

BAB II

KAJIAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS PENELITIAN

A. Kajian Pustaka

1. Klasifikasi Sirih Merah

Tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) adalah satu spesies dari famili Piperaceae, yang dikenal memiliki berbagai senyawa metabolit sekunder, seperti fenolik, flavonoid, dan minyak atsiri. Sirih merah dapat di klasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Piperales

Famili : Piperaceae (sirih-sirihan)

Genus : *Piper*

Spesies : *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

Penetapan klasifikasi ini juga digunakan dalam penelitian fitokimia dan farmakologi yang menyelidiki sifat antioksidan, antimikroba, dan antidiabetes sirih merah (Parfati *et al.*, 2016). Genus *Piper* memiliki lebih dari 1000 spesies yang memiliki karakter morfologi yang saling mirip, mengenali taksonomi yang tepat sangat penting untuk mencegah kesalahan spesies (Nugroho, 2017).

2. Morfologi Daun Sirih Merah

Pengamatan morfologi menunjukkan bahwa tanaman sirih merah memiliki karakteristik morfologi yaitu merupakan tanaman merambat dengan

tinggi 1-7 meter. Akar tanaman berbentuk bulat dan berwarna coklat kekuningan. Batangnya berbentuk bulat, bersulur, beruas, memiliki akar udara, bertekstur halus, dan berwarna hijau keunguan dengan jarak antara ruas sekitar 5-9 cm. Daun sirih merah merupakan daun tunggal dengan tata letak berseling, bentuk helaian daun bulat telur. Helaian daun memiliki panjang 8-16 cm dan lebar 5-10 cm. Ujung daun meruncing, pangkal daun membulat, pertulangan daun melengkung, serta tepi daun rata. Warna permukaan atas daun adalah hijau bercorak putih keabu-abuan, sedangkan warna permukaan bawah daun ungu. Tekstur permukaan atas daun mengkilap dan permukaan bawah halus. Tekstur tangkai daun halus dengan panjang 6,5-8 cm. Daun mengeluarkan aroma yang kuat (Parfati *et al.*, 2016).



Gambar 2. 1 Daun sirih merah, madiun jawa timur (2025)

3. Kandungan Metabolit Sekunder

Daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) memiliki berbagai senyawa sekunder yang bisa berfungsi sebagai antioksidan. Senyawa antioksidan tersebut mencakup beberapa jenis seperti turunan fenolat, yaitu flavonoid diketahui memiliki manfaat dalam bidang farmakologis, seperti mampu mengurangi peradangan, membunuh bakteri, dan berperan sebagai

antioksidan (Ronaldo *et al.*, 2024). Untuk mendapatkan dan memperoleh senyawa aktif biologis tersebut secara optimal, diperlukan proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang tepat. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak daun sirih merah dengan pelarut etanol 70% menghasilkan total fenol sebesar 157,61 mg GAE/g dan total flavonoid sebesar 168,33 mg QE/g (Prayitno *et al.*, 2018).

4. Khasiat dan Kegunaan

Sirih merah mengandung antioksidan. Senyawa antioksidan berasal dari adanya berbagai senyawa aktif yang terkandung di dalamnya, seperti flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin (Ronaldo *et al.*, 2024). Senyawa flavonoid memiliki sifat antioksidan, antidiabetik, antikanker, antiseptik, serta antiinflamasi (Nugroho, 2017). Hal tersebut dapat menjadi alasan penggunaan daun sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai bahan baku obat tradisional bagi masyarakat. Daun sirih merah memiliki senyawa seperti flavanoid, saponin, tanin, serta minyak atsiri. Senyawa-senyawa itu memiliki fungsi untuk mencegah kejang, membunuh kuman, mengurangi rasa sakit, dan mengurangi pembengkakan. Selain metabolit sekunder seperti flavonoid dan tanin dengan sifat antioksidan nya, daun sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) sudah lama digunakan dalam tradisi sebagai bahan untuk beberapa kondisi Kesehatan, seperti antiseptik, bahan untuk menurunkan tekanan darah, dan bantuan dalam mengatasi diabetes karena kandungan fitokimianya yang beragam (Azizah *et al.*, 2021) & (Yunus *et al.*, 2023).

