

4. PEMBAHASAN

Sambiloto adalah salah satu tanaman yang banyak digunakan sebagai obat tradisional, tidak hanya di Indonesia, tetapi juga di beberapa negara Asia lainnya, seperti Cina, India, Thailand, dan Malaysia (Mussard *et al.*, 2019). Sambiloto memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi, yang membuat tumbuhan ini dapat tumbuh dan berkembang dengan baik dalam berbagai jenis tanah dan topografi, curah hujan 2000-3000 mm/tahun, dan dapat tumbuh optimal dengan pH tanah 6-7 (netral) (Prihatini *et al.*, 2020). Sambiloto sendiri dikenal sebagai salah satu tumbuhan yang memiliki efek antikanker, antibakteri, antidiabetes, analgesic, antiinflamasi, kesehatan reproduksi, dan efek pada tekanan darah (Cahyawati, 2021).

Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) adalah metode ekstraksi non termal yang meningkatkan laju transfer massa dan memecahkan dinding sel dengan menghasilkan banyak *microcavity*. Hal ini akan mempersingkat waktu yang dibutuhkan dan mengoptimalkan pelarut yang digunakan. Selain mempersingkat waktu dan mengoptimalkan pelarut, UAE juga dapat membantu menjaga struktur ekstrak sehingga tidak terjadi kerusakan saat dikeluarkan dari matriks. Penggunaan UAE dilakukan pada suhu yang rendah sehingga mencegah hilangnya senyawa yang memiliki titik didih rendah (Handaratri & Yuniati, 2019). Metode UAE telah digunakan dalam berbagai proses ekstraksi senyawa fitokimia, seperti alkaloid, flavonoid, protein, polisakarida, minyak esensial, antioksidan, dan pigmen warna (Widyasanti *et al.*, 2018). Menurut penelitian dari Budiastra *et al.* (2020), hasil ekstraksi dengan metode UAE mampu meningkatkan hasil rendemen sebesar 52% dibandingkan metode maserasi. Selain itu, ekstraksi dengan UAE juga menghasilkan mutu kimia yang lebih murni dibandingkan metode maserasi, tetapi menghasilkan mutu fisik, yaitu bobot jenis dan warna yang sama.

Ada beberapa faktor yang berpengaruh terhadap jalannya ekstraksi menggunakan UAE, seperti suhu dan waktu (Widyapuri *et al.*, 2022). Dalam penelitian ini, kedua variabel tersebut diamati dengan 3 tingkat perlakuan, yaitu suhu 30 °C, 40 °C, dan 50 °C, serta waktu 5, 10, dan 15 menit. Kemudian, parameter yang dianalisis adalah aktivitas antioksidan, total flavonoid, dan warna.

4.1. Aktivitas Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang memiliki manfaat dalam menangkal dan meredam efek negatif yang disebabkan oleh oksidan dalam tubuh. Cara kerja dari antioksidan adalah dengan melakukan donor salah satu elektronnya kepada senyawa yang oksidatif. Hal ini dapat menghambat aktivitas dari senyawa oksidan (Zulaikhah, 2017).

Antioksidan sendiri terbagi menjadi dua, yaitu antioksidan enzim dan non-enzim. Contoh dari antioksidan enzim adalah enzim superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPx), dan katalase (CAT). Sedangkan, antioksidan non-enzim banyak berada pada buah-buahan dan sayuran dalam bentuk flavonoid, vitamin C, E, beta karoten, isoflavon, dan sebagainya (Zulaikhah, 2017).

Menurut Mussard *et al.* (2019), Sambiloto mengandung banyak komponen bioaktif, termasuk diterpen lakton (andrografolida, deoksiandrografolida, neoandrografolida, dan 14-deoksi-11, 12-didehidroandrografolida), diterpen glikosida, dan flavonoid. Pada tahun 1951, ditemukan bahwa komponen aktif utama dari sambiloto berasal dari andrografolida dan merupakan sumber dari rasa pahit yang ada pada sambiloto. Beberapa efek dari sambiloto adalah anti-virus, antitrombotik, hepatoprotektif, anti kanker, dan anti inflamasi.

