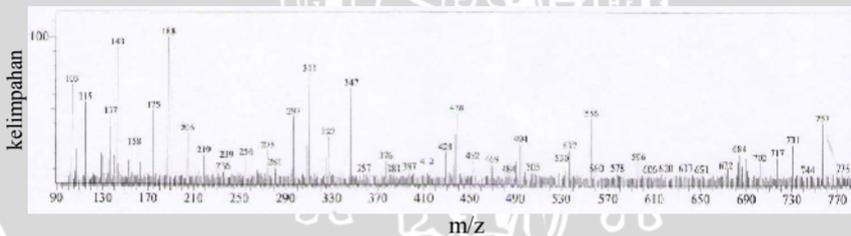
L.5.3.1 Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 15,197 menit (Puncak nomor 1)



L.5.3.2 Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 15,961 menit (Puncak nomor 2)



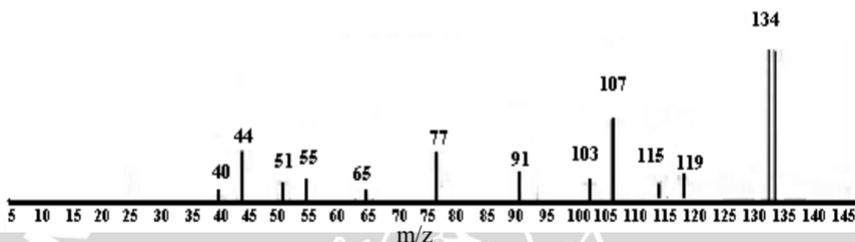
L.5.3.3 Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 19,781 menit (Puncak nomor 3)



LAMPIRAN 6

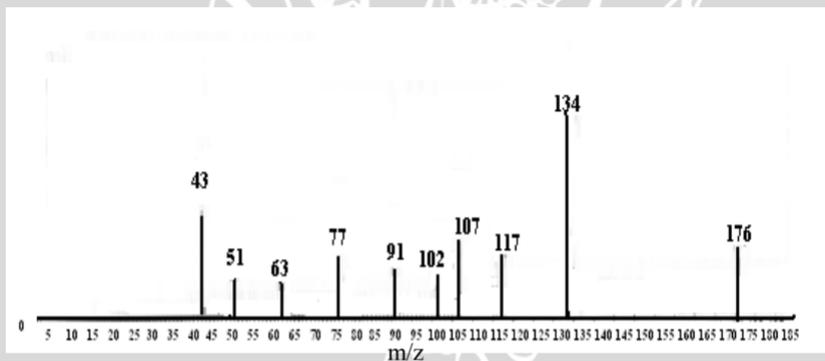
PUSTAKA SPEKTRUM MASSA KOMPONEN DALAM EKSTRAK METANOL DAUN SIRIH MERAH

L.6.1 Senyawa 4-alilfenol (kavikol)



Berat molekul : 134
Rumus molekul : $C_9H_{10}O$
Nama komponen : 4-Alilfenol
Pustaka : WILLEY7.LIB

L.6.2 Senyawa kavikol asetat

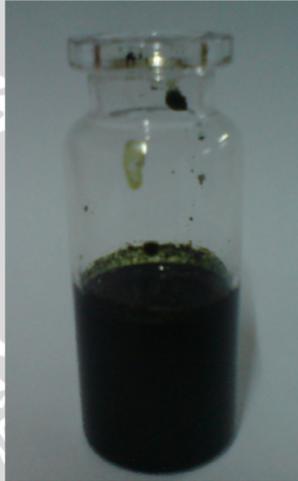


Berat molekul : 178
Rumus molekul : $C_{11}H_{14}O_2$
Nama komponen : kavikol asetat
Pustaka : WILLEY7.LIB

LAMPIRAN 7

FOTO – FOTO

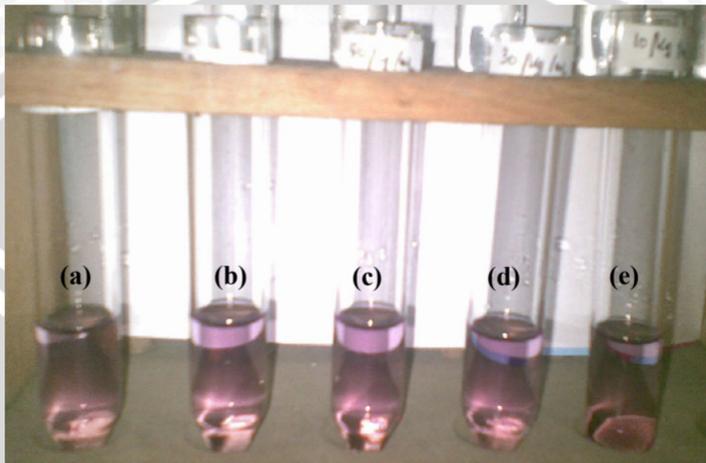
L.7.1 Foto Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah



L.7.2 Foto Alat KC-SM Merk Shimadzu LC 10 AD-QP 8000



L.7.3 Larutan Ekstrak dengan Berbagai Konsentrasi setelah Ditambahkan Larutan DPPH



Keterangan : Konsentrasi (a) 90 $\mu\text{g/mL}$, (b) 70 $\mu\text{g/mL}$, (c) 50 $\mu\text{g/mL}$, (d) 30 $\mu\text{g/mL}$ dan (e) 10 $\mu\text{g/mL}$