

**PENENTUAN KONDISI OPTIMUM EKSTRAKSI ANTIOKSIDAN DAN
FENOLIK TOTAL DARI DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)
MENGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* (RSM)**

SKRIPSI SARJANA KIMIA

Oleh :

Valia Dwi Putri

2210412035



Dosen Pembimbing I : Dr. Yefrida

Dosen Pembimbing II : Prof. Dr. Dra. Refilda, M.S.

**PROGRAM SARJANA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2026**

**PENENTUAN KONDISI OPTIMUM EKSTRAKSI ANTIOKSIDAN DAN
FENOLIK TOTAL DARI DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)
MENGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* (RSM)**

SKRIPSI SARJANA KIMIA

Oleh

Valia Dwi Putri

2210412035



Skripsi ini diajukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
pada Program Sarjana Departemen Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Andalas

**PROGRAM SARJANA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2026**

LEMBAR PENGESAHAN

Penentuan Kondisi Optimum Ekstraksi Antioksidan dan Fenolik Total dari Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM), skripsi ini diajukan oleh **Valia Dwi Putri (NIM: 2210412035)** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata-1/S1) pada Program Sarjana Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.

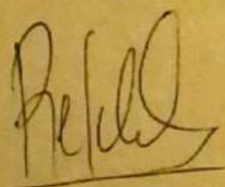
Disetujui oleh:

Pembimbing I



Dr. Yefrida
NIP.196903141999032001

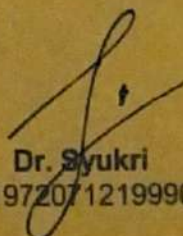
Pembimbing II



Prof. Dr. Refilda, M.S.
NIP.19590713198702200

Mengetahui:

Ketua Departemen Kimia

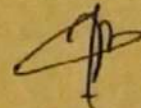


Dr. Syukri
NIP. 197207121999021002

LEMBARAN PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa Skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Padang, 20 Juni 2026



Valia Dwi Putri

HALAMAN PERSEMBAHAN

Segala puji bagi Allah SWT atas segala rahmat, kasih sayang, pertolongan, dan kemudahan yang telah diberikan. Atas pertolongan-Nya, penulis dapat melalui setiap proses, menghadapi setiap tantangan, serta menyelesaikan perjalanan panjang hingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Dengan penuh rasa syukur kepada Allah SWT serta ketulusan hati, karya sederhana yang menjadi bagian dari perjalanan panjang ini penulis persembahkan kepada:

Kedua orang tua tercinta, yang selalu menjadi tempat pulang, sumber kekuatan, dan alasan terbesar penulis untuk terus melangkah. Terima kasih atas setiap doa yang tidak pernah putus, kasih sayang yang tidak pernah berkurang, pengorbanan yang tak terhitung, serta kepercayaan yang selalu diberikan kepada penulis. Semoga segala cinta, pengorbanan, dan kebaikan yang telah diberikan senantiasa dibalas dengan keberkahan, kesehatan, dan kebahagiaan oleh Allah SWT.

Keluarga tersayang, terima kasih telah menjadi tempat penulis menemukan kehangatan, kasih sayang, dan dukungan tanpa syarat. Setiap doa, perhatian, serta semangat yang diberikan menjadi kekuatan bagi penulis untuk terus melangkah hingga mampu menyelesaikan perjalanan ini. Semoga Allah SWT membalas setiap kebaikan dengan limpahan rahmat, kesehatan, dan kebahagiaan.

Ibu Dr. Yefrida dan Ibu Prof. Dr. Refilda, yang telah menjadi sosok pembimbing luar biasa dalam perjalanan penyusunan skripsi ini. Terima kasih atas kesabaran, ketulusan, ilmu, perhatian, serta setiap arahan yang Ibu berikan kepada penulis. Penulis selalu meyakini bahwa rezeki tidak selalu berupa materi. Dipertemukan dan dibimbing oleh dosen-dosen yang baik hati, tulus, sabar, dan senantiasa memberikan kemudahan dalam setiap proses merupakan rezeki yang sangat besar dari Allah SWT. Terima kasih atas bimbingan, kepercayaan, dan motivasi yang senantiasa diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kesehatan, kebahagiaan, keberkahan, serta membalas setiap kebaikan Ibu dengan balasan yang terbaik.