Salah satu metode yang digunakan dalam mendeteksi aktivitas antioksidan adalah metode DPPH (*diphenyl picryl hydrazine*). Keuntungan dari penggunaan metode ini adalah mudah, cepat, peka, dan hanya memerlukan sedikit sampel (Rachmani *et al.*, 2018). Prinsip kerja dari metode DPPH adalah menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu dari DPPH yang berbanding lurus dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH. Hal ini merupakan reaksi antara molekul 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl dengan atom hidrogen yang berasal dari sampel sehingga membentuk senyawa 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyn dan terjadilah peluruhan warna oleh DPPH dari ungu menjadi kuning (Rachmani *et al.*, 2018). Klasifikasi aktivitas antioksidan adalah kurang dari 20% tergolong rendah, 20-50% tergolong sedang, 50-90% tergolong tinggi, dan lebih dari 90% tergolong sangat tinggi (Saefudin *et al.*, 2013).

Sebelum penelitian dimulai, ekstrak sambiloto dilarutkan kedalam metanol terlebih dahulu dengan pengenceran 10 kali. Hal ini dilakukan karena andrografolida sukar larut di dalam air, tetapi larut di dalam metanol sehingga pelarutan menggunakan metanol dapat melarutkan andrografolida dari ekstrak (Mussard *et al.*, 2019). Penelitian penggunaan air dan metanol sebagai solven juga pernah dilakukan oleh Rao & Rathod (2015) dan ditemukan bahwa hasil ekstraksi sambiloto menggunakan air memberikan hasil ekstrak andrografolida paling rendah dibandingkan solven lainnya, sedangkan metanol memberikan hasil terbaik karena polaritasnya yang tinggi dan viskositas yang rendah. Penggunaan pelarut air di dalam penelitian ini berfungsi untuk mempermudah penelitian selanjutnya dalam pembuatan produk bahan jadi. Setelah itu, ekstrak ditambahkan dengan larutan DPPH 0,1mM. DPPH adalah radikal bebas yang stabil karena elektron yang ada pada DPPH dapat terdelokalisasi pada molekulnya. DPPH yang ditambahkan dengan metanol akan membuat larutan berwarna ungu yang akan berubah menjadi kuning dengan adanya antioksidan yang memberikan elektronnya (Saefudin *et al.*, 2013). Larutan kemudian diinkubasi selama 35 menit. Inkubasi berfungsi untuk membuat larutan DPPH dan ekstrak bereaksi dengan baik (Supringrum & Jubaidah, 2019). Larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada gelombang 516 nm.

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan, terjadi perbedaan yang signifikan dari variabel suhu dan waktu. Total aktivitas antioksidan yang terbesar ada pada suhu 40 °C dan waktu 10 menit dengan nilai 60%. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rao & Rathod (2015) dan Rubi *et al.* (2020), hasil dari penelitian tersebut mengatakan bahwa ekstraksi andrografolida dari sambiloto yang terbaik menggunakan UAE ada pada suhu 40 °C dan waktu 10 menit. Andrografolida sendiri adalah senyawa aktif utama yang berada pada semua bagian sambiloto (Yunita, 2021). Pada bagian daun sambiloto memiliki komponen bioaktif andrografolida paling tinggi sebesar 2,5-4,8% dari berat keringnya (Susanti *et al.*, 2016). Hasil ini juga tidak berbeda jauh dari plot model yang dihasilkan oleh analisis RSM. Pada Gambar 4, menunjukkan plot model aktivitas antioksidan dengan batas bawah 46% dan batas atas 60%. Berdasarkan plot model tersebut, kita dapat melihat bahwa titik optimum aktivitas

antioksidan berada pada suhu 40 °C dan waktu 10 menit. Titik optimum yang lebih spesifik dapat kita lihat pada Tabel 7 dengan hasil suhu 41,62 °C dan waktu 9,84 menit.

