

Analisis Kemometrik terhadap Sidik Jari Kromatografi Lapis Tipis dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-heksana Piperaceae (Piper betle, Piper crocatum, Peperomia pellucida)

Chemometric Analysis of Thin-Layer Chromatography Fingerprints and Antioxidant Activity of n-Hexane Extracts from Piperaceae (Piper betle, Piper crocatum, Peperomia pellucida)

Miftachul Jannah¹⁾, Elok Kamilah Hayati²⁾

^{1,2}Program Studi Sarjana Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim, Malang, Indonesia

*e-mail: elok.kamilah@kim.uin-malang.ac.id

ABSTRACT

The use of medicinal plants is increasing as knowledge about bioactive compounds, such as those found in betel plants. Differences between species in the same family (Piper betle L., Piper crocatum Ruiz & Pav, and Peperomia pellucida (L.) Kunth) require identification to avoid herbal medicine counterfeiting. The metabolomic approach in this study, based on untargeted compounds, uses thin-layer chromatography to determine the metabolite profiles of the three betel species. The TLC results were visualized using the ImageJ application to obtain quantitative data. Data processing was continued using chemometric methods with PCA to group species and OPLS-DA to identify Rf values that might have antioxidant potential. The PCA results, with two main components totaling 94%, successfully grouped the three species of the family Piperaceae, indicating differences in their respective metabolite profiles. The OPLS-DA results effectively separated the samples based on antioxidant activity into two categories strong (Piper betle L.) and weak (Piper crocatum Ruiz & Pav and Peperomia pellucida (L.) Kunth), with Rf values of 7, 9, and 14 as the main contributors. Rf 9 was selected for further analysis using FTIR because it has the best VIP and p-value. These findings support the importance of a metabolomic approach for quality control and authentication of medicinal raw materials.

Keywords: betel leaf, thin layer chromatography, antioxidant, PCA, OPLS-DA

ABSTRAK

Pemanfaatan tanaman obat semakin berkembang seiring dengan pengetahuan terkait kandungan senyawa bioaktif, seperti pada tanaman sirih. Perbedaan spesies dalam famili yang sama (sirih hijau, sirih merah, dan sirih cina) diperlukan identifikasi untuk menghindari pemalsuan obat herbal. Pendekatan metabolomik pada penelitian ini berbasis *untargeted compound* menggunakan metode kromatografi lapis tipis untuk mengetahui profil metabolit ketiga spesies sirih. Visualisasi hasil KLT melalui aplikasi ImageJ menghasilkan data kuantitatif. Pengolahan data dilanjutkan secara kemometrik dengan PCA untuk mengelompokkan spesies dan OPLS-DA untuk mengidentifikasi Rf yang berpotensi antioksidan. Hasil PCA dengan total dua komponen utama sebesar 94% berhasil mengelompokkan tiga spesies daun sirih yang mengindikasikan perbedaan masing-masing profil metabolit. Hasil OPLS-DA efektif memisahkan sampel berdasarkan aktivitas antioksidan menjadi kategori kuat (sirih hijau) dan lemah (sirih merah, dan sirih cina), dengan nilai Rf 7, 9, dan 14 sebagai kontributor utama. Rf 9 dipilih untuk analisis lanjutan menggunakan FTIR karena mempunyai nilai VIP dan p-value terbaik. Temuan ini mendukung pentingnya pendekatan metabolomik untuk pengendalian mutu dan autentifikasi bahan baku tanaman obat.

Kata kunci: sirih, kromatografi lapis tipis, antioksidan, PCA, OPLS-DA

PENDAHULUAN

Keanekaragaman hayati terbesar di dunia dimiliki oleh negara beriklim tropis yakni Indonesia dengan sebanyak 7.000 spesies tanaman (Syahrir dkk., 2021). Bentuk keanekaragaman hayati tersebut adalah tanaman obat yang telah diketahui dan dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai bagian dari pengobatan tradisional (Kumontoy dkk., 2023). Pemanfaatan tanaman obat semakin berkembang seiring meningkatnya pengetahuan tentang kandungan senyawa bioaktif, yang berperan penting sebagai antioksidan untuk mencegah dan mengobati berbagai penyakit akibat radikal bebas, seperti kanker, diabetes dan penyakit degeneratif lainnya (Kesuma Sayuti & Yenrina, 2015; Middleton et al., 2000).

Tanaman obat populer di Indonesia adalah sirih, terdapat beberapa spesies seperti sirih hijau (*Piper betle* L.), sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav), dan sirih cina (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth). Kandungan metabolit sekunder pada ketiga spesies ini berbeda, yaitu flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, dan minyak atsiri, yang memberikan aktivitas farmakologis seperti antibakteri, antioksidan, dan antiinflamasi (Nisyak dkk., 2022; Alifah dkk., 2023; Gomes et al., 2022). Perbedaan spesies dengan famili yang sama pada tanaman dapat mempengaruhi profil metabolit ditinjau dari beberapa penelitian, sehingga diperlukan identifikasi dan diskriminasi untuk menjamin mutu, keaslian, dan keamanan produk herbal dari tanaman obat (Wahyuni dkk., 2020).

World Health Organization (WHO) telah menerima metode analisis sidik jari menjadi yang populer dalam studi tanaman obat untuk pengendalian kualitas sampel. Berdasarkan Cieřla (2012), analisis sidik jari baik digunakan untuk mengidentifikasi spesies tanaman yang berkerabat dekat, menggunakan teknik kromatografi lapis tipis termasuk metode yang efektif dalam mengidentifikasi dan mengelompokkan spesies tanaman obat berdasarkan profil kimiawinya. Kromatografi tersebut menjadi pilihan yang efektif untuk analisis karena mempunyai kelebihan yaitu biaya rendah, sederhana, relatif cepat, mudah, dan dapat menganalisis banyak sampel dengan waktu bersamaan (Rafi, 2024).

Pendekatan metabolomik pada penelitian ini berbasis *untargeted compound* yakni analisis sidik jari untuk mengkategorikan hasil deteksi ke dalam kelompok-kelompok senyawa tanpa diidentifikasi lebih jauh (Simamora & Wening, 2021). Data hasil KLT, seperti nilai *R_f* (*Retardation factor*) dan spot noda dapat dianalisis lebih lanjut menggunakan perangkat lunak ImageJ guna memperoleh nilai *area under curve* (AUC) dari densitogram. Setelah pengolahan data nilai AUC menggunakan *imageJ*, dilanjutkan dengan analisis kemometrik multivariant menggunakan *Principal Componen Analysis* (PCA) dan *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis* (OPLS-DA) berbantu software *Metaboanalyst* 6.0 yang bertujuan untuk pengelompokkan sampel dan memprediksi senyawa sebagai antioksidan (Nurdiansyah dkk., 2024). Penelitian ini berfokus untuk mengidentifikasi dan mengelompokkan profil metabolit serta mengetahui gugus fungsi golongan senyawa yang mempunyai potensi aktivitas antioksidan dari ketiga spesies daun sirih yang berbeda menggunakan metode KLT dan pengolahan data dengan *ImageJ*, serta analisis PCA dan OPLS-DA.

METODE

Alat dan Bahan

Penelitian ini memerlukan bahan - bahan meliputi sirih hijau (*Piper betle* L.), sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav), sirih cina (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth), etanol p.a (Merck), *n*-heksana p.a. (Merck), etil asetat p.a. (Merck), serbuk DPPH (Sigma Aldrich), akuades (Water One). Alat - alat yang digunakan yaitu neraca analitik (Ohaus), ultrasonik bath (Branson 8510) , *rotary*

evaporator (IKA seri RV 10), plat silika gel F₂₅₄, chamber (CAMAG), hair dryer (Goto), spektrofotometer UV-Vis varian Cary 50 dan spektrofotometer FTIR-ATR (Agilent Technologies).

