

Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH dan Kandungan Fenol Total dalam Minyak Atsiri Daun Sirih Hijau

Determination of Antioxidant Activity by DPPH Method and Total Phenolic Content in Green Betel Leaves Essential Oil

Grace Joy Christiani^{a)}, Ellsya Angeline Rawar^{a)*}, Novena Adi Yuhara^{a)}

^{a)}Fakultas Farmasi, Universitas Kristen Immanuel Yogyakarta, Indonesia

Article info:

Received Date : 09/08/2023

Revised Date : 22/10/2023

Accepted Date : 30/10/2023

Keywords:

Sirih Hijau (*Piper betle* L.)

Daun

Fenol

Antioksidan

Minyak atsiri

Corresponding Authors*:

Ellsya Angeline Rawar

Fakultas Farmasi

Universitas Kristen Immanuel Yogyakarta

Jl. Solo Km 11,1, Yogyakarta

e-mail: ellsya@ukrimuniversity.ac.id

Abstrak

Sirih hijau telah dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional dan menginang. Golongan senyawa yang terkandung dalam daun sirih hijau beranekaragam, salah satunya adalah minyak atsiri sebesar 0,8-1,8 %. Fenol adalah salah satu jenis golongan senyawa dalam minyak atsiri yang berpotensi sebagai antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah menentukan aktivitas antioksidan dan kadar fenol total dalam minyak atsiri daun sirih hijau. Distilasi uap-air digunakan untuk mengisolasi minyak atsiri dalam daun sirih hijau. Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan, sedangkan metode kolorimetri dengan reagen Folin-Ciocalteu digunakan untuk menentukan kandungan fenol total. Rendemen dari hasil isolasi minyak atsiri dalam daun sirih hijau dengan distilasi uap-air adalah 0,1% dengan kandungan fenol total sebesar 595,4 mg GAE/100 gram dan aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 5,67 µg/mL. Minyak atsiri daun sirih hijau mengandung golongan senyawa fenol dan dapat menjadi alternatif sumber antioksidan.

Abstract

Green betel is usually used in traditional medicine and herbs. There are various compound classes contained in green betel leaves, one of which is essential oil amounting to 0.8-1.8%. Phenol is a compound class in essential oils that has the potential to act as an antioxidant. This research aimed to determine the antioxidant activity and total phenol content in green betel leaves essential oil. Steam-water distillation was used to isolate essential oils in green betel leaves. The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method was used to test antioxidant activity, while the colourimetric method with Folin-Ciocalteu reagent was used to determine the total phenol content. The yield from the isolation of essential oils in green betel leaves using steam-water distillation was 0.1% with a total phenol content of 595.4 mg GAE/100 grams sample and antioxidant activity with an IC₅₀ value of 5.67 µg/mL. Green betel leaves essential oil contains phenolic compound class and could be an alternative source of antioxidants.

PENDAHULUAN

Sirih dikenal masyarakat dengan bentuk tanamannya yang tumbuh menjalar atau merambat di dinding, tiang, dan batang pohon (Kusuma et al., 2017). Sirih hijau (*Piper betle* L.) merupakan jenis sirih yang paling banyak digunakan. Selain digunakan untuk menginang, daun sirih hijau juga digunakan sebagai obat tradisional secara turun-temurun untuk menghentikan pendarahan, menyembuhkan luka, mengobati gatal, serta sebagai obat kumur dan obat penenang (Rivai et al., 2014). Daun sirih hijau mengandung gula, asam amino, vitamin B1, asam askorbat, asam nikotinat, karoten, dan minyak atsiri (Primadimanti, Amura, and Ulfa, 2020). Kandungan minyak atsiri dalam sirih hijau sebesar 0,8-1,8 %.

Minyak atsiri dapat diperoleh dari bunga, daun, biji, akar, buah, dan kulit batang dari tanaman dengan cara distilasi, ekstraksi, pengepresan, atau kompresi enzimatis (Saraswati, Palupi, and Eka, 2018). Metode distilasi atau penyulingan terbagi dalam 3 jenis metode yaitu distilasi uap, distilasi air, dan distilasi uap-air. Distilasi uap-air cocok untuk bahan-bahan seperti rumput, biji-bijian, dan daun. Kelebihan dari distilasi uap-air adalah dapat menghasilkan minyak atsiri lebih cepat dan optimal (Suryani, 2020).