Ibu Prof. Dr. Deswati, M.S., Ibu Prof. Dr. Rahmiana Zein, M.Sc., dan Ibu Prof. Dr. Armaini, M.S., selaku dosen penguji, yang telah meluangkan waktu, memberikan masukan, kritik, dan saran yang membangun demi penyempurnaan skripsi ini. Terima kasih atas setiap ilmu, perhatian, serta arahan yang Ibu berikan selama proses seminar hingga sidang akhir. Setiap masukan yang diberikan menjadi pembelajaran yang sangat berharga bagi penulis, tidak hanya dalam menyelesaikan skripsi ini, tetapi juga sebagai bekal untuk terus berkembang. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kesehatan, kebahagiaan, keberkahan, serta membalas segala kebaikan Ibu dengan balasan yang terbaik.

Sahabat tersayang, Tuti Ainisya, yang menjadi saksi dari perjalanan panjang penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Terima kasih untuk setiap uluran tangan yang dengan tulus selalu diberikan tanpa pernah diminta. Terima kasih karena selalu antusias mendengarkan

setiap cerita dan keluh kesah penulis, selalu memberikan perhatian yang membuat penulis merasa tidak sendirian, serta telah menjadi sosok yang membuat masa perkuliahan penulis terasa jauh lebih berwarna, penuh tawa, dan dipenuhi begitu banyak kenangan baik. Terima kasih karena selalu peduli ketika penulis jatuh sakit, bahkan selalu memastikan penulis baik-baik saja. Terima kasih telah membuat kos menjadi tempat pulang yang nyaman, karena hangatmu menjadikan tempat itu terasa seperti rumah kedua bagi penulis. Semua kebaikan, ketulusan, dan kasih sayang yang telah kamu berikan akan selalu menjadi bagian dari perjalanan yang tidak akan pernah penulis lupakan. Semoga Allah SWT senantiasa menjaga setiap langkahmu, melimpahkan kesehatan, kebahagiaan, keberkahan, serta membalas setiap kebaikanmu dengan balasan yang jauh lebih indah.

Sahabat-sahabat tersayang, Nabila Dewi Islami dan Erza Fadhila, terima kasih atas segala doa, perhatian, dan dukungan yang selalu menguatkan penulis selama proses ini. Terima kasih karena selalu bersedia membantu tanpa banyak bertanya setiap kali penulis membutuhkan. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan keberkahan, kesehatan, dan kebahagiaan kepada kalian.

Sobat satu bimbingan tersayang, Selvi Desrika, terima kasih telah menjadi bagian dari perjalanan panjang ini. Terima kasih telah menjadi teman seperjuangan yang selalu saling menguatkan sejak judul penelitian ini disetujui hingga akhirnya kita mampu menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Terima kasih atas setiap diskusi, setiap bantuan yang diberikan tanpa diminta, serta setiap pengingat agar penulis tidak menunda-nunda dan segera menyelesaikan setiap tahap dalam perjalanan ini. Terima kasih juga untuk setiap waktu yang telah kita luangkan bersama di sela-sela kesibukan skripsi, yang menjadi ruang untuk sejenak beristirahat, tertawa, dan menikmati hal-hal sederhana sehingga proses panjang ini terasa lebih ringan untuk dijalani. Semoga Allah SWT senantiasa membalas setiap kebaikanmu dengan balasan yang berlipat ganda, melimpahkan kesehatan, keberkahan, kebahagiaan, serta mengabulkan setiap doa dan harapanmu.

Teman-teman satu bimbingan, Alfiana Purwaningsih, Chairunnisa, dan Rizkiyah Amirah, terima kasih karena selalu meluangkan waktu untuk hadir, memberikan dukungan, serta membantu penulis dalam setiap tahapan seminar hingga sidang akhir skripsi ini. Semoga Allah SWT membalas setiap kebaikan kalian dengan keberkahan, kesehatan, kebahagiaan, dan kesuksesan.

Teman-teman Kimia angkatan 2022, terima kasih telah menjadi bagian dari perjalanan penulis selama menempuh pendidikan di Departemen Kimia. Terima kasih atas kebersamaan, bantuan, serta canda tawa yang telah mewarnai hari-hari perkuliahan penulis. Semoga Allah SWT senantiasa menjaga langkah kita, memudahkan setiap urusan, dan mempertemukan kita kembali dalam cerita-cerita baik di masa depan.

Terakhir, karya ini kupersembahkan untuk diriku sendiri, Valia Dwi Putri. Terima kasih karena telah memilih untuk tetap bertahan sampai hari ini. Terima kasih karena telah menjalani

setiap pilihan yang diambil dengan penuh tanggung jawab, meskipun tidak semua prosesnya mudah. Terima kasih karena selalu percaya bahwa setiap hal yang terjadi adalah yang terbaik. Terima kasih untuk semua usaha terbaik yang telah kamu berikan. Terima kasih karena telah menghargai dan mengapresiasi setiap pencapaian, sekecil apa pun itu. Terima kasih atas semua hal yang membanggakan yang telah kamu lakukan. Terima kasih untuk setiap malam panjang yang telah kamu lalui dan untuk setiap doa yang tidak pernah putus kamu langitkan. Semoga Allah SWT senantiasa melapangkan hatimu, menjaga setiap langkahmu, menguatkanmu dalam setiap proses kehidupan, dan memberkahi setiap impian baik yang akan kamu perjuangkan.



KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah Swt. atas segala rahmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Penentuan Kondisi Optimum Ekstraksi Antioksidan dan Fenolik Total dari Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM)” dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata-1/S1) pada Program Sarjana Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.

Dalam proses penyusunan dan penyelesaian skripsi ini, penulis memperoleh bantuan, bimbingan, arahan, serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Dr. Syukri, M.Si, selaku Ketua Departemen Kimia yang telah memberikan fasilitas dan kesempatan kepada penulis untuk menyelesaikan studi.
2. Ibu Dr. rer. nat. Syafrizayanti, M.Si, selaku Kepala Program Studi S1 Kimia yang telah memberikan arahan selama penulis menempuh pendidikan.
3. Ibu Dr. Yefrida selaku dosen pembimbing 1 dan Ibu Prof. Dr. Refilda, M.S. selaku dosen pembimbing 2, yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan, saran, serta motivasi selama pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
4. Ibu Prof. Dr. Deswati, M.S., Ibu Prof. Dr. Rahmiana Zein, M.Sc., dan Ibu Prof. Dr. Armaini, M.S., selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun demi penyempurnaan skripsi ini.
5. Seluruh Bapak dan Ibu dosen Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas yang telah memberikan ilmu kepada penulis selama perkuliahan.
6. Seluruh Analis Laboratorium dan tenaga kependidikan di Departemen Kimia yang telah membantu penulis dalam proses penelitian dan perkuliahan.
7. Kedua orang tua tercinta serta seluruh keluarga yang senantiasa memberikan doa, kasih sayang, dukungan moral maupun material, serta motivasi yang tiada henti kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih memiliki keterbatasan dan jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi perbaikan di masa mendatang. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang kimia.

Padang, 22 Juni 2026



Penulis

INTISARI

Penentuan Kondisi Optimum Ekstraksi Antioksidan dan Fenolik Total dari Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.) Menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM)

oleh:

Valia Dwi Putri (NIM: 2210412035)

Dr. Yefrida*, Prof. Dr. Refilda, M.S.*

*Pembimbing

Penyakit degeneratif yang dipicu oleh stres oksidatif terus meningkat dan menjadi tantangan kesehatan global. Pemanfaatan antioksidan alami dari tanaman semakin berkembang karena dinilai lebih aman dan berkelanjutan. Daun sirsak (*Annona muricata* L.) diketahui mengandung senyawa bioaktif seperti fenolik, flavonoid, dan alkaloid yang berpotensi sebagai antioksidan. Namun, penelitian mengenai optimasi ekstraksi dengan menggunakan pelarut air dari daun sirsak menggunakan pendekatan statistik yang komprehensif masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum ekstraksi daun sirsak menggunakan pelarut air melalui pendekatan *One Factor at a Time* (OFAT) dan *Response Surface Methodology* (RSM) dengan desain *Central Composite Design* (CCD), dengan respons berupa kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total. Optimasi OFAT dilakukan dengan cara memvariasikan satu faktor sedangkan faktor lainnya dijaga tetap konstan, dengan variasi suhu (40–80 °C), waktu (10–50 menit), dan rasio sampel terhadap pelarut (1:10–1:30 g/mL). Kapasitas antioksidan ditentukan menggunakan metode 2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazyl (DPPH) dan dinyatakan sebagai mg AAE/g FW, sedangkan kandungan fenolik total ditentukan menggunakan metode Folin–Ciocalteu dan dinyatakan sebagai mg GAE/g FW. Hasil optimasi OFAT menunjukkan kondisi optimum pada suhu 70 °C, waktu ekstraksi 40 menit, dan rasio sampel terhadap pelarut 1:20 g/mL. Kondisi optimum pada metode OFAT digunakan sebagai titik pusat pada optimasi RSM dengan desain CCD. Hasil optimasi menggunakan metode RSM menunjukkan bahwa kondisi ekstraksi optimum pada suhu 76 °C, waktu ekstraksi 41 menit, dan rasio sampel terhadap pelarut 1:17 g/mL. Pengujian pada kondisi optimum tersebut menghasilkan kapasitas antioksidan sebesar $8,1831 \pm 0,05$ mg AAE/g FW dan kandungan fenolik total sebesar $9,0042 \pm 0,08$ mg GAE/g FW. Nilai kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total ini mendekati nilai prediksi dari RSM yaitu sebesar 8,2296 mg AAE/g FW dan 9,1797 mg GAE/g FW. Hasil ini menunjukkan bahwa RSM merupakan metode yang efektif dalam mengoptimasi proses ekstraksi antioksidan dan fenolik total dari daun sirsak.