5. Antioksidan

Antioksidan merupakan molekul yang berperan dalam menghambat atau memperlambat proses oksidasi dengan menetralkan radikal bebas atau spesies reaktif lainnya, walaupun jumlahnya lebih kecil dibandingkan dengan senyawa yang mengalami oksidasi (Isabel *et al.*, 2021, hlm1-2). Antioksidan merupakan senyawa spesies yang berfungsi menjaga keseimbangan redoks dengan cara menetralkan spesies oksigen reaktif (ROS) dan radikal bebas yang muncul akibat proses metabolisme seluler serta interaksi dengan lingkungan. Ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan mekanisme pertahanan antioksidan dapat menyebabkan stress oksidatif, yang memiliki peran krusial dalam munculnya berbagai penyakit degenerative seperti diabetes melitus, kanker, penyakit jantung, serta proses penuaan (Isabel *et al.*, 2021); (Novita Fajarwati *et al.*, 2023). Antioksidan berdasarkan asal atau sumbernya dikelompokkan menjadi dua kelompok utama.

Antioksidan endogen (seperti glutathione dan enzim superoksida dismutase) dan antioksidan eksogen (seperti suplemen atau makanan) adalah dua kelompok utama antioksidan. Antioksidan eksogen yang berasal dari sumber alami, terutama dari tumbuhan, menjadi semakin populer karena dianggap lebih aman dan tidak memiliki efek samping yang signifikan dibandingkan antioksidan sintetik (Kurutas, 2016). Terlepas dari sumbernya, efektivitas suatu senyawa sebagai antioksidan sangat ditentukan oleh mekanisme kerjanya dalam menetralkan spesies reaktif.

6. Mekanisme Antioksidan

Mekanisme kerja antioksidan sangat beragam, namun secara umum dapat dikelompokkan menjadi beberapa cara utama. Mekanisme pertama adalah melalui donasi atom hidrogen (HAT - *Hydrogen Atom Transfer*) atau donasi elektron (SET - *Single Electron Transfer*), yang langsung menetralkan radikal bebas dengan mengubahnya menjadi spesies yang stabil (Alisi *et al.*, 2020). Efektivitas suatu senyawa sebagai antioksidan sangat bergantung pada struktur kimianya, seperti keberadaan gugus hidroksil fenolik, sistem ikatan rangkap terkonjugasi, dan kemampuan untuk menstabilkan radikal yang terbentuk setelah mendonorkan elektron atau hidrogen (Kurutas, 2016). Selain mengatasi radikal bebas, antioksidan juga bisa mencegah munculnya spesies oksigen reaktif dengan cara menangkap ion logam transisi seperti Fe^{2+} , Cu^{2+} , dan Zn^{2+} yang bisa mempercepat pembentukan radikal bebas, proses ini membantu menjaga keseimbangan oksidasi-reduksi di dalam sel dan mengurangi stres oksidatif.

Sementara itu, sistem antioksidan berbasis enzim seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase berperan penting dalam menguraikan radikal oksigen reaktif (ROS) agar tidak merusak molekul-molekul biologis (Sguizzato *et al.*, 2021). Dalam penelitian bahan alam, pengukuran kapasitas antioksidan menjadi parameter penting untuk mengevaluasi potensi kemanfaatannya. Pengujian ini umumnya dilakukan secara *in vitro* dengan berbagai metode spektrofotometri, seperti DPPH, ABTS, dan FRAP, yang masing-masing merepresentasikan mekanisme kerja yang berbeda. Penggunaan kombinasi dari beberapa metode sangat dianjurkan untuk

mendapatkan pemahaman yang lebih mendalam tentang profil antioksidan dari suatu ekstrak (Munteanu, IG & Apetrei, 2021).