Salah satu golongan senyawa yang terkandung dalam minyak atsiri adalah fenol. Kandungan fenol total dalam ekstrak etanol 70% dari daun sirih merah adalah 157,61 mg GAE/g, dalam ekstrak metanol daun sirih hijau adalah 165,45 ppm, dan dalam ekstrak etanol daun sirih hijau adalah 19,42 mg GAE/g sampel (Andriani dan Murtisiwi, 2018; Prayitno, Kusnadi, and Murtini, 2018; Primadimanti, Amura, and Ulfa, 2020). Kandungan fenol total dalam minyak atsiri daun sirih hijau belum pernah ditetapkan. Fenol merupakan antioksidan alami yang terkandung dalam tumbuhan (Maulidha, Fridayanti, dan Masruhim, 2015). Mekanisme aksi fenol sebagai antioksidan adalah membentuk senyawa kompleks radikal fenoksi yang stabil dalam reaksi oksidasi dengan radikal bebas (Husain et al., 2023). Golongan senyawa fenol memiliki kemampuan antioksidan yang potensial dan beberapa telah terbukti lebih efektif daripada vitamin E, asam askorbat, dan karotenoid (Fitria, 2020). Tanaman sirih memiliki aktivitas antioksidan, misalnya ekstrak metanol sirih hitam memiliki nilai IC_{50} sebesar 158,53 ppm, ekstrak metanol daun sirih kuning memiliki nilai IC_{50} sebesar 33,355 ppm, sedangkan ekstrak terpurifikasi sirih merah memiliki nilai IC_{50} sebesar 53,91 ppm (Maulidha et al., 2015). Aktivitas antioksidan dalam daun sirih hijau telah dilakukan dalam bentuk sediaan infusa dengan nilai IC_{50} sebesar 22,809 mg trolox/gram

ekstrak (Suarantika, Patricia, and Rahma, 2023). Dalam bentuk minyak atsiri, daun sirih merah memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 136,947 ppm. Penentuan aktivitas antioksidan dalam minyak atsiri daun hijau belum pernah dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah menentukan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan kandungan fenol total dalam minyak atsiri daun sirih hijau dengan menggunakan metode kolorimetri.

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik (Ohaus, Amerika), spektrofotometer UV-Vis (B-One, China), blender, vortex (B-One, China), sentrifugasi, alat distilasi, mikropipet, dan peralatan gelas laboratorium lainnya. Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang digunakan berasal dari Berbah, Sleman, Yogyakarta, dan sudah dideterminasi di Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan (SPT) Fakultas Biologi UGM dengan No.0358/S.Tb/VII/2023. Bahan kimia yang digunakan adalah pereaksi Folin-Ciocalteu (Merck, Germany), besi (III) klorida (Merck, Germany), etanol p.a (Fulltime), metanol p.a (Fulltime), 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH) (Merck, Germany), natrium karbonat (Merck, Germany), natrium sulfat (Merck, Germany), dan akuades.

Isolasi Minyak Atsiri

Daun sirih hijau dipisahkan dari batang dan ranting, disortasi basah menggunakan air mengalir, ditiriskan, kemudian dipotong dengan gunting sehingga menjadi potongan daun yang lebih kecil. Potongan daun sirih hijau ditimbang sebanyak 3 kg kemudian diambil minyak atsirinya dengan distilasi uap-air dengan 10 liter akuades dalam suhu 100°C. Proses distilasi dilakukan sampai minyak atsiri tidak menetes lagi, kemudian minyak atsiri dipisahkan dengan air dengan menggunakan natrium sulfat (Widayani & Cahyono, 2018).