Preparasi Daun Sirih

Daun sirih setiap spesies diambil dari Kabupaten Malang dengan 4 titik wilayah, Desa Argosuko Kecamatan Poncokusumo, Desa Wonorejo Kecamatan Poncokusumo, Desa Wringinsongo Kecamatan Tumpang dan Desa Pulungdowo Kecamatan Tumpang. Sampel disortasi, dicuci, dikeringkan dengan oven hingga kadar air menurun $\leq 10\%$, dan diserbukkan menggunakan mesin penggiling. Kemudian, diayak menggunakan ayakan 80 mesh (Hidayaty & Hayati, 2024).

Ekstraksi menggunakan Metode Ultrasonik

2 gram serbuk daun sirih diekstrak dengan metode ultrasonik selama 20 menit pada frekuensi 42 kHz menggunakan pelarut n-heksana dalam perbandingan berat per volume 1:10 (Anggraini, 2022). Selanjutnya, hasil ekstrak disaring untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Lalu, ditimbang dan dihitung rendemen dengan persamaan 1. Tahap ekstraksi ini dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan untuk setiap spesies daun sirih sehingga terdapat 15 ekstrak.

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \quad (1)$$

Penentuan Aktivitas Senyawa Antioksidan menggunakan Metode DPPH

Larutan induk dengan konsentrasi 250 ppm disiapkan untuk sampel sirih hijau dan sirih cina, sedangkan sirih merah menggunakan larutan induk 500 ppm. Masing-masing larutan kemudian diencerkan menjadi beberapa variasi konsentrasi, yakni 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm pada sirih hijau; 25, 50, 75, 100, dan 125 ppm pada sirih cina; serta 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm pada sirih merah. Untuk sampel uji, disiapkan 3 mL larutan sampel dari setiap konsentrasi dan 1 mL larutan DPPH 0,2 mM. Setelah itu, dilakukan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C agar terlindung dari cahaya sehingga hasil akan lebih stabil. Kemudian, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 516 nm (Rohmah dkk., 2020). Untuk persen inhibisi dihitung dengan persamaan 2.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan: absorbansi kontrol (A_0), absorbansi sampel (A_1)

Selanjutnya, ditentukan nilai IC₅₀ setiap sampel menggunakan persamaan regresi linier pada *Microsoft Excel*, yang menggambarkan konsentrasi ekstrak dan persen inhibisi. Persamaan regresi untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dapat dilihat pada persamaan 3.

$$y = ax + b \quad (3)$$

Keterangan: persentase inhibisi (y), nilai IC₅₀ (x), *slope* (a), *intercept* (b)

Identifikasi Sidik Jari Kromatografi Lapis Tipis

Plat silika GF₂₅₄ dipotong dengan ukuran 10 × 10 cm dan diberi jarak 1 cm pada tepi atas dan tepi bawah plat. Plat kemudian dioven dengan suhu 105°C selama 30 menit (Hidayaty & Hayati, 2024). Etil asetat:n-heksana digunakan sebagai fasa gerak dengan perbandingan v/v (4:6) (Owu et al., 2020). Eluen dijenuhkan selama 1 jam agar tekanan uap pada semua bagian *chamber* sama. Penotolan ekstrak dilakukan sebanyak 100 µL menggunakan pipa kapiler dan diulang sebanyak 5 kali. Selanjutnya, dilakukan proses elusi hingga fase gerak mencapai garis tepi atas plat. Hasil plat

dibaca dengan lampu UV 366 nm dan didokumentasi menggunakan kamera. Setiap noda diamati dan dihitung nilai R_f (*Retardation factor*) menggunakan persamaan 4.

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \quad (4)$$

Pengolahan Data Hasil Plat KLT menggunakan *ImageJ*

Gambar hasil dokumentasi plat KLT berupa file "JPEG/PNG" diolah secara kuantitatif menggunakan aplikasi *ImageJ* untuk mendapatkan luas area dari densitogram. Gambar plat KLT yang akan diolah dapat dibuka melalui menu "File" > "Open" dan pilih gambar yang diinginkan. Lalu, diberi penanda kotak "Rectangular" dan dilakukan secara konsisten untuk semua pola sidik jari sebagai tahap *preprocessing*. Selanjutnya, pilih "Analyze" > "Gels" > "Select first line" atau "Select next line" untuk setiap pita berikutnya jika akan diolah lebih dari satu. Selanjutnya, pilih kembali menu "Analyze" > "Gels" > "Plot lane" untuk menghasilkan kromatogram dari setiap pita berdasarkan intensitas warna. Baseline dibuat dengan ikon garis "Straight" pada dasar puncak kromatogram yang dihasilkan, kemudian AUC dihitung secara otomatis menggunakan ikon "Wand tool" pada puncak kromatogram.

Analisis Multivariat PCA dan OPLS-DA

Analisis multivariat PCA dilakukan menggunakan web *Metaboanalyst 6.0*, nilai AUC dari pengolahan hasil plat KLT melalui software *ImageJ* dimasukkan ke Microsoft Excel sebagai data yang akan diinput pada web. Tahap pertama, diawali dengan membuka web *Metaboanalyst 6.0* lalu dimasukkan data AUC dari *Microsoft excel* dalam bentuk csv. Kemudian, dipilih menu "Statistical Analysis (one factor)" dan diupload pada menu "A plain txt file" dengan format "samples in columns" lalu klik submit. Selanjutnya, tahap *Normalize* yang dilakukan dengan *processing* data hingga menampilkan beberapa opsi metode analisis. Pilih dan klik opsi *Principal Component Analysis* (PCA) lalu akan muncul data *score plot*, dimana menunjukkan PC yang dihasilkan. Setelah itu, visualisasi data PCA dapat diketahui dengan memilih opsi "heatmap" dimana akan menunjukkan matriks guna membantu mengkomunikasikan data hasil PCA dengan pola warna.

Analisis OPLS-DA sama seperti analisis PCA dengan menggunakan web *Metaboanalyst 6.0* namun sedikit berbeda pada file yang diinput. File data tersebut berupa kolom yang menunjukkan hasil uji aktivitas antioksidan pada masing-masing sampel dimana telah diketahui sifat kuat dan lemahnya. Diawali dengan memasukkan data dalam bentuk csv lalu dipilih menu "Statistical Analysis (one factor)". Kemudian, diupload pada menu "A plain txt file" dengan format "samples in columns" lalu klik submit. Selanjutnya, masuk pada halaman "Normalize" kemudian dilakukan *processing* data hingga menampilkan beberapa opsi metode analisis. Lalu, di klik pada opsi "Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA)". Hasil dari analisis OPLS-DA berupa data *score plot*, *s-plot*, dan *vip-plot*.

Karakterisasi Gugus Fungsi menggunakan FTIR-ATR

Sebelum pengujian menggunakan FTIR-ATR, dilakukan prosedur KLT-Preparatif untuk memperoleh isolasi senyawa aktif ekstrak n-heksana *Piper betle L.* menggunakan plat silika GF₂₅₄ ukuran 10 × 10 cm. Plat yang telah ditotolkan kemudian dielusi menggunakan etil asetat:n-heksana (4:6 v/v) dan divisualisasi dibawah lampu UV 366 nm. Setelah itu, dikerok isolat aktif pada nilai R_f terpilih yang sebelumnya teridentifikasi memiliki aktivitas antioksidan berdasarkan data OPLS-DA dan dilarutkan menggunakan pelarut n-heksana. Suspensi kemudian disentrifugasi untuk memisahkan residu silika (pelet) yang mengendap di dasae tabung dan larutan isolat

(supernatan) di bagian atas. Selanjutnya, dipindahkan larutan isolat (supernatan) dalam tabung reaksi untuk dianalisis menggunakan FTIR-ATR.