Peningkatan suhu yang dilakukan dalam UAE dapat meningkatkan kelarutan senyawa aktif dalam pelarut, mengurangi viskositas dan densitas dari pelarut yang mempengaruhi peningkatan perpindahan massa dan membuat hasil ekstraksi meningkat. Namun, pada suhu yang lebih rendah, gelembung yang terbentuk lebih sedikit, tetapi memiliki intensitas yang tinggi saat gelembung tersebut pecah. Sebaliknya, pada suhu yang tinggi, gelembung yang terbentuk lebih banyak, tetapi intensitas yang diberikan rendah sehingga mengurangi kavitas (Rao & Rathod, 2015). Kedua hal ini dapat menjadi salah satu penyebab hasil ekstraksi yang lebih rendah pada suhu 30 °C dan 50 °C. Selain itu, faktor lain yang menyebabkan menurunnya aktivitas antioksidan adalah pada suhu rendah senyawa bioaktif belum sepenuhnya terekstrak dan pada suhu tinggi senyawa bioaktif mengalami kerusakan oksidatif sehingga menurunkan aktivitas antioksidan dalam proses ekstraksi (Andriani *et al.*, 2019).

Pada variabel waktu, terjadi kenaikan aktivitas antioksidan dari waktu 5 menit hingga 10 menit. Hal ini terjadi karena semakin lama waktu ekstraksi, maka kesempatan bahan untuk bersentuhan dengan pelarut akan semakin besar sehingga meningkatkan komponen bioaktif yang terekstrak (Yuliantari *et al.*, 2017). Sebaliknya, pada waktu 10 hingga 15 menit terjadi penurunan aktivitas antioksidan. Menurut Yuliantari *et al.* (2017), waktu ekstraksi yang melampaui waktu optimum akan merusak komponen bioaktif akibat ekstrak terhidrolisis.

Ekstraksi menggunakan UAE diketahui memiliki beberapa kelebihan, terutama pada kecepatan waktu, mengoptimalkan penggunaan pelarut, dan mencegah kerusakan dari suhu tinggi (Handaratri & Yuniati, 2019). Selain itu, menurut Budiastra *et al.* (2020), ekstraksi menggunakan UAE dapat meningkatkan hasil rendemen sebesar 52% dibandingkan metode maserasi. Hal ini juga sesuai dengan hasil penelitian dari Apriliani & Tukiran (2021) yang menuliskan bahwa aktivitas antioksidan yang dihasilkan dari metode maserasi hanya berkisar pada 32-36%. Sedangkan, pada penelitian ini aktivitas antioksidan yang didapatkan lebih besar dengan nilai 60%. Selain itu, waktu yang

digunakan oleh Apriliani & Tukiran adalah 24 jam, sedangkan waktu ekstraksi penelitian UAE optimal hanya 10 menit. Penelitian lain penggunaan ekstraksi maserasi dengan bahan pelarut air yang dilakukan oleh Sani *et al.* (2015) juga memberikan aktivitas antioksidan yang rendah, yaitu 23% dengan waktu 72 jam. Lalu pada penelitian yang dilakukan oleh Rao & Rathod (2015), metode UAE dapat menghasilkan ekstraksi sebesar 66% dari ekstrak menggunakan metode soxhlet hanya dengan waktu 10 menit dibandingkan dengan metode soxhlet selama 4 jam.

4.2. Total Flavonoid

Flavonoid adalah bahan metabolit sekunder yang dapat ditemukan di berbagai tanaman (Arrisujaya *et al.*, 2019). Flavonoid tergolong polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan dan dapat melindungi tubuh dari proses oksidasi. Oleh karena itu, flavonoid dapat melindungi penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas, seperti kanker, inflamasi, dan penyakit menular (Sani *et al.*, 2015).

Sambiloto mengandung 30 flavonoid. Jenis flavonoid yang terkandung adalah kuersetin, 7-O-metilwogonin, apigenin, luteolin, golongan flavon dan xanthan yang termetoksilasi (Rachmani *et al.*, 2018). Dalam uji yang dilakukan oleh Rachmani *et al.* (2018) juga ditemukan bahwa kandungan flavonoid yang ada pada sambiloto memiliki nilai IC_{50} 88,98 ppm yang dapat digolongkan sebagai aktivitas antioksidan yang kuat.