Uji Kualitatif Fenol

Analisis kualitatif golongan senyawa fenol dilakukan dengan menggunakan larutan uji $FeCl_3$. Proses pengujian diawali dengan 2 tetes minyak atsiri ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah 1 tetes larutan $FeCl_3$. Sampel dihomogenkan dengan vortex kemudian diamati. Jika terbentuk warna coklat kehitaman atau hijau kehitaman, hal ini menunjukkan bahwa dalam sampel mengandung golongan senyawa fenol (Fitria, 2020).

Uji Kuantitatif Fenol Total

Uji kuantitatif fenol total merupakan modifikasi dari metode penelitian yang digunakan (Primadhamanti *et al.*, 2020). Kadar larutan induk baku asam galat yang digunakan adalah 100 µg/mL. Reagen yang digunakan adalah larutan Na₂CO₃ 7,5% yang dibuat dengan cara melarutkan 3,75 gram Na₂CO₃ dalam akuades pada labu ukur 50 mL dan larutan Folin-Ciocalteu (1:10) dibuat dengan cara mencampurkan reagen Folin-Ciocalteu dengan akuades dengan perbandingan 1:10. Seri kadar larutan baku asam galat dibuat dengan 5 titik kadar dari rentang kadar 60 sampai 100 µg/mL. Larutan sampel minyak atsiri yang digunakan adalah 100 µL/mL yang dibuat dengan cara melarutkan 2,5 µL minyak atsiri dengan 250 µL etanol p.a sebagai kosolven hingga larut sempurna, lalu ditambahkan akuades hingga batas tanda pada labu ukur 25 mL. Dari masing-masing larutan baku dan larutan sampel, diambil 300 µL ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan Folin-Ciocalteu (1:10) sebanyak 1,5 mL, dihomogenkan dengan vortex, lalu didiamkan pada suhu kamar selama 3 menit. Selanjutnya, larutan Na₂CO₃ sebanyak 1,2 mL ditambahkan ke dalam tabung reaksi, lalu didiamkan pada suhu kamar selama 60 menit. Serapan larutan diukur pada panjang gelombang maksimum 766 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Dari seri kadar larutan baku asam galat, dilakukan regresi linier sehingga didapatkan persamaan kurva baku yang akan digunakan untuk menghitung kadar fenol total dalam sampel.

Penentuan Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan metode yang dilakukan Suhaling (2012) dengan sedikit modifikasi. Larutan stok DPPH 50 µg/mL dibuat dengan DPPH baku 5,0 mg ditimbang lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas. Larutan kontrol negatif dibuat dengan mencampurkan 2 mL DPPH 50 µg/mL dan 2 mL metanol p.a di dalam tabung reaksi. Larutan induk baku asam askorbat dibuat dengan menimbang 2,5 mg baku asam askorbat kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan dan dibuat seri kadar 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 µg/mL. Larutan sampel dibuat dengan cara mengambil 25 µL larutan minyak atsiri daun sirih hijau, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas kemudian dihomogenkan dan dibuat 5 titik seri kadar dari 2 hingga 10 µg/mL. Larutan kontrol negatif, baku asam askorbat dan larutan sampel diambil masing-masing sebanyak 2 mL larutan lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil yang dibungkus dengan aluminium foil, kemudian ditambahkan 2 mL

larutan DPPH. Masing-masing larutan di-vortex selama 10 detik kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit. Setelah diinkubasi, serapan dibaca pada panjang gelombang 517 nm dengan instrumen spektrofotometri UV-Vis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Minyak Atsiri Daun Sirih Hijau

Daun sirih hijau yang digunakan dalam isolasi minyak atsiri adalah daun yang terletak dari bagian tengah ke arah pangkal batang sehingga umur daun cukup tua untuk mendapatkan kadar minyak atsiri yang optimal (Tripathi dan Hazarika, 2014). Isolasi minyak atsiri dari daun sirih hijau dapat dilakukan dengan teknik distilasi. Teknik distilasi yang digunakan adalah distilasi uap-air karena dapat efektif dalam menghasilkan volume minyak atsiri yang optimal untuk bahan yang berbentuk rumput, biji, dan daun. Distilasi uap-air ini menggunakan saringan yang berlubang untuk memisahkan antara air yang berada di bawah saringan dengan ketinggian mencapai sedikit di bawah saringan dan bahan yang didistilasi yang berada di atas saringan. Air yang berada di bawah saringan dapat dipanaskan dengan uap jenuh dengan tekanan tertentu atau dipanaskan langsung dengan api. Kelebihan distilasi uap-air ini adalah sampel tidak langsung kontak dengan air sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan senyawa akibat reaksi hidrolisis. Selain itu, sampel tidak mudah menggumpal apabila kontak dengan air panas dan penguraian minyak lebih kecil. Dari hasil isolasi dengan distilasi uap-air, minyak atsiri daun sirih hijau yang didapatkan berwarna kuning jernih dengan rendemen sebesar 0,1%. Gambar 1 menunjukkan penampilan dari minyak atsiri yang didapatkan.