Supenatan yang mengandung senyawa hasil isolasi diteteskan diatas permukaan kristal ATR dan dilakukan analisis menggunakan spektrofotometer FTIR-ATR merk Agilent Technologies pada rentang bilangan gelombang $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ (Liang et al., 2016). Hasil dari karakterisasi FTIR berupa spektrum dengan bilangan gelombang di sumbu x dan persen transmittan (%T) di sumbu y. Spektrum tersebut menunjukkan puncak-puncak dari gugus fungsi golongan senyawa tertentu yang ada dalam daun sirih.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Daun Sirih

Preparasi sampel bertujuan untuk mempersiapkan bahan alam sebelum dilakukan pengujian, terdiri dari proses sortasi, pencucian, pengeringan, penyerbukan, pengayakan dan penyimpanan. Sampel sirih hijau, sirih merah, dan sirih cina pada penelitian ini diambil secara acak dari 4 titik di Kabupaten Malang Desa Argosuko Kecamatan Poncokusumo, Desa Wonorejo Kecamatan Poncokusumo, Desa Wringinsongo Kecamatan Tumpang dan Desa Pulungdowo Kecamatan Tumpang. Proses preparasi dilakukan di UPT Materia Medika Batu, Kota Malang. Sortasi dan pencucian daun dilakukan untuk memisahkan bagian daun tidak segar, kering, busuk, berlubang serta menghilangkan kotoran. Hal ini bertujuan untuk memperoleh kualitas daun sirih yang baik dan seragam untuk ekstraksi.

Kadar air perlu diturunkan hingga 10% melalui pengeringan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 8 jam, tahap ini bertujuan agar kualitas simplisia lebih baik dan kandungan kimia tetap terjaga (Winangsih dkk., 2013). Hal ini sesuai dengan Nurhaslina dkk. (2022) yang menyatakan bahwa suhu pada kisaran $40 - 60^{\circ}\text{C}$ mampu mempertahankan kualitas simplisia pada berbagai tanaman obat. Setelah kering, dilanjutkan proses penyerbukan untuk memperluas permukaan simplisia sehingga memudahkan proses ekstraksi.

Menurut Rahmawati dkk. (2023) semakin besar luas permukaan simplisia maka semakin luas juga cairan yang berinteraksi dengan simplisia dan memecah dinding sel sehingga cairan masuk ke dinding sel dan kandungan kimia yang tersekstrak lebih banyak. Selanjutnya, tahap pengayakan simplisia menggunakan ayakan 80 mesh untuk menyeragamkan sampel agar terjamin efektivitas ekstraksi. Setelah itu, simplisia disimpan dalam plastic klip terpisah untuk setiap spesies daun sirih guna mencegah pencampuran sampel. Penyimpanan ini dilakukan hingga proses ekstraksi untuk menjaga kualitas, dengan memperhatikan faktor cahaya, oksigen, kelembapan, kontaminasi dan serangga (Handoyo & Pranoto, 2020).

Ekstraksi Daun Sirih menggunakan Metode Ultrasonik

Serbuk daun sirih dilakukan ekstraksi secara ultrasonik menggunakan pelarut non polar n-heksana dengan perbandingan 1:10 (Anggraini, 2022). Metode ultrasonik memanfaatkan gelombang ultrasonik untuk mempercepat proses ekstraksi (Adhiksana, 2017). Meskipun kemampuan dalam mengekstraksi senyawa polar tidak sebaik etanol, tetapi n-heksana tetap dapat mengekstrak senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antioksidan (Artati dkk., 2024). Selanjutnya, dipekatkan ekstrak yang sudah disaring menggunakan *rotary evaporator* di suhu 40°C pada kecepatan 50 rpm (Kurniawati, 2019).

Tabel 1. Nilai rendemen ekstrak daun sirih berbeda spesies

Spesies	%Rendemen ($\pm$ SD)
Sirih Cina	5.69 ^a $\pm$ 0.38
Sirih Hijau	7.02 ^b $\pm$ 0.61
Sirih Merah	7.79 ^b $\pm$ 0.69

Keterangan: Nilai yang didampingi notasi yang berbeda "a" dan "b" menunjukkan berbeda signifikan

Berdasarkan nilai rendemen yang diperoleh pada Tabel 1, terlihat bahwa rendemen daun sirih masing-masing spesies terdapat perbedaan dalam jumlah metabolit yang diekstraksi. Rendemen ekstrak sirih cina, sirih hijau, dan sirih merah secara berurutan yakni sebesar 5.69^a $\pm$ 0.38, 7.02^{ab} $\pm$ 0.61, dan 7.79^b $\pm$ 0.69. Hasil analisis statistik menggunakan "One Way Anova" menunjukkan terdapat perbedaan secara signifikan terhadap rendemen ekstrak pada masing-masing spesies daun sirih (0.000 < 0.05). Setelah itu, dilakukan "uji Tukey" yang membuktikan tidak ada perbedaan signifikan antara sirih hijau dengan sirih merah. Namun, keduanya berbeda signifikan dengan sirih cina sehingga notasi pada sirih cina berbeda. Perbedaan rendemen ini dipengaruhi oleh metabolit sekunder pada masing-masing spesies, sehingga jumlah senyawa yang tersekstrak oleh n-heksana berbeda pula (Royani dkk., 2025).

Penentuan Aktivitas Senyawa Antioksidan menggunakan Metode DPPH

Aktivitas antioksidan ditentukan menggunakan metode 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) untuk melihat kemampuan sampel dalam menangkal radikal bebas. Pengukuran diuji menggunakan instrumen UV-Vis (λ 516 nm). Ekstrak yang telah diencerkan sesuai dengan konsentrasi masing-masing spesies dicampurkan dengan DPPH dan diinkubasi 10 menit dalam inkubator pada suhu 37°C untuk memastikan reaksi berlangsung optimal dan absorbansi menurun secara signifikan dibandingkan sampel yang tidak diinkubasi (Abdullah dkk., 2020). Perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning menunjukkan bahwa senyawa antioksidan dalam sampel telah bereaksi dengan radikal bebas DPPH. Reaksi tersebut terjadi akibat donasi atom hidrogen dari senyawa antioksidan kepada radikal DPPH sehingga terbentuk senyawa yang lebih stabil. Hal ini, menyebabkan perubahan absorbansi yang diterapkan untuk menentukan nilai IC₅₀, yaitu kemampuan senyawa uji untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas DPPH. Semakin rendah nilai IC₅₀ yang diperoleh, maka semakin tinggi kemampuan senyawa tersebut dalam meredam radikal bebas.

Tabel 2. Nilai IC₅₀ ekstrak daun sirih berbeda spesies

Spesies	IC ₅₀ ($\pm$ SD)
Sirih Hijau	14.31 ^a $\pm$ 8.40
Sirih Cina	326.05 ^b $\pm$ 70.23
Sirih Merah	343.96 ^b $\pm$ 62.69

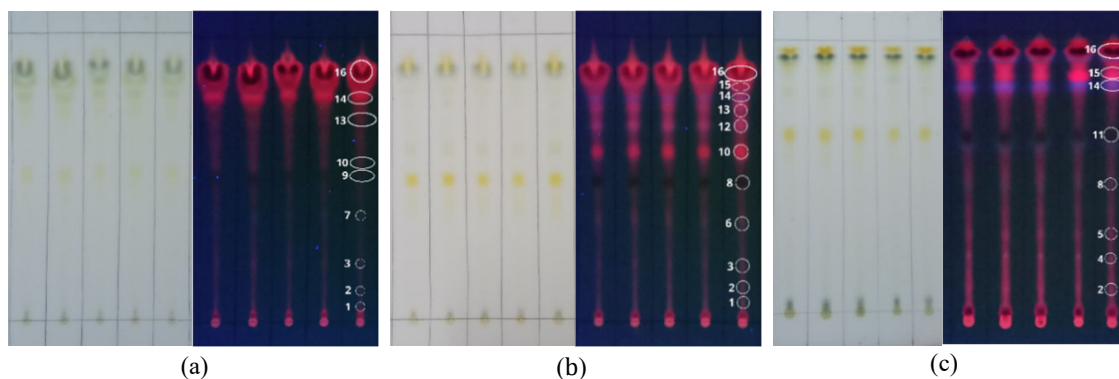
Keterangan: Nilai yang didampingi notasi yang berbeda "a" dan "b" menunjukkan berbeda signifikan