Metode pengujian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode $AlCl_3$ dengan kurva standar kuersetin. Prinsip metode ini adalah membentuk senyawa kompleks sehingga panjang gelombang mengalami pergeseran ke arah visible (tampak) dengan ditandai oleh perubahan warna menjadi kuning (Fadillah *et al.*, 2017). Metode ini diawali dengan ekstrak ditambahkan akuades dan larutan $NaNO_2$ 5%. Kemudian, larutan didiamkan selama 5 menit dan ditambahkan $AlCl_3$ 10%. Pada menit ke-6, larutan ditambahkan $NaOH$ 1M. Setelah itu dilarutkan kembali dengan akuades. Larutan kemudian dianalisis menggunakan metode spektrofotometri dengan panjang gelombang 510 nm. Penggunaan $NaNO_2$ dan $NaOH$ dalam metode ini bertujuan untuk membentuk suatu kompleks sistem yang memberikan warna khusus. Warna ini berasal dari reaksi ion aluminium dengan flavonoid dalam suasana basa sehingga membentuk senyawa

kompleks (Fadillah *et al.*, 2017). Kurva standar yang digunakan dalam metode ini adalah kuersetin karena kuersetin adalah salah satu flavonoid dari golongan flavonol yang dapat membentuk senyawa kompleks antara $AlCl_3$ dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bersebelahan dengan flavon dan flavonol (Trinovita *et al.*, 2019).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, total flavonoid tertinggi didapat dari ekstraksi dengan suhu $40\text{ }^\circ\text{C}$ dan waktu 15 menit. Sekarsari *et al.* (2019) dan Yuliantari *et al.* (2017) melakukan penelitian uji flavonoid menggunakan metode UAE pada daun sirsak dan daun jambu biji. Pada kedua penelitian tersebut, flavonoid terekstraksi sempurna pada suhu $45\text{ }^\circ\text{C}$ dan waktu 20 menit. Dilihat dari pola hasil total flavonoid sambiloto, pola yang dihasilkan sesuai dengan kedua penelitian di atas, yaitu pada suhu $50\text{ }^\circ\text{C}$ dan $55\text{ }^\circ\text{C}$ total flavonoid menurun dibandingkan suhu $45\text{ }^\circ\text{C}$. Hal ini juga berlaku pada waktu ekstraksi, di mana waktu maksimal yang digunakan pada penelitian ini adalah 15 menit sehingga belum dapat mengekstraksi komponen flavonoid secara sempurna (Yuliantari *et al.*, 2017).

Pada hasil penelitian, tren dari variabel suhu adalah mengalami peningkatan dari suhu $30\text{ }^\circ\text{C}$ ke $40\text{ }^\circ\text{C}$ dan menurun pada suhu $50\text{ }^\circ\text{C}$. Hal ini terjadi karena flavonoid adalah senyawa yang tergolong senyawa fenol dan memiliki sistem aromatik yang terkonjugasi. Sistem aromatik terkonjugasi ini mudah rusak terhadap suhu tinggi. Selain itu, flavonoid juga memiliki ikatan glikosida dengan molekul gula yang membuat flavonoid mudah mengalami kerusakan pada suhu tinggi. Flavonoid sendiri akan mengalami kerusakan pada suhu tinggi di atas $50\text{ }^\circ\text{C}$. Sedangkan, pada suhu yang lebih rendah, yaitu $30\text{ }^\circ\text{C}$, membuat flavonoid belum terekstrak secara sempurna (Sekarsari *et al.*, 2019). Kerusakan flavonoid pada suhu tinggi ini disebabkan oleh adanya pemutusan rantai molekul yang terjadi karena reaksi oksidasi gugus hidroksil dan akan membentuk senyawa lain yang mudah menguap (Syafriada *et al.*, 2018). Oleh karena itu, pada suhu $30\text{ }^\circ\text{C}$ dan $50\text{ }^\circ\text{C}$ flavonoid yang dihasilkan lebih rendah. Lalu pada variabel waktu, tren pada suhu $30\text{ }^\circ\text{C}$ dan $40\text{ }^\circ\text{C}$ menaik seiring meningkatkan lama waktu. Sebaliknya, pada suhu $50\text{ }^\circ\text{C}$, total flavonoid semakin menurun seiring dengan meningkatnya waktu

karena kerusakan pada suhu tinggi. Pada waktu 5 dan 10 menit, ekstrak yang dihasilkan lebih sedikit karena ekstraksi belum berjalan dengan sempurna (Yuliantari *et al.*, 2017).