Gambar 1. Minyak Atsiri Daun Sirih Hijau

Analisis Kualitatif Fenol

Golongan senyawa fenol merupakan komponen yang memiliki aktivitas antioksidan dan merupakan kelompok fitokimia terbesar pada tumbuhan dengan kemampuan meregenerasi oksigen aktif, karena pada cincin aromatik mengandung gugus hidroksil yang berperan sebagai donor elektron (Primadhamanti *et al.*, 2020). Analisis kualitatif fenol digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan golongan senyawa fenol dalam suatu sampel. Pereaksi yang

digunakan adalah larutan FeCl_3 yang dapat bereaksi dengan golongan senyawa fenol dalam minyak atsiri membentuk senyawa kompleks yang berwarna hijau kehitaman. Hasil positif yang menunjukkan adanya golongan senyawa fenol pada sampel jika terbentuk warna merah, hijau, biru ungu, atau hitam. Gambar 2 menunjukkan adanya warna hijau kehitaman sehingga minyak atsiri daun sirih hijau mengandung golongan senyawa fenolik.



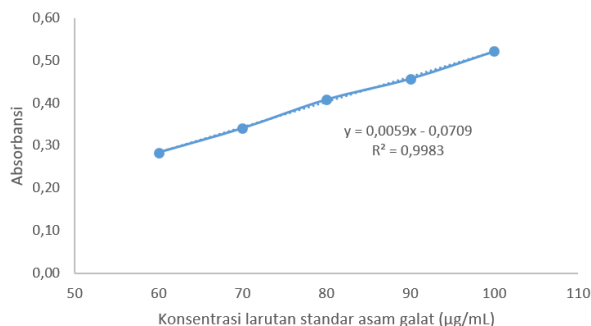
Gambar 2. Hasil Analisis Kualitatif Fenol

Analisis kuantitatif fenol total

Kandungan fenol total dalam minyak atsiri ditentukan kadarnya dengan menggunakan metode kolorimetri dengan pereaksi Folin-Ciocalteu karena reagen tersebut dapat bereaksi dengan golongan senyawa fenol membentuk larutan yang dapat diukur serapannya. Instrumen yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 766 nm. Asam galat digunakan sebagai baku karena asam galat merupakan golongan senyawa polifenol turunan dari asam benzoat hidrosiklik yang dapat dimurnikan dan bersifat stabil. Larutan natrium karbonat memberikan suasana basa sehingga asam galat maupun golongan senyawa fenol yang terkandung dalam minyak atsiri daun sirih hijau dapat bereaksi dengan pereaksi Folin Ciocalteu menghasilkan perubahan warna larutan menjadi biru. Inkubasi dilakukan sehingga reaksi antara senyawa golongan senyawa fenol dan reagen dapat berlangsung secara optimal.