Kata kunci: Daun sirsak, Kapasitas antioksidan, Kandungan fenolik total, OFAT, RSM.



ABSTRACT

Determination of the Optimum Extraction Conditions for Antioxidants and Total Phenolic Compounds from Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves Using Response Surface Methodology (RSM)

by:

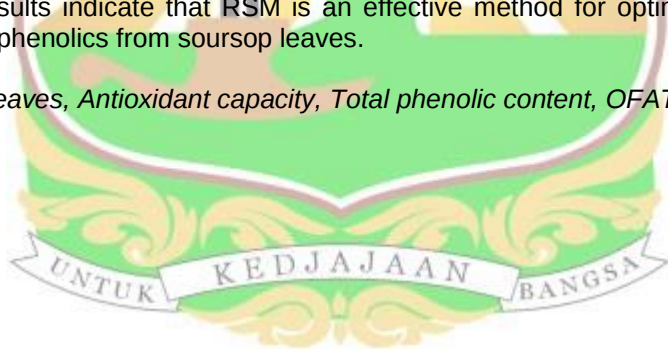
Valia Dwi Putri (Student ID: 2210412035)

Dr. Yefrida*, Prof. Dr. Refilda, M.S.*

*Supervisor

Degenerative diseases triggered by oxidative stress continue to rise and pose a global health challenge. The use of natural antioxidants from plants is growing because they are considered safer and more sustainable. Soursop leaves (*Annona muricata* L.) are known to contain bioactive compounds such as phenolics, flavonoids, and alkaloids that have antioxidant potential. However, research on optimizing water-based extraction of soursop leaves using a comprehensive statistical approach remains limited. This study aims to determine the optimal extraction conditions for soursop leaves using water as a solvent through the One Factor at a Time (OFAT) and Response Surface Methodology (RSM) approaches with a Central Composite Design (CCD), with antioxidant capacity and total phenolic content as the responses. OFAT optimization was performed by varying one factor while keeping the others constant, with variations in temperature (40–80 °C), time (10–50 minutes), and sample-to-solvent ratio (1:10–1:30 g/mL). Antioxidant capacity was determined using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and expressed as mg AAE/g FW, while total phenolic content was determined using the Folin–Ciocalteu method and expressed as mg GAE/g FW. The OFAT optimization results indicated optimal conditions at 70 °C, an extraction time of 40 minutes, and a sample-to-solvent ratio of 1:20 g/mL. The optimum conditions obtained from the OFAT method were used as the center point for RSM optimization using CCD. Optimization results using the RSM method indicated that the optimal extraction conditions were a temperature of 76 °C, an extraction time of 41 minutes, and a sample-to-solvent ratio of 1:17 g/mL. Testing under these optimal conditions yielded an antioxidant capacity of $8.1831 \pm 0,05$ mg AAE/g FW and a total phenolic content of $9.0042 \pm 0,08$ mg GAE/g FW. These values for antioxidant capacity and total phenolic content are close to the RSM predictions of 8.2296 mg AAE/g FW and 9.1797 mg GAE/g FW. These results indicate that RSM is an effective method for optimizing the extraction of antioxidants and total phenolics from soursop leaves.

Keywords: Soursop leaves, Antioxidant capacity, Total phenolic content, OFAT, RSM.



DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
LEMBARAN PERNYATAAN	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
KATA PENGANTAR.....	vi
INTISARI.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tanaman Sirsak (<i>Annona muricata</i> L.)	5
2.2 Antioksidan	6
2.3 <i>Total Phenolic Content</i> (TPC)	7
2.4 Metode DDPH.....	9
2.5 Metode Ekstraksi	10
2.6 Metode Optimasi <i>One Factor At a Time</i> (OFAT)	12
2.7 <i>Response Surface Methodology</i> (RSM)	12
2.8 <i>Central Composite Design</i> (CCD).....	14
BAB III. METODE PENELITIAN	16
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian	16
3.2 Alat dan Bahan	16
3.2.1 Alat	16
3.2.2 Bahan.....	16
3.3 Pembuatan Reagen	16
3.3.1 Pembuatan Larutan Standar Asam Askorbat.....	16
3.3.2 Pembuatan Larutan DPPH	16
3.3.3 Pembuatan Larutan Standar Asam Galat	16
3.3.4 Pembuatan Larutan Natrium Karbonat 7%.....	17
3.4 Prosedur Kerja	17
3.4.1 Persiapan dan Identifikasi Sampel.....	17
3.4.2 Preparasi Sampel	17
3.4.3 Optimasi Ekstraksi dengan Metode OFAT.....	17
3.4.4 Optimasi Kondisi Ekstraksi dengan Metode RSM	18
3.4.5 Penentuan Kapasitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	20
3.4.5.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar Asam Askorbat.....	20
3.4.5.2 Penentuan Kapasitas Antioksidan dalam Sampel	20
3.4.6 Penentuan Fenolik Total dengan Metode Folin-Ciocalteu	20
3.4.6.1 Pembuatan Larutan Standar Asam Galat	20
3.4.6.2 Penentuan Kandungan Fenolik Total dalam Sampel.....	20
BAB IV. HASIL DAN DISKUSI	21
4.1 Identifikasi Sampel	21
4.2 Kondisi Optimum Ekstraksi Daun Sirsak dengan Metode OFAT	21
4.2.1 Variasi Suhu	23
4.2.2 Variasi Waktu.....	24
4.2.3 Variasi Rasio Sampel terhadap Pelarut	26
4.3 Kondisi Optimum Ekstraksi Daun Sirsak dengan Metode RSM.....	28
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	42
5.1 Kesimpulan	42
5.2 Saran	42

DAFTAR PUSTAKA.....	43
LAMPIRAN.....	47



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Pembuatan Reagen	47
Lampiran 2. Skema Kerja Pembuatan Reagen	49
Lampiran 3. Skema Kerja Penelitian.....	51
Lampiran 4. Hasil identifikasi sampel.....	55
Lampiran 5. Gambar Alat dan Penelitian	56
Lampiran 6. Kurva Kalibrasi Standar Asam Askorbat dengan Metode DPPH.....	59
Lampiran 7. Kurva Kalibrasi Standar Asam Galat dengan Metode Folin–Ciocalteu	60
Lampiran 8. Perhitungan kapasitas Antioksidan dalam Daun Sirsak dengan Metode DPPH	61
Lampiran 9. Perhitungan Kandungan Fenolik Total dalam Daun Sirsak dengan Metode Folin-Ciocalteu	63
Lampiran 10. Uji <i>Outlier</i> (Uji Data Terpencil)	65
Lampiran 11. Nilai aktual respons pada kondisi optimum	69



DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Design experiment menggunakan metode OFAT	18
Tabel 3.2 Faktor eksperimen dan tingkat yang digunakan dalam eksperimen.....	19
Tabel 3.3 Kombinasi perlakuan untuk optimasi ekstraksi menggunakan RSM dengan desain CCD.....	19
Tabel 4.1 Hasil respons aktual dan prediksi model pada optimasi menggunakan RSM dengan desain CCD	30
Tabel 4.2 Hasil ANOVA model kuadratik untuk kapasitas antioksidan dari daun sirsak	34
Tabel 4.3 Hasil ANOVA model kuadratik untuk ekstraksi kandungan fenolik total dari daun sirsak	34
Tabel 5.1 Data pengukuran absorbansi larutan standar asam askorbat	59
Tabel 5.2 Data pengukuran absorbansi larutan standar asam galat	60
Tabel 5.3 Kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi suhu	61
Tabel 5.4 Kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi waktu.....	62
Tabel 5.5 Kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi rasio sampel terhadap pelarut.....	62
Tabel 5.6 Kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi suhu.....	63
Tabel 5.7 Kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi waktu	64
Tabel 5.8 Kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi rasio sampel terhadap pelarut	64
Tabel 5.9 Uji <i>outlier</i> yang dilakukan secara triplo.....	65
Tabel 5.10 Uji <i>outlier</i> kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi suhu	65
Tabel 5.11 Uji <i>outlier</i> kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi waktu	66
Tabel 5.12 Uji <i>outlier</i> kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi rasio sampel terhadap pelarut.....	66
Tabel 5.13 Uji <i>outlier</i> kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi suhu.....	67
Tabel 5.14 Uji <i>outlier</i> kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi waktu	67
Tabel 5.15 Uji <i>outlier</i> kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi rasio sampel terhadap pelarut	68
Tabel 5.16 Uji <i>outlier</i> kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH pada kondisi optimum	68
Tabel 5.17 Uji <i>outlier</i> kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu pada kondisi optimum.....	68
Tabel 5.18 Kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH pada kondisi optimum	69
Tabel 5.19 Kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu pada kondisi optimum	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Annona muricata</i> L.	5
Gambar 2.2 Mekanisme reaksi antara senyawa fenolik dan reagen Folin–Ciocalteu	8
Gambar 2.3 Struktur kimia DPPH	9
Gambar 2.4 Mekanisme reaksi asam askorbat pada penghambatan radikal DPPH	10
Gambar 2.5 Skema metode dekoksi.....	11
Gambar 2.6 Plot 3D RSM.....	14
Gambar 4.1 Tanaman sirsak.....	21
Gambar 4.2 Pengaruh suhu ekstraksi daun sirsak terhadap respons dengan metode OFAT	23
Gambar 4.3 Pengaruh waktu ekstraksi daun sirsak terhadap respons dengan metode OFAT	25
Gambar 4.4 Pengaruh rasio sampel/pelarut terhadap respons dengan metode OFAT	27
Gambar 4.5 Grafik permukaan 3D interaksi antar variabel terhadap kapasitas antioksidan ..	38
Gambar 4.6 Grafik permukaan 3D interaksi antar variabel terhadap kandungan fenolik total	38
Gambar 4.7 Kondisi optimum ekstraksi	41
Gambar 5.1 Peralatan yang digunakan pada penelitian	56
Gambar 5.2 Tahapan yang dilakukan dalam penelitian	56
Gambar 5.3 Tahapan penentuan kapasitas antioksidan dalam sampel	57
Gambar 5.4 Tahapan penentuan kandungan fenolik total dalam sampel	58
Gambar 5.5 Kurva kalibrasi standar asam askorbat	59
Gambar 5.6 Kurva kalibrasi standar asam galat.....	60