7. Senyawa Fenolik dan Flavonoid sebagai Antioksidan Alami

Aktivitas antioksidan senyawa fenolik dan flavonoid secara intrinsik ditentukan oleh struktur molekulnya. Efektivitasnya terutama bergantung pada jumlah dan posisi gugus hidroksil (-OH) fenolik, keberadaan sistem ikatan rangkap terkonjugasi, serta substitusi pada cincin aromatik (Gülçin, 2025). Sebagai contoh, flavonoid yang memiliki kelompok orto-dihidroksi pada cincin B, seperti kuersetin dan katekin, menunjukkan kemampuan antioksidan yang lebih baik karena kelompok hidroksil di posisi tersebut meningkatkan kemampuan untuk memberi elektron dan membantu menstabilkan radikal bebas yang terbentuk melalui proses resonansi, dibandingkan dengan flavonoid yang tidak memiliki substitusi orto-dihidroksi pada cincin aromatiknya (Carrillo-Martinez *et al.*, 2024). Selain melalui penangkapan radikal bebas (radical scavenging) dan pendonoran elektron, senyawa fenolik juga dapat berperan sebagai pengkelat ion logam pro-oksidan seperti besi dan tembaga, sehingga mencegah inisiasi reaksi rantai oksidatif (Munteanu, IG & Apetrei, 2021). Oleh karena itu, keragaman struktur flavonoid dan senyawa fenolik yang dilaporkan terkandung dalam daun sirih merah (*Piper crocatum*) diduga menjadi landasan kimiawi utama dari kapasitas antioksidannya yang telah terukur (Prayitno *et al.*, 2018).

8. Ekstraksi

Ekstraksi adalah cara untuk memisahkan bahan dengan memperhatikan perbedaan daya larut antara dua cairan yang tidak bisa bercampur. Biasanya metode ini menggunakan pelarut yang berbasis organik (Badaring *et al.*, 2020). Tujuan dari ekstraksi adalah untuk mendapatkan komponen kimia dari simplisia, dimana proses pemisahan ini melibatkan pergerakan massa komponen dari zat padat ke dalam pelarut, dimulai dari lapisan antar muka dan lalu berdifusi ke dalam pelarut (Hastriadi *et al.*, 2024).

Salah satu metode ekstraksi umum dipakai yaitu maserasi, ekstraksi secara dingin tanpa pemanasan atau dengan pemanasan rendah. Metode ini sesuai untuk mengambil senyawa aktif yang tahan panas (Chairunnisa *et al.*, 2022). Kelebihan dari maserasi terletak pada kesederhanaannya karena tidak memerlukan peralatan khusus dan dapat dilakukan dengan peralatan laboratorium dasar. Faktor yang perlu diperhatikan dalam maserasi adalah lama waktu ekstraksi, semakin Panjang durasi interaksi antara pelarut dan bahan, semakin banyak sel yang rusak dan senyawa aktif yang berhasil diambil hingga tercapai keseimbangan konsentrasi di antara bahan dan pelarut (Fahiroh *et al.*, 2025).

Dalam penelitian ini, Ekstraksi senyawa fitokimia dari serbuk daun dilakukan dengan teknik maserasi menggunakan etanol 70% untuk pelarut. Bahan kasar dimasukkan ke dalam pelarut dengan rasio tertentu, kemudian diaduk dan dibiarkan berkontak selama waktu tertentu hingga senyawa aktif larut ke dalam pelarut. Beberapa faktor seperti jenis pelarut, konsentrasi pelarut, dan lama perendaman memengaruhi efisiensi proses ekstraksi. Setelah

proses perendaman selesai, filtrat dipisahkan dari sisa bahan, lalu pelarut dikurangi menggunakan alat seperti rotary evaporator untuk mendapatkan ekstrak yang pekat dan siap dianalisis (Fahiroh *et al.*, 2025)