Tabel 2 menunjukkan hasil nilai IC₅₀ ekstrak n-heksana daun sirih berbeda spesies yang diperoleh dari persamaan regresi linear antara konsentrasi sampel dan persen inhibisi radikal DPPH. Aktivitas antioksidan dari ketiga sirih tersebut menyajikan perbedaan yang signifikan pada tingkat signifikansi 5% berdasarkan "uji BNJ/Tukey". Ekstrak n-heksana sirih hijau mempunyai nilai IC₅₀ terendah dibandingkan sirih cina dan merah, yang menandakan bahwa aktivitas antioksidan pada sirih hijau kuat sedangkan sirih cina dan sirih merah memiliki aktivitas antioksidan lemah (>200 ppm). Hal tersebut sejalan dengan penelitian Pin et al (2010) menunjukkan hasil aktivitas antioksidan sirih hijau menggunakan pelarut n-heksana sebesar

76.43 $\pm$ 2,04, di mana nilai IC₅₀ tersebut dalam kategori kuat. Lalu, aktivitas antioksidan untuk sirih merah pada penelitian Insanu dkk. (2017) termasuk dalam kategori sangat lemah karena didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 791.68 $\pm$ 7.68. Kemudian, hasil penelitian Lembang dkk. (2020) pada sirih cina untuk fraksi n-heksana menunjukkan nilai IC₅₀ dalam kategori sangat lemah sebesar 390.87 ppm. Dari ketiga penelitian tersebut, menjelaskan bahwa aktivitas antioksidan pada sirih hijau mempunyai potensi sebagai antioksidan kuat.

Identifikasi Sidik Jari Kromatografi Lapis Tipis

Metode KLT pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui komponen dalam ekstrak sampel daun sirih. Informasi tersebut dimanfaatkan untuk memastikan perbedaan komponen dari daun sirih dengan variasi spesies dapat diinterpretasikan melalui densitogram yang diperoleh dari hasil pemrosesan gambar menggunakan aplikasi *ImageJ* (Fitrianti, 2011). Plat KLT dioven agar kadar air yang tersisa menguap dan proses penjuanan eluen pada chamber juga perlu diperhatikan supaya kondisi tekanan uap dalam *chamber* sama sehingga ketika proses elusi, eluen akan naik secara bersamaan (Hidayaty & Hayati, 2024). Hasil pemisahan KLT dari ketiga spesies terdapat perbedaan noda, dapat dilihat pada Gambar 1 sirih hijau dan sirih cina cenderung memiliki jumlah noda yang lebih sedikit sedangkan untuk sirih merah mempunyai noda lebih banyak. Banyaknya jumlah noda menunjukkan kompleksitas senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak.



Gambar 1. Hasil KLT daun sirih dibawah lampu UV 366 nm dan sinar tampak berdasarkan perbedaan spesies (a) Sirih hijau (*Piper betle* L.) (b) Sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) (c) Sirih Cina (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth)

Identifikasi nilai Rf melalui uji presisi menggunakan Standar Deviasi (SD) diperlukan untuk memastikan bahwa setiap noda yang muncul merupakan jenis senyawa yang sama. Tabel 3 menyajikan nilai Rf (*Retardation Factor*) dari masing-masing spesies daun sirih yang menunjukkan tingkat presisi tinggi, dengan rentang SD antara 0 hingga 0,03. Angka tersebut memenuhi kriteria presisi berdasarkan batas $\Delta Rf \leq 0,05$. Tingkat presisi ini dipengaruhi oleh parameter kromatografi yang sama. Pemisahan KLT pada setiap spesies daun sirih dilakukan lima kali penotolan dan dielusi secara bersamaan dalam satu chamber. Meskipun dilakukan pada hari yang berbeda, seluruh pengujian menggunakan parameter sama, meliputi fase gerak, volume penotolan, jenis plat dan metode visualisasi. Reich & Schibli (2006) menjelaskan bahwa plat yang berbeda hari dapat diterima jika tidak lebih besar dari 0,05. Penelitian ini fokus pada analisis pola pemisahan berdasarkan sifat kepolaran senyawa yang berinteraksi dengan fasa gerak dan fasa diam. Senyawa yang lebih teradsorpsi pada fasa diam cenderung bersifat polar dan menghasilkan nilai Rf yang rendah. Sebaliknya, senyawa yang lebih larut dalam fasa gerak bersifat semi-polar

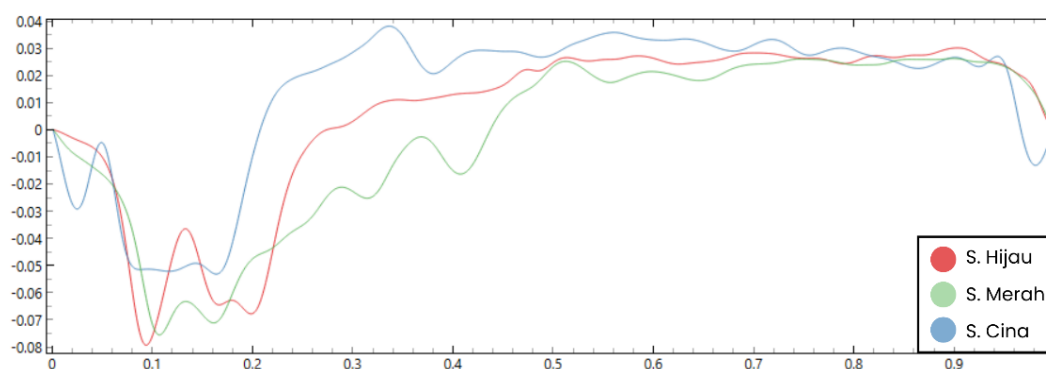
hingga non-polar, dengan nilai Rf sedang hingga tinggi. Hal ini terjadi karena senyawa yang lebih mudah bergerak bersama fasa gerak akan berpindah lebih jauh, menghasilkan nilai Rf yang lebih besar, dan berlaku sebaliknya untuk senyawa yang tertahan pada fasa diam (Hidayaty & Hayati, 2024).

Tabel 3. Nilai Rf ekstrak daun sirih berbeda spesies

Noda	Nilai Rf (<i>Retardation Factor</i>)			Rata-rata	Standar Deviasi
	Sirih Hijau	Sirih Merah	Sirih Cina		
1	0.0625	0.077	-	0.0698	0.0103
2	0.125	0.1275	0.12	0.1242	0.0038
3	0.2125	0.2075	-	0.2100	0.0035
4	-	-	0.248	0.2480	0
5	-	-	0.3225	0.3225	0.01
6	-	0.375	-	0.3750	0
7	0.4	-	-	0.4000	0
8	-	0.5	0.5025	0.5013	0.0018
9	0.5375	-	-	0.5375	0
10	0.575	0.625	-	0.6000	0.0354
11	-	-	0.6545	0.6545	0.01
12	-	0.6875	-	0.6875	0
13	0.7125	0.75	-	0.7313	0.0265
14	0.8025	0.775	0.82	0.7992	0.0227
15	-	0.85	0.8655	0.8578	0.0110
16	0.915	0.8875	0.94	0.9142	0.0263

Pengolahan Data Hasil Plat KLT menggunakan *ImageJ*

Hasil pemisahan KLT kemudian diolah menggunakan aplikasi *ImageJ* dengan bertujuan untuk mengubah noda menjadi data densitogram sehingga dapat diketahui nilai AU (intensitas) dan AUC (*Area Under the Curve*). Nilai AUC didapatkan dari penandaan noda pada gambar yang bisa mewakili komponen keseluruhan dari setiap penotolan dan kemudian diolah menjadi densitogram. Perbedaan jumlah dan intensitas noda pada plat KLT menghasilkan puncak yang berbeda pada densitogram. Hal itu disebabkan karena adanya perbedaan senyawa dalam daun sirih hijau, sirih merah dan cina. Untuk memberikan hasil densitogram yang baik, dilakukan tahap *preprocessing* data menggunakan perangkat lunak *Orange Data Mining* versi 3.380. Tahap *preprocessing* tersebut, meliputi *smoothing*, *baseline correction*, dan *normalize* (Fitrianti, 2011).