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Singkatan	Nama	Pemakaian Pertama Kali pada Halaman
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>	i
OFAT	<i>One Factor At a Time</i>	v
CCD	<i>Central Composite Design</i>	v
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazyl</i>	v
AAE	<i>Ascorbic Acid Equivalent</i>	v
GAE	<i>Gallic Acid Equivalent</i>	v
FW	<i>Fresh Weight</i>	v
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>	1
DNA	Deoksiribonukleat	1
TPC	<i>Total Phenolic Content</i>	6
TFC	<i>Total Flavonoid Content</i>	6
UV	<i>Ultra Violet</i>	8
Vis	<i>Visible</i>	8
Mo	Molibdenum	8
W	Wolfram (tungsten)	8
ABTS	<i>2,2-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid</i>	9
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>	9
CUPRAC	<i>Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity</i>	9
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>	9
PM	<i>Phenanthroline Method</i>	9
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i>	9
SET	<i>Single Electron Transfer</i>	9
3D	Tiga Dimensi	19
BBD	<i>Box Behnken Design</i>	12
ANOVA	<i>Analysis of Varians</i>	13
CV	<i>Coefficient of Variation</i>	13
MAE	<i>Microwave Assisted Extraction</i>	26

Lambang	Nama	Pemakaian Pertama Kali pada Halaman
°C	Derajat Celcius	vi
g/mL	Gram per miliLiter	vi
mg AAE/g FW	<i>Miligram Ascorbic Acid Equivalent per gram Fresh Weight</i>	vi
mg GAE/g FW	<i>Miligram Gallic Acid Equivalent per gram Fresh Weight</i>	vi
b/v	Berat per volume	2
%	Persen	2
nm	Nanometer	9
R ²	Koefisien Determinasi	13
p.a	Pro analisis	16
g	Gram	17
mL	MiliLiter	16
mM	Milimolar	16
mg/L	Miligram per Liter	16
-α	Titik aksial bawah	15
+α	Titik aksial atas	15
W	Watt	26
mg/g	Miligram per gram	31
mg QE/g	<i>Milligram Quercetin Equivalent per gram</i>	39
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50</i>	39
ppm	<i>Parts Per Million</i>	40



BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit degeneratif merupakan salah satu permasalahan kesehatan global yang jumlah kasusnya terus meningkat. Hal ini berkaitan dengan stres oksidatif, yaitu ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan sistem pertahanan antioksidan dalam tubuh. Stres oksidatif umumnya dipicu oleh adanya *reactive oxygen species* (ROS). Peningkatan kadar ROS dapat memicu terbentuknya radikal bebas yang menyebabkan kerusakan pada biomolekul seperti lipid, protein, dan deoksiribonukleat (DNA). Kondisi tersebut diketahui berkontribusi terhadap terjadinya berbagai penyakit kardiovaskular, seperti stroke dan penyakit jantung iskemik, melalui kerusakan sel serta gangguan fungsi pembuluh darah yang dipicu oleh radikal bebas. Analisis *Global Burden of Disease* menunjukkan bahwa jumlah kematian akibat penyakit kardiovaskular meningkat lebih dari dua kali lipat, dari sekitar 292 ribu kasus pada tahun 1990 menjadi 659 ribu kasus pada tahun 2019. Pada tahun 2019, stroke dan penyakit jantung iskemik menjadi penyebab kematian tertinggi dengan masing-masing sekitar 331 ribu dan 245 ribu kematian di Indonesia. Peningkatan paparan faktor eksternal seperti polusi, radiasi, dan pola hidup tidak sehat turut memperburuk kondisi tersebut, terutama di negara berkembang termasuk Indonesia. Seiring dengan meningkatnya populasi lanjut usia, peran stres oksidatif dalam proses penuaan dan perkembangan penyakit degeneratif menjadi semakin signifikan, sehingga upaya pencegahan melalui peningkatan asupan antioksidan menjadi sangat penting^{1,2,3}.

Salah satu upaya yang banyak dikembangkan untuk mengatasi stres oksidatif adalah pemanfaatan antioksidan alami yang berasal dari tanaman. Antioksidan endogen dalam tubuh memiliki keterbatasan dalam menetralkan radikal bebas secara optimal, sehingga diperlukan antioksidan eksogen untuk mendukung sistem pertahanan tersebut. Antioksidan alami dari tumbuhan dinilai lebih aman dibandingkan antioksidan sintesis yang berpotensi menimbulkan efek samping apabila digunakan secara berlebihan. Oleh karena itu, perhatian ilmiah terhadap sumber antioksidan alami terus meningkat. Berbagai studi menunjukkan bahwa senyawa fitokimia seperti fenolik dan flavonoid yang terdapat dalam tanaman memiliki kapasitas antioksidan yang tinggi dan mampu melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Keberadaan senyawa bioaktif tersebut menunjukkan bahwa tanaman merupakan sumber potensial antioksidan alami yang dapat dimanfaatkan dalam upaya pencegahan penyakit yang berkaitan dengan stres oksidatif^{4,5,6}.

Tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan salah satu tanaman tropis yang telah lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional dan diketahui mengandung berbagai senyawa fitokimia. Tanaman ini, khususnya bagian daun, telah banyak diteliti karena potensinya sebagai sumber senyawa bioaktif dengan berbagai aktivitas biologis. Daun sirsak diketahui mengandung senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, dan asetogenin yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan, antikanker, antimikroba, dan antidiabetes. Senyawa-senyawa

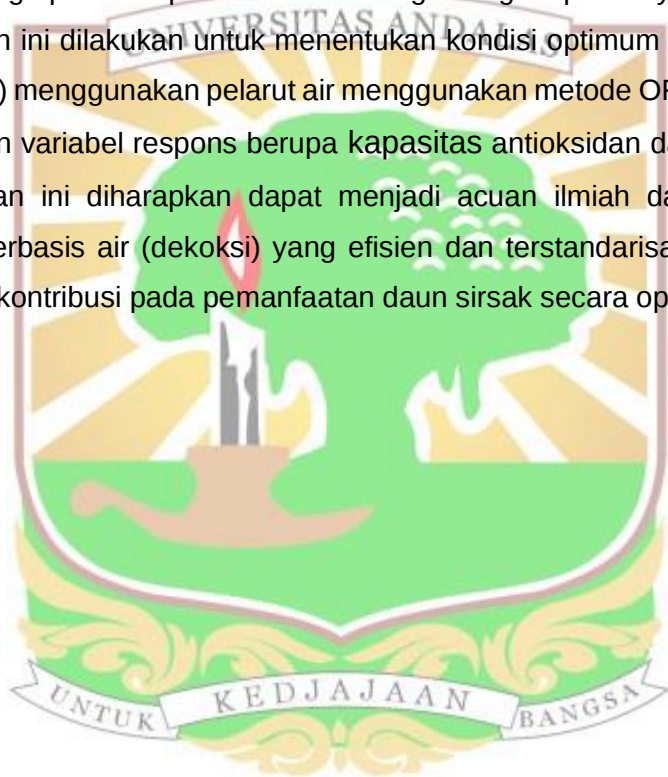
flavonoid, seperti kuersetin, kaempferol, dan rutin, berperan dalam menangkal radikal bebas serta melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Selain itu, berbagai penelitian menunjukkan bahwa kandungan metabolit sekunder pada daun sirsak memberikan efek farmakologis yang luas, termasuk aktivitas antioksidan yang signifikan. Meskipun demikian, pemanfaatan daun sirsak sebagai sumber antioksidan alami masih memerlukan kajian lebih lanjut, khususnya terkait kondisi ekstraksi yang optimal, karena efisiensi proses ekstraksi sangat memengaruhi jumlah dan kualitas senyawa bioaktif yang diperoleh^{7,8}.