9. Metode Penguji Antioksidan

Salah satu langkah penting dalam mengevaluasi potensi senyawa atau ekstrak bahan alam adalah pengukur aktivitas antioksidan secara *in vitro*. Berbagai metode telah diciptakan dikategorikan berdasarkan mekanisme kerjanya. Salah satu contohnya adalah kemampuan untuk mengambil radikal bebas. Karena setiap metode memiliki prinsip, sensitivitas dan keterbatasan yang berbeda terhadap jenis senyawa antioksidan tertentu, pemilihan metode yang tepat sangat penting. Pendekatan Tunggal seringkali tidak cukup untuk menggambarkan profil antioksidan yang komprehensif (Apak *et al.*, 2016).

Uji DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) adalah teknik yang umum diterapkan. Teknik ini diakui karena mudah, cepat, dan tidak memerlukan alat yang kompleks (Nugraheni *et al.*, 2024). Metode ini didasarkan pada prinsip kemampuan antioksidan untuk meredam radikal bebas DPPH (ungu) menjadi senyawa tereduksinya (kuning). Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 517 nm. Metode DPPH sering digunakan, tetapi hanya sensitif terhadap senyawa yang dapat mendonorkan atom hydrogen dengan cepat. Metode ini mungkin tidak efektif untuk senyawa yang bereaksi lambat atau memiliki mekanisme kerja lain (Gulcin ; Alwasel, 2023). Selain DPPH metode ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) biasanya digunakan untuk menghitung kapasitas penangkapan radikal selain DPPH.

ABTS menggunakan radikal kation $ABTS^{\bullet+}$, yang telah dibentuk melalui proses oksidasi. Serapan maksimumnya adalah pada 734 nm, berbeda dengan DPPH (Kadac-czapska;Grembecka, 2025). ABTS memiliki banyak keuntungan, salah satunya adalah fleksibilitasnya. Ini karena dapat digunakan dalam berbagai jenis pelarut dan pH. Selain itu, ABTS dapat mengidentifikasi aktivitas antioksidan dari senyawa hidrofilik dan lipofilik. Namun, karena menggunakan radikal yang tidak ada dalam sistem biologis secara alami, hasilnya harus ditafsirkan dengan hati-hati (Apak *et al.*, 2016)

Sebaliknya, uji FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), yang mengukur daya reduksi sampel berdasarkan kemampuan sampel untuk mengubah ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dalam kompleks dengan ligan TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), menunjukkan berbagai mekanisme (Raphaël E & Grare, 2019). Pembentukan kompleks Fe^{2+} -TPTZ berwarna biru ini ditemukan pada rentang panjang 593 nm. Metode ini sangat baik untuk mengukur senyawa dengan potensial reduksi rendah, tetapi tidak dapat menemukan senyawa yang bekerja melalui mekanisme penangkapan radikal yang melibatkan transfer atom hidrogen. Senyawa seperti tiol atau antioksidan yang bereaksi lambat tidak dapat ditemukan dengan metode ini (Nwachukwu *et al.*, 2021).

Hasil pengujian terhadap sampel yang sama sering menunjukkan variasi dan ketidakkonsistenan karena setiap metode memiliki landasan mekanistik yang berbeda. Jika suatu ekstrak menunjukkan aktivitas yang tinggi dalam uji penangkapan radikal seperti DPPH atau ABTS, itu mungkin menunjukkan nilai sedang atau bahkan rendah dalam uji FRAP, atau sebaliknya (Munteanu, IG &