Gambar 2. Densitogram sesudah di preprocessing menggunakan Orange

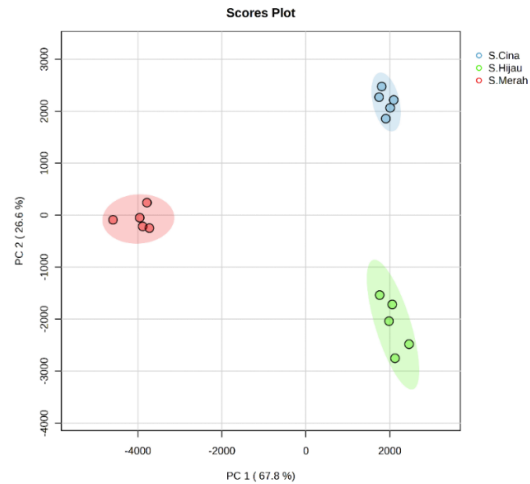
Gambar 2 menunjukkan densitogram setelah *preprocessing*, terlihat bahwa pemisahan lebih jelas dan baseline lebih baik, dimana sumbu x sebagai nilai Rf (*Retardation Factor*) sedangkan sumbu y adalah nilai AU (*Area Under* atau intensitas). Puncak yang tinggi menunjukkan besarnya konsentrasi senyawa aktif karena intensitas warna nosa semakin terang, sehingga hasil dokumentasi plat KLT dan proses pemisahannya menentukan nilai AUC yang diperoleh (Wahyuni dkk., 2020). Nilai AUC dipakai untuk menentukan kualitas dan kandungan senyawa secara kuantitatif. Namun, data tersebut belum cukup untuk mengungkap pola sidik jari dalam membedakan spesies berkerabat dekat dari daun sirih. Oleh karena itu, dibutuhkan analisis lanjut yakni analisis kemometrik menggunakan metode PCA untuk memperoleh interpretasi yang lebih mendalam serta mengidentifikasi perbedaan profil kimia antar variasi spesies. Hasil data untuk nilai AUC ekstrak daun sirih yang berbeda spesies ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai rata-rata AUC ekstrak daun sirih berbeda spesies

Rf	Nilai AUC (<i>Area Under Curve</i>)		
	Sirih Hijau	Sirih Merah	Sirih Cina
1	461.7662	917.6144	-
2	752.1584	847.1912	860.7292
3	361.7208	1407.1112	-
4	-	-	795.7292
5	-	-	800.1336
6	-	1163.407	-
7	651.3316	-	-
8	-	2026.6974	1696.916
9	2356.052	-	-
10	1312.859	4629.8918	
11	-	-	2600.564
12	-	2550.3752	-
13	645.831	1279.8886	-
14	2646.695	936.418	994.9942
15	-	2865.6484	712.8768
16	5981.459	3706.8322	4644.297

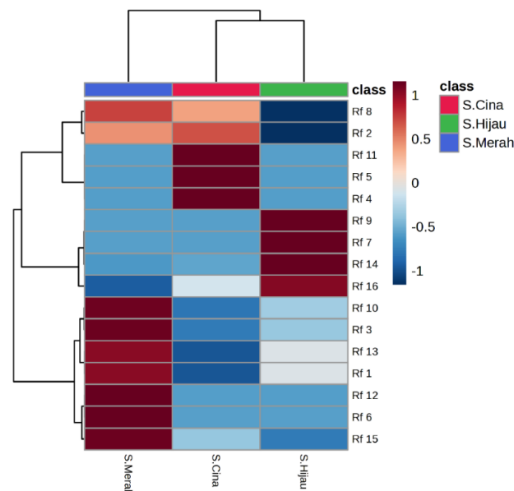
Analisis Multivariat Metode PCA

Principal Component Analysis (PCA) merupakan metode analisis multivariat yang digunakan untuk mempermudah interpretasi data dengan cara menghilangkan variabel yang berkontribusi tanpa menghilangkan informasi penting. Dalam penelitian ini, data yang digunakan untuk analisis PCA adalah nilai Area Under Curve (AUC) dari pengolahan KLT menggunakan *ImageJ* yang mana cukup dilakukan visualisasi menggunakan sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm. Analisis PCA bertujuan untuk mengelompokkan pola sampel berbeda spesies berdasarkan komponen kimianya (Puspitasari dkk., 2021), dalam penelitian ini yaitu sirih hijau, sirih merah, dan sirih cina.



Gambar 3. *Score plot* hasil PCA ekstrak daun sirih berdasarkan perbedaan spesies

Hasil score plot pada Gambar 3 menunjukkan dua nilai komponen utama mencakup 94 % dari variasi total data (PC1 = 67,8 % dan PC2 = 26,6 %), terlihat bahwa ekstrak senyawa daun sirih dari ketiga spesies mempunyai nilai AUC yang berbeda. Dikarenakan semakin dekat satu titik dengan titik lainnya maka semakin besar kemiripan nilai AUC, begitu pula sebaliknya (Fitrianti, 2011). Score plot tersebut menginterpretasikan bahwa sampel S.Hijau, S.Merah, dan S.Cina terpisah, yang mana pengelompokkan dari ketiga sirih mempunyai jarak yang berbeda jauh. Dalam konteks ini, diduga mereka memiliki profil metabolit berbeda karena perbedaan jumlah dan konsentrasi metabolit pada setiap daun sirih. Oleh sebab itu, perbedaan spesies meskipun dalam famili yang sama pada sampel sirih mempengaruhi produksi metabolit sekunder.



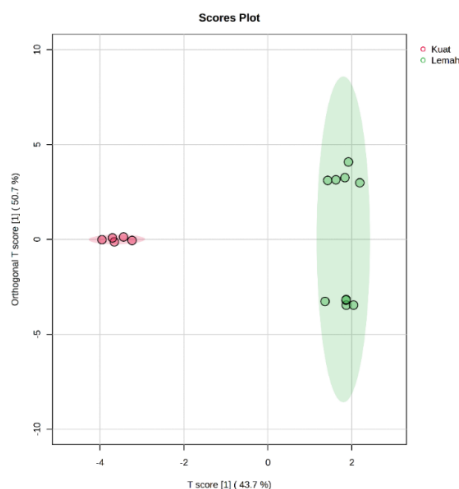
Gambar 4. Analisis *heatmap* PCA ekstrak daun sirih berdasarkan perbedaan spesies

Selain itu, analisis heatmap pada Gambar 4 menunjukkan kluster bertingkat yang menghasilkan hubungan antara variasi spesies daun sirih dengan nilai Rf. *Heatmap* menggambarkan variasi metabolit yang terkandung dalam sampel (Hayati et al., 2024). Garis horizontal (baris) mewakili masing-masing sampel dari tiga spesies sirih yang berbeda, sedangkan garis vertikal (kolom) menampilkan nilai Rf (*Retardation Factor*) 1 hingga 16. Klaster yang terletak di bagian atas dan samping menggambarkan tingkat kedekatan atau kesamaan antar variabel, dimana yang posisinya berdekatan dalam struktur bertingkat pada dendrogram

menunjukkan pola yang relatif serupa. Warna pada *heatmap* menjelaskan intensitas atau konsentrasi senyawa yang terekstrak oleh sampel. Intensitas tinggi ditunjukkan oleh warna merah, intensitas netral oleh warna putih, dan intensitas rendah oleh warna biru. Sirih merah terlihat memiliki nilai Rf dengan intensitas senyawa yang tinggi karena warna merahnya lebih banyak dibandingkan sirih hijau dan sirih cina. Hal ini berhubungan dengan nilai AUC pada masing-masing spesies daun sirih, dimana semakin tinggi nilai AUC maka intensitas senyawanya semakin tinggi yang dapat dilihat dari warna pada *heatmap* (Adila, 2024).

Analisis Multivariat Metode OPLS-DA

Orthogonal Partial Least Square Analysis (OPLS-DA) merupakan metode pengelompokan bersifat terarah, yang dilakukan dengan menghilangkan informasi dari masing-masing kelompok dan mengevaluasi apakah kelompok-kelompok tersebut masih dapat dikelompokkan kembali dengan kelompok lain yang memiliki sifat atau karakteristik yang mirip (Elvira dkk., 2024). Dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Rf (*Retardation factor*) yang berkontribusi sebagai antioksidan. Data yang dimasukkan untuk analisis OPLS-DA berupa nilai AUC dengan nilai IC₅₀ yang sudah dikelompokkan menjadi kuat dan lemah.