Ekstraksi menggunakan UAE juga berpengaruh terhadap total flavonoid yang didapatkan. Berdasarkan penelitian dari Sani *et al.* (2015) yang melakukan uji total flavonoid terhadap sambiloto menggunakan metode maserasi menghasilkan total flavonoid dengan nilai 0,43 mg QE/g sampel dengan waktu 72 jam. Sedangkan dalam penelitian ini, total flavonoid tertinggi yang didapatkan adalah 5,89 mg QE/g sampel dengan waktu 15 menit. Apabila dibandingkan dengan metode soxhlet yang dilakukan oleh Rais (2015), total flavonoid yang didapatkan adalah 46 mg QE/g sampel dengan waktu 4 jam. Namun, hal ini tidak sesuai dengan penelitian Osman *et al.* (2021) yang mengatakan bahwa metode UAE menghasilkan total flavonoid 26% lebih besar dibandingkan metode soxhlet. Perbedaan ini bisa saja terjadi karena dalam penelitian ini, pelarut yang digunakan adalah akuades, sedangkan menurut Osman *et al.* (2021), pelarut yang baik dalam mengekstraksi flavonoid adalah etanol dengan hasil 4 kali lebih besar dibandingkan menggunakan pelarut air. Selain itu, faktor perbedaan bahan yang digunakan juga dapat mempengaruhi total flavonoid yang dihasilkan (Widyapuri *et al.*, 2022).

4.3. Intensitas Warna

Warna adalah salah satu faktor yang menjadi parameter terhadap kualitas suatu produk (Dinar *et al.*, 2017). Salah satu metode yang biasa digunakan dalam melakukan uji warna adalah menggunakan alat chromameter. Prinsip kerja chromameter adalah memantulkan cahaya kepada suatu objek dan menangkap hasil pantulan yang kemudian dikonversikan menjadi sistem warna L, a, dan b (Indrayati *et al.*, 2013).

Metode uji warna menggunakan chromameter relatif sederhana. Pertama, alat dikalibrasi menggunakan plat standar berwarna putih. Setelah dikalibrasi, kepala optik langsung ditempelkan pada sampel dan dipilih skala pengukuran L, a, dan b pada menu, lalu ditekan tombol start (Latriyanto *et al.*, 2019).

Notasi L^* adalah notasi yang menyatakan tingkat kecerahan dari ekstrak. Nilai L yang semakin kecil menandakan bahwa warna ekstrak semakin gelap (Widyasanti *et al.*, 2018). Berdasarkan hasil penelitian, tingkat warna L^* pada semua ekstrak tergolong gelap dengan kisaran nilai 4,77-5,63.

Notasi a^* adalah notasi yang menunjukkan warna merah dan hijau. Nilai positif pada notasi a^* menunjukkan warna merah dan nilai negatif menunjukkan warna hijau (Widyasanti *et al.*, 2018). Pada hasil penelitian, ditunjukkan bahwa semua ekstrak sambiloto berada pada nilai negatif dengan kisaran -2,72 hingga -3,44. Hal ini menunjukkan bahwa warna ekstrak sambiloto adalah hijau.

Terakhir adalah notasi b^* . Notasi b^* menunjukkan warna biru dan kuning. Nilai positif akan menunjukkan warna kuning dan nilai negatif menunjukkan warna biru (Widyasanti *et al.*, 2018). Warna pada ekstrak sambiloto menunjukkan nilai negatif, yaitu berwarna biru.

Dari ketiga komponen L^* , a^* , dan b^* pada ekstrak sambiloto ditemukan bahwa semua warna yang ditunjukkan adalah hijau kebiruan dan gelap. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Martin *et al.* (2022) yang mengatakan bahwa warna ekstrak dari sambiloto adalah hijau tua.

Pada analisis yang dilakukan, perbedaan nilai pada warna ekstrak sambiloto menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan, baik dari variabel suhu, maupun waktu. Pada diagram warna yang dibuat, juga ditunjukkan bahwa rata-rata warna yang terbentuk adalah hijau kebiruan dan hampir berwarna hitam. Hal ini membuat uji warna sulit untuk dibedakan karena warna yang pekat dan gelap (Hanura *et al.*, 2021).