Apetrei, 2021). Akibatnya, metode tunggal dianggap tidak cukup untuk memberikan gambaran menyeluruh tentang kapasitas antioksidan suatu bahan. Untuk mendapatkan penilaian yang lebih menyeluruh dan dapat diandalkan, sangat disarankan untuk menggabungkan berbagai pendekatan yang saling melengkapi (Apak *et al.*, 2016). Multi-metode ini memungkinkan evaluasi menyeluruh terhadap berbagai mekanisme antioksidan yang mungkin dimiliki oleh zat-zat dalam ekstrak, seperti pada *Piper Crocatum*, daun sirih merah, yang terkenal kaya akan flavonoid dan fenolik dengan berbagai mekanisme kerja. Oleh karena itu, studi yang menggabungkan ketiga metode (DPPH, ABTS, dan FRAP) pada ekstrak daun sirih merah memberikan pemahaman yang baik tentang profil antioksidan alaminya. Setiap metode memiliki prinsip pengujian yang berbeda, sehingga antioksidan yang dihasilkan dapat bervariasi.

Untuk membandingkan efektivitas aktivitas antioksidan dari masing-masing metode, digunakan parameter nilai IC₅₀ yang dihitung melalui analisis regresi linier. Hasil IC₅₀ yang kecil berarti potensi antioksidan tinggi sehingga membutuhkan konsentrasi lebih rendah dalam menghambat 50% radikal bebas (Rumyaan *et al.*, 2022). Hasil data kemudian dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan nilai IC₅₀ dari ketiga teknik tersebut untuk mengetahui teknik yang paling efektif untuk menilai kemampuan antioksidan (Lidya *et al.*, 2025).

10. Penelitian Terdahulu

Tabel 2. 1 Penelitian terdahulu

No.	Peneliti (tahun)	Objek/ Sampel	Metode Ekstraksi	Metode Analisis	Hasil Utama	Perbedaan
1	(Lister et al., 2019)	Ekstrak etanol 70% daun sirih merah (<i>piper crocatum</i>) dan senyawa murni (eugenol dan hidroksikavikol)	Maserasi dengan etanol 70%	Metode: DPPH, ABTS, FRAP, H ₂ O ₂ dengan bandingan ekstrak dan senyawa murni (eugenol)	IC ₅₀ DPPH: 3.98 µg/mL. IC ₅₀ ABTS: 38.43 µg/mL. FRAP: 227.75 µM Fe(II)/µg	Fokus pada perbandingan ekstrak dengan senyawa murni, bukan pada analisis konsistensi & korelasi antar metode untuk ekstrak saja. Tidak menghitung korelasi statistik dengan total fenolik.
2	(Prayitno et al., 2018)	Serbuk daun sirih merah (<i>Piper crocatum</i>)	Maserasi dengan etanol 50% & 70%	DPPH, Total Fenol (Folin-Ciocalteu), Total Flavonoid	IC ₅₀ : 129.11 ppm (etanol 70%) Total Fenol: 157,61 mg GAE/g Total Flavonoid: 168.33 mg QE/g	Hanya menggunakan 1 metode antioksidan (DPPH). Penelitian ini menggunakan 3 metode (DPPH, ABTS, FRAP) + korelasi dengan fenolik.
3	(Yasa et al., 2019)	Daun sirih merah (<i>Piper crocatum</i>) segar	Maserasi dengan etanol 50-90%	DPPH	IC ₅₀ terbaik ± 81,61 ppm	Hanya menggunakan satu metode uji antioksidan (DPPH)
4	(Oktavia et al., 2023)	Daun sirih merah (<i>piper crocatum</i> ruiz & pav)	Ekstraksi etanol dengan variasi ukuran partikel simplisia	Total flavonoid, Aktivitas antioksidan (DPPH)	IC50 pada ukuran partikel mesh 40/60 dan mesh 60/80 sebesar 5,96 ppm dan 2,74 ppm. Merupakan hasil terbaik	Penelitian ini hanya menganalisis DPPH dan total flavonoid terbatas dalam metode tersebut.