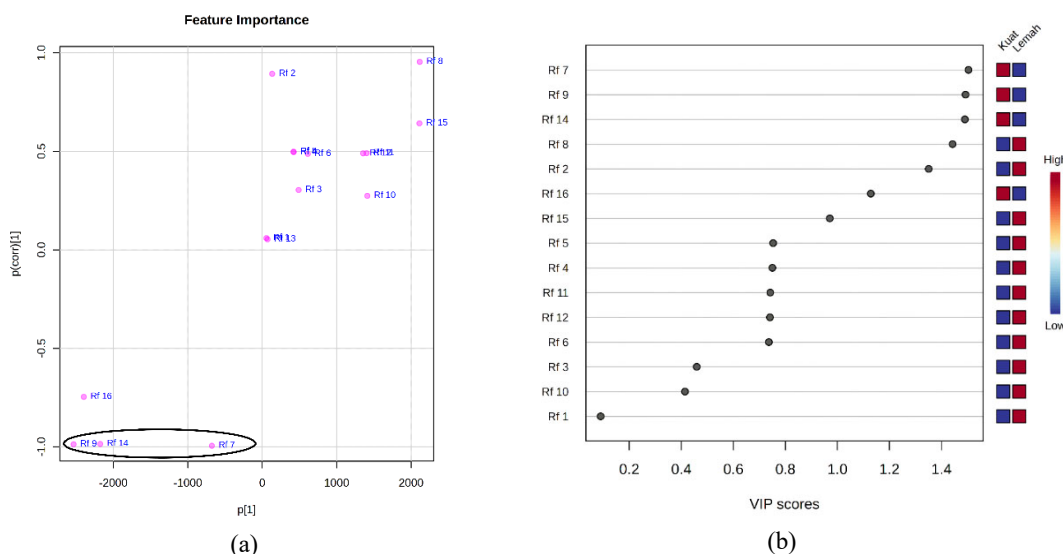


Gambar 5. Score plot hasil OPLS-DA menggunakan *Metaboanalyst 6.0*

Gambar 5 menunjukkan pemisahan yang baik antara kategori ekstrak daun sirih dengan aktivitas antioksidan kuat dan lemah, dimana sirih hijau berada di kategori kuat sedangkan sirih merah dan sirih cina berada di kategori lemah. Hal ini menunjukkan keduanya mempunyai perbedaan signifikan dalam komposisi senyawa yang berkontribusi terhadap aktivitas tersebut. Sesuai dengan penelitian More et al (2021) pada *Vachellia* dengan lima spesies berbeda dalam famili yang sama menunjukkan terdapat dua kluster aktivitas antioksidan aktif dan tidak aktif. Kelompok kuat menunjukkan penyebaran data yang rapat, menandakan konsistensi antar replikat, sedangkan kelompok lemah memiliki variasi sedikit lebih tinggi, namun tetap membentuk satu kluster yang baik. Hasil ini mengindikasikan bahwa model OPLS-DA mampu memisahkan sampel berdasarkan perbedaan profil metabolit atau senyawa bioaktif dengan akurasi yang tinggi secara statistik dan visual.

Hasil score plot didukung oleh data S-plot yang berperan dalam membedakan kelompok dengan visualisasi metabolit dan VIP-plot untuk evaluasi signifikansi metabolit melalui nilai VIP (Khoirunnisa & Patonah, 2025). Gambar 6 menunjukkan analisis S-plot, dimana beberapa spot memiliki kontribusi dan korelasi negatif yang tinggi terhadap model prediksi p[1] yang terlihat

pada Rf 7, Rf 9, dan Rf 14 di kuadran kiri bawah. Begitu pula analisis VIP-plot menunjukkan visualisasi *heatmap* dengan nilai VIP tertinggi ($VIP > 1$) dapat dilihat pada Tabel 5 untuk Rf 7, Rf 9, dan Rf 14, mempunyai Intensitas senyawa tinggi dan berada di kategori kuat yang ditunjukkan oleh warna merah. Oleh karena itu, ketiga nilai Rf tersebut menjadi kontributor utama Rf yang berpotensi memiliki aktivitas antioksidan kuat. Jika dilihat pada Tabel 5 yang mempunyai nilai VIP lebih dari satu dan nilai $p[1]$ terkecil, maka Rf 9 yang layak dipilih untuk analisis lebih lanjut menggunakan instrumen FTIR.



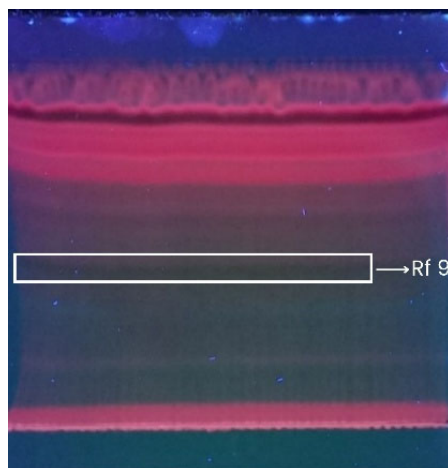
Gambar 6. S-plot (a) dan VIP-plot (b) OPLS-DA menggunakan *Metaboanalyst* 6.0

Tabel 5. Nilai $VIP[t]$ dan $p[1]$ pada VIP-plot dan S-plot

Retardation Factor (Rf)	$VIP[t]$	$p[1]$
Rf 7	1.5038	-675.83
Rf 9	1.4924	-2533
Rf 14	1,49	-2175.3

Karakterisasi Gugus Fungsi menggunakan FTIR-ATR

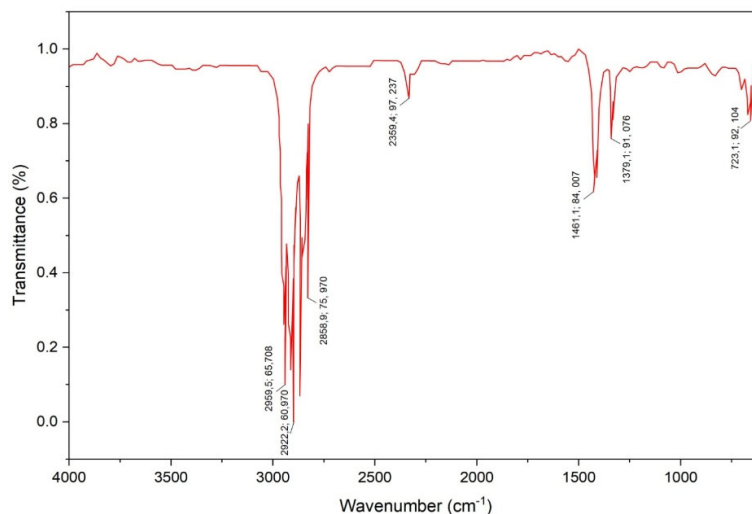
Fourier Transform Infrared Spectroscopy-Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) adalah metode sederhana, mudah dan cepat untuk mengidentifikasi gugus fungsi dalam bentuk sampel padat atau cair dengan persiapan sampel yang minimal. FTIR dilakukan pada kisaran gelombang inframerah tengah yakni di bilangan gelombang 4000 – 400 cm^{-1} . Berdasarkan hasil data OPLS-DA, Rf 9 pada sirih hijau memiliki nilai $p[1]$ yang terkecil sehingga diduga berkontribusi sebagai antioksidan. Sebelum divalidasi menggunakan FTIR-ATR, ekstrak n-heksana daun sirih hijau diisolasi senyawa aktif menggunakan metode KLT-Preparatif menggunakan eluen etil asetat:n-heksana (4:6 v/v) dan divisualisasi dibawah lampu UV 366 nm. Gambar 7 menunjukkan hasil KLT preparatif yang menghasilkan 9 pita, yang sama pada plat KLT analitik sebelumnya. Kemudian, isolat aktif Rf 9 dikerok, dilarutkan dan dianalisis secara spektrofotometer infra merah untuk mengetahui gugus fungsinya.