Fenol merupakan golongan senyawa dengan anggota yang memiliki tingkat kepolaran yang beragam dari polar, semi polar, hingga non polar. Pada umumnya, golongan senyawa fenol ini larut dalam pelarut polar seperti pelarut organik yaitu metanol dan etanol. Minyak atsiri daun sirih hijau mengandung beberapa senyawa, antara lain kariofilena, isoeugenol, dan α -kubebena (Rahmawati, Mujahid, and Widiyastuti, 2020). Pada umumnya minyak atsiri tidak larut dalam air, namun minyak atsiri dapat larut dalam air dengan konsentrasi yang kecil misalnya kelarutan eugenol dalam air sebesar 0,64 g/liter atau setara dengan 640 ppm pada suhu 25 °C (Chen dkk., 2014). Oleh

karena itu, dalam proses preparasi larutan induk sampel konsentrasi sampel yang digunakan kecil yaitu 100 ppm. Etanol p.a digunakan sebagai kosolven yang dapat membantu melarutkan minyak atsiri sehingga golongan senyawa dalam minyak atsiri yang bersifat polar dan semi polar dapat larut. Persamaan kurva baku asam galat menggunakan seri kadar dengan 5 titik yang berada pada rentang kadar 60 sampai dengan 100 $\mu\text{g/mL}$ ditunjukkan oleh gambar 3.



Gambar 3. Grafik Kurva Regresi Linier Asam Galat

Pengukuran serapan dari asam galat berguna untuk menentukan kadar fenol total dalam sampel menggunakan kurva kalibrasi dengan persamaan kurva baku $y = 0,0059x - 0,0709$ dengan nilai koefisien determinasi (r^2) sebesar 0,9983. Persamaan kurva baku yang diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan kandungan fenol total dari sampel. Tabel 1 menunjukkan data absorbansi sampel dari instrumen spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 766 nm. Hasil pengujian kadar fenol total dalam minyak atsiri daun sirih hijau sebesar 595,40 mg GAE/100 gram. Kandungan fenol total dalam minyak atsiri daun sirih hijau lebih kecil daripada kandungan fenol total dalam ekstrak etanol 70% daun sirih merah adalah 157,61 mg GAE/g. Hal ini disebabkan karena fenol bersifat semi polar sehingga lebih larut dalam pelarut organik seperti etanol dan metanol.

Aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan yang digunakan adalah peredaman DPPH terhadap radikal bebas. Nilai IC_{50} digunakan sebagai parameter untuk menentukan kekuatan antioksidan. Nilai IC_{50} (*inhibitory concentration*) merupakan kadar larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas. Semakin rendah nilai IC_{50} maka nilai antioksidan semakin kuat. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur larutan kontrol positif yaitu larutan asam askorbat. Seri kadar yang dilakukan untuk larutan kontrol positif yaitu 0,5 hingga 2,5 $\mu\text{g/mL}$, seri kadar

tersebut dibaca serapannya pada panjang gelombang 517 nm. Tabel 2 menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar asam askorbat maka nilai absorbansi semakin rendah dan nilai persentase penghambatan (IC) juga semakin meningkat. Setelah data persen inhibisi diperoleh, selanjutnya dibuat grafik untuk memperoleh persamaan kurva baku yang digunakan untuk menentukan jumlah kandungan antioksidan pada sampel. Persamaan kurva baku antara kadar dengan persen inhibisi yaitu $y = 13,078x + 5,2519$ dengan koefisien korelasi (r) adalah 0,9601. Asam askorbat sebagai

antioksidan menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 4,22 $\mu\text{g/mL}$.

Tabel 1. Data Serapan Minyak Atsiri Daun Sirih Hijau

Pengulangan	Serapan	Kadar	
		Gallic Acid Ekuivalen (mg GAE / 100 g)	Rata-rata Kadar
1	0,492	594,58	
2	0,494	596,34	595,40
3	0,493	595,28	

Tabel 2. Data Persentase Penghambatan Asam Askorbat

Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Serapan	Rata-Rata Serapan	% IC	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
0,5	0,699	0,701	1,96	4,22
	0,701			
1	0,702	0,650	9,10	
	0,660			
	0,656			
1,5	0,633	0,627	12,27	
	0,630			
	0,637			
2	0,614	0,582	18,61	
	0,582			
	0,581			
2,5	0,582	0,501	29,90	
	0,504			
	0,505			
	0,494			

Keterangan : masing-masing kadar dilakukan replikasi 3 kali untuk mendapatkan data absorbansi