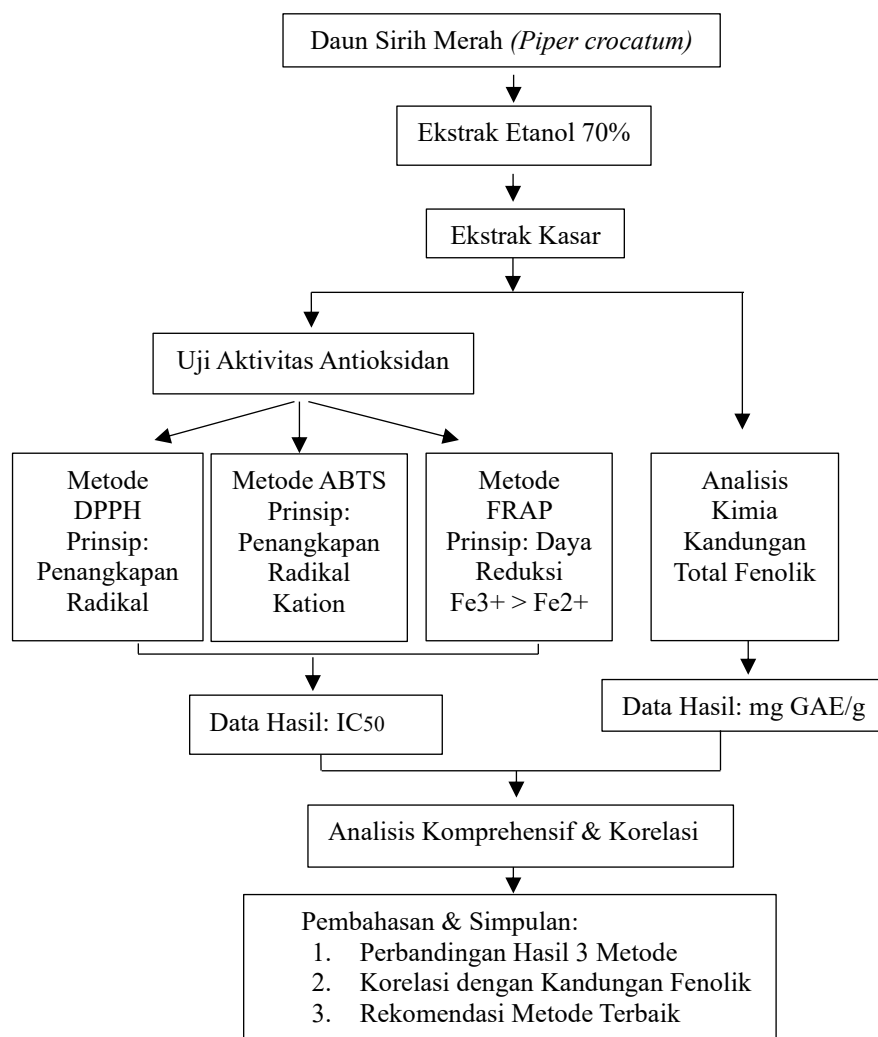
B. Kerangka berfikir

Kandungan zat bioaktif yang tergolong fenolik dan flavonoid yang terdapat dalam daun sirih merah memiliki struktur yang memungkinkan mereka untuk menyumbangkan electron, yang menentukan kemampuannya sebagai antioksidan alami (Ana-Maria Chiorcea-Paquim, 2023). Karena masing-masing metode memiliki mekanisme kerja unik, seperti kemampuan menangkap radikal bebas dan daya reduksi, evaluasi aktivitas antioksidan dalam farmakologi bahan alam memerlukan pendekatan berbagai metode. Oleh karena itu, untuk mendapatkan profil aktivitas yang lengkap, kombinasi metode seperti DPPH, ABTS, dan FRAP diperlukan (Munteanu, IG & Apetrei, 2021). Aktivitas antioksidan yang dihasilkan dari masing-masing metode tersebut dapat dinyatakan secara kuantitatif dalam bentuk hasil IC_{50} , nilai ini mencerminkan konsentrasi ekstrak yang diperlukan untuk mengurangi 50% aktivitas radikal bebas atau mencapai 50% kapasitas reduksi, sehingga semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin kuat aktivitas antioksidannya.