Gambar 7. Hasil KLT-Preparatif ekstrak n-heksana sirih hijau

Hasil interpretasi spektra IR untuk isolat aktif Rf 9 diperoleh 6 peak yang ditampilkan pada Gambar 8 dan diinterpretasi dalam Tabel 6. Gambar 8 menunjukkan spektra rocking dari gugus metilen, yang umumnya muncul dalam senyawa rantai panjang alifatik pada bilangan gelombang 723.1 cm^{-1} dengan intensitas kuat. Biasanya pada bilangan gelombang tersebut diindikasikan sebagai gugus -CH_2 bending yang terhubung dalam rantai karbon. Kemudian, pada bilangan gelombang 1379 cm^{-1} dan $146,1\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya bending dari gugus fungsi -CH_3 dan -CH_2 . Gugus fungsi tersebut mengindikasikan karakter senyawa hidrokarbon jenuh. Selanjutnya, pita serapan dengan intensitas kuat terlihat pada bilangan gelombang 2858.9 cm^{-1} hingga 2959.5 cm^{-1} yang digolongkan sebagai gugus $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ stretching. Gugus tersebut mengindikasikan adanya gugus alkil jenuh, seperti metil dan metilen.

Berdasarkan hasil spektra IR, isolat aktif Rf 9 tidak menunjukkan pita serapan pada daerah 3300 cm^{-1} yang menunjukkan keberadaan gugus OH atau N-H maupun 1700 cm^{-1} yang berkaitan dengan gugus karbonil C=O . Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa hasil isolat tidak mengandung gugus polar dan tampaknya mempunyai karakteristik alifatik yang dominan daripada karakteristik polifenolik yang umumnya dimiliki oleh senyawa dengan aktivitas antioksidan kuat. Dugaan ini berkorelasi dengan sifat pelarut n-heksana pada isolat yang cenderung mengekstrak senyawa nonpolar. Senyawa yang bersifat non polar tersebut diduga berasal dari golongan terpenoid lipofilik yang tersusun atas unit isoprena sehingga menunjukkan karakter alifatik dan memiliki kelarutan baik dalam pelarut non polar seperti n-heksana (Zaneta & Ferdinal, 2023); (Jiang dkk., 2016). Meskipun demikian, identifikasi menggunakan FTIR ini hanya memberikan informasi gugus fungsi dominan dan belum bisa digunakan untuk menentukan golongan senyawa secara pasti. Oleh karena itu, diperlukan analisis pelengkap seperti LC-MS/MS dan NMR, serta pengujian bioassay antioksidan pada masing-masing isolat, termasuk Rf 7 dan Rf 14 untuk memperkuat interpretasi hasil penelitian.



Gambar 8. Spektrum IR isolat aktif Rf 9

Tabel 6. Serapan gugus fungsi dari senyawa

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Bilangan Gelombang Literatur (cm ⁻¹) (Pavia et al., 2009) dan (Socrates, 2001)	Intensitas
C-H bending (-CH ₂)	723.1	730-720	s
-CH ₃ bending (alifatik)	1379.1	1390-1370	m
-CH ₂ (alifatik)	1461.1	1465-1440	m
	2858.9		
C _{sp} ³ -H stretching (alifatik)	2922.2	3000-2800	s
	2959.5		

keterangan:

w = *weak* (lemah)

s = *strong* (kuat)

m = *medium* (sedang)

v = *variable* (bervariasi)

KESIMPULAN

Analisis PCA berhasil mengelompokkan tiga spesies daun sirih (sirih hijau, sirih merah, dan sirih cina) berdasarkan perbedaan komponen kimiawi, dengan dua komponen utama yang menjelaskan 94% variasi data. Score plot menunjukkan hasil kluster terpisah untuk masing-masing spesies, menandakan profil metabolit yang berbeda. Selanjutnya, OPLS-DA efektif memisahkan sampel daun sirih berdasarkan aktivitas antioksidan menjadi dua kelompok, yaitu kuat (sirih hijau) dan lemah (sirih merah dan sirih cina), dengan akurasi tinggi. Analisis VIP-plot dan S-plot mengidentifikasi nilai Rf 7, 9, dan 14 sebagai kontributor utama pemisahan tersebut. Rf 9 dipilih untuk analisis lanjutan menggunakan FTIR karena memiliki nilai VIP > 1 dan p-value terkecil, menunjukkan kontribusi signifikan terhadap aktivitas antioksidan. Analisis FTIR mengungkapkan bahwa senyawa pada Rf 9 mengandung gugus fungsi alifatik, seperti C_{sp}³-H stretching dan CH₂ bending.

SARAN

Penelitian ini hanya melakukan karakterisasi terhadap isolat Rf 9 yang dipilih berdasarkan nilai VIP tertinggi dengan p[1] terkecil. Analisis terhadap pita lain yang mempunyai VIP tertinggi, meliputi Rf 7 dan Rf 14, belum dilakukan sehingga kontribusi masing-masing isolat belum bisa dibandingkan secara komprehensif. Oleh sebab itu, diperlukan pengujian untuk pita lain dan dilakukan analisis lebih lanjut menggunakan instrumen LC-MS untuk mengetahui karakteristik senyawa secara spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M., Fitriana, & Maryam, S. (2020). Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Fungi Endofit Daun Galing-Galing (*Cayratia Trifolia* L.) Dengan Metode 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazil (DPPH). *Jurnal Farmasi Desember*, 12(2), 117–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.56711/jifa.v12i2.720>
- Adhiksana, A. (2017). Perbandingan Metode Konvensional Ekstraksi Pektin dari Kulit Buah Pisang dengan Metode Ultrasonik. *Journal of Research and Technology*, 3(2), 80–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.55732/jrt.v3i2.276>
- Adila, N. A. (2024). *Analisis Kromatografi Lapis Tipis pada Tanaman Anting-Anting (Acalypha indica L.) Berdasarkan Variasi Pelarut Polar dan Pengenalan Pola Secara Kemometrik*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Alifah, Agus Faizal, I., & Tri Kumala Swandari, M. (2023). Metode Perbandingan Maserasi Dan Soxhletasi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) Terhadap Efektivitas Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 4(1), 64–72. Retrieved from <https://journal.ummat.ac.id/index.php/farmasi/article/view/10728>
- Anggraini, M. P. (2022). *Analisis PCA (Principal Component Analysis) Pada Sidik Jari Kromatografi Lapis Tipis Tumbuhan Anting-Anting (Acalypha Indica L.) dari Daerah Banyuwangi Berdasarkan Berbagai Metode Pengeringan* (Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim). Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang. Retrieved from <http://etheses.uin-malang.ac.id/42460/>
- Artati, A., Widarti, W., Ali Hasan, Z., & Askar, M. (2024). Aktivitas Antioksidan Dari Tiga Fraksi Pelarut Ekstrak Daun Dandang Gendis (EDDG). *Jurnal Media Analis Kesehatan*, 15(2), 132–139. <https://doi.org/10.32382/jmak.v15i2.1159>
- Cieřla, Ł. (2012). Biological Fingerprinting of Herbal Samples by Means of Liquid Chromatography. *Chromatography Research International*, 2012, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/532418>
- Elvira, A. R., Putri, A. R., & Luthfi, A. M. (2024). Detection of Garlic Powder Adulteration Using FTIR Spectroscopy and Chemometrics: A Case Study in an Indonesia Marketplace. *Journal of Food and Pharmaceutical Science*, 2024(3), 169–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.22146/jfps.13328>
- Fitrianti, A. S. (2011). *Diferensiasi Temulawak, Kunyit, dan Bangle Berdasarkan Interpretasi Kromatografi Lapis Tipis Menggunakan Imagej Plat KLT* (Institut Pertanian Bogor). Institut Pertanian Bogor. Retrieved from <https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/52592>
- Gomes, P. W. P., Barretto, H., Reis, J. D. E., Muribeca, A., Veloso, A., Albuquerque, C., ... Silva, M. (2022). Chemical Composition of Leaves, Stem, and Roots of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth. *Molecules*, 27(6). <https://doi.org/10.3390/molecules27061847>
- Handoyo, D. L. Y., & Pranoto, E. M. (2020). Pengaruh Variasi Suhu Pengeringan Terhadap Pembuatan Simplisia Daun Mimba (*Azadirachta Indica*). *Jurnal Farmasi Tinctura*, 1(2), 45–54. Retrieved from <https://journal.ibrahimy.ac.id/index.php/tinctura/article/download/988/830/3468>
- Hayati, E. K., Aulanni'am, Sabarudin, A., Rafi, M., & Karomah, A. H. (2024). LC-HRMS-based metabolomics on *Acalypha indica* with different altitude and antioxidant activity. *South African Journal of Botany*, 172, 710–719. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.07.064>
- Hidayaty, A. N., & Hayati, E. K. (2024). Analisis Sidik Jari Kromatografi Lapis Tipis Secara Kemometrik Daun Tumbuhan Anting-Anting (*Acalypha Indica* L.) Berdasarkan Lokasi Tumbuh. *ALCHEMY: JOURNAL OF CHEMISTRY*, 12(1), 59–67. <https://doi.org/10.18860/al.v12i1.22130>
- Insanu, M., Marliani, L., & Dinilah, N. P. (2017). Comparison of antioxidant activities from four species of piper. *Pharmaciana*, 7(2), 305–312. <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v7i2.6935>
- Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology*, 1(2), 345–358. <https://doi.org/10.1002/cppb.20024>
- Kesuma Sayuti, I., & Yenrina, R. (2015). *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press.