Untuk melihat aktivitas antioksidan pada sampel dibuat 5 titik seri kadar 2 hingga 10 $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji aktivitas antioksidan pada sampel ditunjukkan oleh tabel 3. Nilai IC_{50} yang dihasilkan yaitu 5,67 $\mu\text{g/mL}$ sehingga sampel yang digunakan termasuk dalam antioksidan sangat kuat karena nilai IC_{50} yang dihasilkan masuk dalam rentang kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$. Aktivitas antioksidan dalam daun sirih hijau lebih kuat dibandingkan dengan jenis sirih lainnya, hal ini dapat dilihat pada penelitian yang dilakukan oleh Widayani & Cahyono (2018), ditemukan bahwa minyak atsiri daun sirih merah memiliki aktivitas antioksidan sedang karena memiliki nilai IC_{50} sebesar 136,947 $\mu\text{g/mL}$, begitu juga dengan pada penelitian yang dilakukan oleh Maulidha *et al.* (2015), ditemukan bahwa ekstrak daun sirih hitam memiliki aktivitas antioksidan lemah karena memiliki nilai IC_{50} sebesar 158,530 $\mu\text{g/mL}$. Minyak atsiri daun sirih hijau juga memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan dengan jenis sediaan sirih hijau lainnya, dapat dilihat pada penelitian yang

dilakukan oleh Zulfah (2021), ditemukan bahwa ekstrak daun sirih hijau mempunyai aktivitas antioksidan sangat kuat karena memiliki nilai IC_{50} sebesar 2,0375 $\mu\text{g/mL}$, dan pada penelitian yang dilakukan oleh Nastiti *et al.* (2021), ditemukan bahwa infusa daun sirih hijau memiliki aktivitas antioksidan sedang karena memiliki nilai IC_{50} sebesar 128 $\mu\text{g/mL}$.

KESIMPULAN

Distilasi uap-air dapat digunakan untuk memperoleh minyak atsiri dari daun sirih hijau dengan rendemen sebesar 0,1%. Aktivitas antioksidan yang dimiliki minyak atsiri tersebut ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar 5,67 $\mu\text{g/mL}$. Kadar fenol total dalam minyak atsiri sebesar 595,40 mg GAE/100 gram ikut berkontribusi dalam aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh minyak atsiri daun sirih hijau. Aktivitas farmakologis minyak atsiri daun sirih hijau yang berkaitan dengan antioksidan dapat diteliti lebih lanjut.

Tabel 3. Data Persentase Penghambatan Minyak Atsiri Daun Sirih Hijau

Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Serapan	Rata-Rata Serapan	% IC	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
2	0,517	0,512	28,40	5,67
	0,516			
	0,502			
4	0,414	0,409	42,72	
	0,412			
	0,402			
6	0,340	0,336	53,03	
	0,335			
	0,332			
8	0,242	0,241	66,32	
	0,241			
	0,239			
10	0,232	0,230	67,86	
	0,230			
	0,227			

Keterangan: masing-masing kadar dilakukan replikasi 3 kali untuk mendapatkan data absorbansi