Studi ini ditujukan untuk melengkapi kekurangan dalam penelitian yang telah dilakukan sebelumnya. Sebagai contoh penelitian oleh (Prayitno *et al.*, 2018) hanya menggunakan satu metode (DPPH), sementara penelitian yang dilakukan oleh (Lister *et al.*, 2019), yang menggunakan tiga metode, berkonsentrasi pada perbandingan ekstrak dengan senyawa murni daripada analisis kinerja antar metode. Selain itu, masih belum terdapat studi yang dengan khusus memeriksa hubungan statistik antara hasil dari ketiga metode dengan kandungan fenolik ekstrak secara keseluruhan. Penelitian ini dirancang dengan

langkah-langkah sistematis untuk menyelesaikan masalah ini. Ekstraksi daun sirih merah menggunakan pelarut etanol 96%. Selanjutnya, ekstrak yang dibuat dianalisis secara bersamaan untuk mengetahui fenolik total dengan reagen Folin-Ciocalteu dan aktivitas antioksidan dengan tiga teknik berbeda: DPPH, ABTS, dan FRAP (Munteanu, IG & Apetrei, 2021). Data hasil pengujian aktivitas antioksidan dari masing-masing metode kemudian digunakan untuk menyusun kurva hubungan antara konsentrasi ekstrak dan respon penghambatan atau daya reduksi, yang selanjutnya dimanfaatkan untuk menentukan nilai IC_{50} sebagai parameter kuantitatif kekuatan antioksidan.

Tahap inti penelitian adalah analisis integratif terhadap data yang diperoleh. Analisis komparatif akan dilakukan untuk membandingkan hasil ketiga metode guna melihat konsistensi dan kepekaannya. Selanjutnya, analisis korelasi statistik akan diterapkan untuk menguji kekuatan hubungan antara variabel kimia (total fenolik) dengan masing-masing variabel biologis (hasil DPPH, ABTS, dan FRAP) (Chaves *et al.*, 2020). Dalam hal ini, nilai IC_{50} dari masing-masing metode digunakan sebagai representasi aktivitas antioksidan yang kemudian dikorelasikan dengan kandungan fenolik total, sehingga dapat diketahui sejauh mana senyawa fenolik berkontribusi terhadap kekuatan aktivitas antioksidan ekstrak daun sirih merah.

Tabel 2. 2 Kerangka berfikir

C. Hipotesis penelitian

Berdasarkan kajian teoritis dan identifikasi celah penelitian, diajukan hipotesis sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol dari daun sirih merah (*Piper crocatum*) menunjukkan sifat antioksidan yang signifikan. Hal ini dibuktikan melalui nilai IC₅₀ yang rendah pada uji DPPH dan ABTS serta nilai absorbansi yang tinggi pada uji

FRAP. Hal ini didukung oleh kandungan senyawa fenolik dan flavonoidnya yang dilaporkan mampu mendonorkan electron (Lister et al., 2019).

2. Ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) mempunyai kandungan fenolik total yang tinggi. Dugaan ini didasarkan pada efektivitas pelarut etanol 70% dalam mengekstrak senyawa polar golongan fenolik serta laporan fitokimia awal pada genus *Piper* (Prayitno et al., 2018).
3. Terdapat hubungan yang kuat dan signifikan secara positif antara total kandungan fenolik dan aktivitas antioksidan yang dinilai melalui tiga metode (DPPH, ABTS, dan FRAP). Hal ini didasarkan pada peran utama senyawa fenolik sebagai kontribusi antioksidan dalam ekstrak tumbuhan, dimana metode tersebut pada dasarnya mengukur kemampuan senyawa dalam mendonorkan electron atau hydrogen (Munteanu, IG & Apetrei, 2021).