- Khoirunnisa, I., & Patonah. (2025). Review: Pendekatan Metabolomik Dalam Eksplorasi Tanaman Antihipertensi: Profil Senyawa Bioaktif dan Perubahan Metabolit Endogen. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, 50(2), 106–116.
- Kumontoy, G. D., Deeng, D., & Muliati, T. (2023). Pemanfaatan Tanaman Herbal Sebagai Obat Tradisional Untuk Kesehatan Masyarakat di Desa Guaan Kecamatan Mooat Kabupaten Bolaang Mongondow Timur. *Jurnal Holistik*, 16(3), 1–16. Retrieved from <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/holistik/article/view/51250>
- Kurniawati, A. (2019). Pengaruh Jenis Pelarut Pada Proses Ekstraksi Bunga Mawar Dengan Metode Maserasi Sebagai Aroma Parfum. *Journal of Creativity Student*, 2(2), 74–82. <https://doi.org/https://doi.org/10.15294/jcs.v2i2.14587>
- Lembang, T. D., Daniel, C., & Saleh, C. (2020). Uji Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fraksi n-Heksana, Etil Asetat Dan Etanol Sisa Dari Tumbuhan Suruhan (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth) Menggunakan Metode DPPH. *Jurnal Atomik*, 05(1), 37–42.
- Liang, N., Lu, X., Hu, Y., & Kitts, D. D. (2016). Application of Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformed Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy to Determine the Chlorogenic Acid Isomer Profile and Antioxidant Capacity of Coffee Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(3), 681–689. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05682>
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS*. Retrieved from <http://www.pharmrev.org>
- More, G. K., Meddows-Taylor, S., & Prinsloo, G. (2021). Metabolomic Profiling of Antioxidant Compounds in Five *Vachellia* Species. *Molecules*, 26(20). <https://doi.org/10.3390/molecules26206214>
- Nisyak, K., Hisbiyah, A'yunil, & Haqo, A. (2022). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Minyak Atsiri Sirih Hijau Terhadap Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika*, 5. <https://doi.org/10.36932/jpcam.v5i1.82>
- Nurdiansyah, Muliadi, Herteno, R., Kartini, D., & Budiman, I. (2024). Implementasi Metode Principal Component Analysis (PCA) dan Modified K-Nearest Neighbor Pada Klasifikasi Citra Daun Tanaman Herbal. *Jurnal MNEMONIC*, 7(1). <https://doi.org/10.36040/mnemonic.v7i1.6664>
- Nurhaslina, C. R., Andi Bacho, S., & Mustapa, A. N. (2022). Review on drying methods for herbal plants. *Materials Today: Proceedings*, 63, S122–S139. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2022.02.052>
- Owu, N. M., Fatimawali, & Jayanti, M. (2020). Uji Efektivitas Penghambatan Dari Ekstrak Daun Sirih (*Piper Betle* L.) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*. *Jurnal Biomedik:JBM*, 12(3), 145. <https://doi.org/10.35790/jbm.12.3.2020.29185>
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. (2009). *Introduction To Spectroscopy* (4th Ed; L. Lockwood, B. Kirksey, & E. Woods, Eds.). Belmont, Ca: Brooks-Cole.
- Pin, K., Luqman Chuah, A., Rashih, A. A., Mazura, M., Fadzureena, J., & Rasadah, M. (2010). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of extracts of betel leaves (*Piper betle*) from solvents with different polarities. *Journal of Tropical Forest Science*, 22(4), 448–455. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/23616901>
- Puspitasari, L., Mareta, S., & Thalib, A. (2021). Karakterisasi Senyawa Kimia Daun Mint (*Mentha* sp.) dengan Metode FTIR dan Kemometrik. *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 14(1), 5–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.37277/sfj.v14i1.931>
- Rafi, M. (2024). *Perkembangan Terkini Pemisahan Analitik Sebagai Perangkat Analisis Komponen Kimia*. Institut Pertanian Bogor.
- Rahmawati, A. M., Anam, K., & Sasikirana, W. (2023). Review Artikel : Potensi Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Sebagai Antikanker. *Journal of Research in Pharmacy*, 3(1), 27–35. <https://doi.org/https://doi.org/10.14710/genres.v3i1.17197>
- Reich, E., & Schibli, A. (2006). *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. New York: Thieme Medical Publishers.
- Rohmah, J., Saidi, I. A., Rini, C. S., Masyitha, D. A., Ramadhani, D. N., & Wulandari, H. P. (2020). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Etil Asetat, dan n-Heksana Batang Turi Putih (*Sesbania grandiflora* (L.) Pers.) dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl). *Jurnal Kimia Riset*, 5(1), 67–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.20473/jkr.v5i1.20900>
- Royani, A., Mubarak, N. M., Hanafi, M., Verma, C., Lotulung, P. D. N., Prastya, M. E., ... Manaf, A. (2025). Effect of solvent polarity on yield extract, antioxidant and antibacterial activities of phytochemicals from *Andrographis paniculata* leaves. *Indian Chemical Engineer*, 67(1), 1–15. <https://doi.org/10.1080/00194506.2024.2409260>

- Simamora, A. N., & Wening, S. (2021). Kajian Metabolit Sebagai Pendukung Program Pemuliaan Kelapa Sawit. *WARTA Pusat Penelitian Kelapa Sawit*, 26(3), 162–177. <https://doi.org/10.22302/iopri.war.warta.v26i3.66>
- Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: tables and charts* (3. ed). Chichester Weinheim: Wiley.
- Syahrir, M., Yusril, & Sugiarti. (2021). Kajian Potensi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Daun Sirih. *Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat (SNP2M)*, 6, 127–131. Retrieved from <https://jurnal.poliupg.ac.id/index.php/snp2m/article/view/3252>
- Wahyuni, W. T., Saharah, M., Arif, Z., & Rafi, M. (2020). Thin Layer Chromatographic Fingerprint and Chemometrics Analysis for Identification of *Phyllanthus niruri* from its Related Species. *Journal of the Indonesian Chemical Society*, 3(1), 47. <https://doi.org/10.34311/jics.2020.03.1.47>
- Winangsih, Prihastanti, E., & Parman, S. (2013). Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kualitas Simplisia Lempuyang Wangi (*Zingiber aromaticum* L.). *Buletin Anatomi Dan Fisiologi*, 21, 19–25. Retrieved from <https://www.neliti.com/id/publications/60337/pengaruh-metode-pengeringan-terhadap-kualitas-simplisia-lempuyang-wangi-zingiber>
- Zaneta, D., & Ferdinal, F. (2023). Analisis Sidik Jari, Kapasitas Total Antioksidan Serta Uji Fitokimia Pada Ekstrak Metanol Daun Sirih (*Piper Betle* L.). *Jurnal Kesehatan Tambusai*.