DAFTAR PUSTAKA

- Andriani, D., & Murtisiwi, L., 2018, Penetapan Kadar Fenol Total Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Dengan Spektrofotometri Uv Vis, *Cendekia Journal of Pharmacy*, 2(1):32–38, <https://doi.org/10.31596/cjp.v2i1.15>.
- Chen, H., Davidson, P.M., Zhong, Q., 2014, Impacts of Sample Preparation Methods on Solubility and Antilisterial Characteristics of Essential Oil Components in Milk, *Applied and Environmental Microbiology*, 80:907–916.
- Dzulhijar, Situmeang, B., Ibrahim A.M., Muamaliyah, E., Amin, F., Mahardika, M., Susparini, N.T., Bialangi, N., Musa, W.J.A., 2022, Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Sirih Kuning (*Piper betle*), *J-Medsains*, 2(1): 1-8.
- Fitria, E.H.N., 2020, Penentuan Kadar Fenolat Total Ekstrak Etanol Daun, Batang dan Akar Tutup Bumi (*Elephantopus mollis* Kunth) Secara Spektrofotometer UV-Vis, 'Skripsi', Universitas Perintis Indonesia, Padang.
- Husain, F., Yunus, F.A.M., & Basri, I.F., 2023, Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Fenol Totalik pada Ekstrak Teripang (Holothroidea), *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 8(2):695–704, <https://doi.org/10.37874/ms.v8i2.665>.
- Januarti, I.B., Wijayanti, R., Wahyuningsih S., Nisa, Z., 2019, Potensi Ekstrak Terpurifikasi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) sebagai Antioksidan dan Antibakteri, *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 02:60-68, <https://doi.org/10.20961/jpscr.v4i2.27206>.
- Kusuma, M., Susilorini, T., & Surjowardojo, P., 2017, Pengaruh Lama dan Suhu Penyimpanan Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn) dengan Aquades terhadap Daya Hambat Bakteri *Streptococcus Agalactiae* Penyebab Mastitis pada Sapi Perah, *Ternak Tropika: Journal of Tropical Animal Production*, 18(2):14–21, <https://doi.org/10.21776/ub.jtapro.2017.018.02.3>
- Maulidha, N., Fridayanti, A., & Masruhim, M.A., 2015, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Sirih Hitam (*Piper* sp.) terhadap DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picryl Hydrazyl), *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 1(1):16–20, <https://doi.org/10.25026/jsk.v1i1.4>
- Nastiti, K., Noval, & Darini, K., 2021, Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Infusa Daun Sirih (*Piper betle* L), Ekstrak Etanolik Tanaman Bundung (*Actinuscirpus grossus*) dan Kulit Jeruk nipis (*Citrus surantifolia*), *Jurnal Surya Medika*, 7:115–122.
- Prayitno, S.A., Kusnadi, J., Murtini, E.S., 2018, Karakteristik (Total Flavonoid, Total Fenol, Aktivitas Antioksidan) Ekstrak Serbuk Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz&Pav.), *Foodscitech*, 1(2):26-34.
- Primadimanti, A., Amura, L., & Ulfa, A.M., 2020, Analisis Senyawa Fenolik Pada Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.), *Jurnal Farmasi Malahayati*, 3(1):23–31. <https://doi.org/10.33024/jfm.v3i1.2363>.
- Rahmawati, N., Mujahid, R., & Widiyastuti, Y., 2020, *Budidaya dan Manfaat Sirih untuk Kesehatan*, Jakarta: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI, 1–122.
- Rivai, H., Nanda, P.E., & Fadhillah, H., 2014, Pembuatan dan Karakterisasi Ekstrak Kering Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.). *Jurnal Farmasi Higea*, 6(2):133–144.
- Saraswati, A., Palupi, S., Eka, N.I., 2018, Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Minyak Atsiri Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Berasal dari Kupang, NTT, *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*, 7(2):1640–1659.
- Suarantika, F., Patricia, V.M., Rahma, H., 2023, Optimasi Proses Ekstraksi Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) yang Memiliki Aktivitas Antioksidan Berdasarkan Penggunaan secara Empiris, *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 9(1):16-21, <https://doi.org/10.36733/medicamento.v9i1.5253>.
- Suhaling, S., 2012, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dengan Metode DPPH, 'Skripsi', UIN-Allaudin, Makassar.
- Suryani, E., 2020, Perbandingan Kualitas Minyak Atsiri (*Patchouli Oil*) dari Tanaman Nilam Menggunakan Metode Distilasi Air, Distilasi Uap-air dan Distilasi Uap Langsung, 'Skripsi', UIN-Allaudin, Makassar.
- Tripathi, Y.C. & Hazarika, P., 2014, Impact of Harvesting Cycle, Maturity Stage, Drying and Storage on Essential Oil Content of Patchouli Leaves Grown in Northeast Region of India, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(6): 1389-1396, DOI: 10.1080/0972060X.2014.1001189.

Widayani, A., & Cahyono, E., 2018, Isolasi dan Uji Antioksidan Minyak Atsiri Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) pada Minyak Goreng Curah, *Indonesian Journal of Chemical Science*, 7(3): 214–220, <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ijcs>.

Zulfah, M., 2021, Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*), 'Skripsi', Politeknik Harapan Bersama, Tegal.