Efisiensi ekstraksi senyawa fenolik dan antioksidan dari daun sirsak sangat dipengaruhi oleh kondisi proses, seperti suhu, waktu ekstraksi, serta rasio sampel terhadap pelarut. Variasi parameter tersebut diketahui berperan penting dalam menentukan jumlah senyawa bioaktif yang terekstraksi, karena perbedaan kondisi dapat memengaruhi kelarutan dan stabilitas senyawa target. Metode dekoksi merupakan salah satu teknik ekstraksi berbasis air yang banyak digunakan karena sederhana, ekonomis, serta sesuai dengan praktik pengolahan herbal secara tradisional. Penggunaan air sebagai pelarut juga telah terbukti mampu mengekstraksi senyawa bioaktif dari daun sirsak, termasuk fenolik, flavonoid, dan metabolit sekunder lainnya. Namun demikian, kondisi ekstraksi yang tidak terkontrol, khususnya pada suhu tinggi dan waktu yang terlalu lama, dapat menyebabkan penurunan kualitas ekstrak akibat degradasi senyawa bioaktif yang bersifat termolabil. Oleh karena itu, penentuan kondisi ekstraksi yang tepat menjadi faktor penting untuk memperoleh hasil ekstraksi yang optimal^{9,10}.

Optimasi ekstraksi senyawa bioaktif dari daun sirsak telah banyak dikaji dalam berbagai penelitian dengan variasi metode ekstraksi dan jenis pelarut yang digunakan. Penelitian oleh Hartati *et al.* (2024) mengoptimasi ekstraksi daun sirsak (*Annona muricata* L.) menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol dengan pendekatan RSM. Variabel yang dioptimasi meliputi waktu ekstraksi, rasio bahan terhadap pelarut, dan konsentrasi etanol, dengan hasil optimum pada kondisi 10 menit, rasio 1:6,5 (b/v), dan etanol 96% yang menghasilkan kapasitas antioksidan tertinggi berdasarkan model respon yang digunakan. Sementara itu, Mahesh dan Selvakumarsamy (2024) menggunakan pendekatan RSM untuk mengoptimasi proses pengeringan dan ekstraksi daun sirsak dengan pelarut air melalui metode ekstraksi padat-cair berbantuan pemanasan. Variabel yang dikaji meliputi suhu pengeringan, rasio bahan terhadap pelarut, suhu ekstraksi, dan waktu ekstraksi, dengan kondisi optimum pada suhu pengeringan 60 °C, rasio 1:34 (b/v), suhu ekstraksi 39°C, dan waktu ekstraksi 45,5 jam yang menghasilkan aktivitas antioksidan dan kandungan asetogenin tertinggi. Akan tetapi, penelitian yang secara khusus mengoptimasi kondisi ekstraksi berbasis air (dekoksi) dari daun sirsak segar menggunakan pendekatan statistik yang komprehensif seperti RSM dengan desain CCD masih sangat terbatas. Keterbatasan tersebut menunjukkan bahwa kajian pada bidang ini masih perlu dikembangkan lebih lanjut, karena air merupakan pelarut yang paling aman, mudah diperoleh, dan ramah lingkungan serta sesuai dengan

praktik pengolahan herbal tradisional di masyarakat^{11,12}.

Penentuan kondisi optimum ekstraksi menggunakan metode satu faktor pada satu waktu (OFAT) yang umum dilakukan memiliki keterbatasan karena tidak mempertimbangkan interaksi antar variabel proses. Metode ini cenderung menghasilkan kondisi yang kurang optimal karena setiap faktor diuji secara terpisah. Sebaliknya, RSM merupakan metode statistik yang efektif untuk mengoptimasi proses dengan mempertimbangkan pengaruh simultan serta interaksi antar variabel, sehingga banyak digunakan dalam optimasi proses ekstraksi senyawa bioaktif. RSM memungkinkan evaluasi hubungan antara variabel seperti suhu, waktu, dan rasio sampel terhadap pelarut terhadap respons yang dihasilkan secara lebih sistematis dan efisien. Melalui penggabungan metode OFAT sebagai tahap awal untuk menentukan rentang variabel dan RSM dengan desain CCD sebagai tahap optimasi lanjutan, kondisi ekstraksi yang optimal dapat ditentukan dengan tingkat presisi yang lebih tinggi. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menentukan kondisi optimum ekstraksi daun sirsak (*Annona muricata* L.) menggunakan pelarut air menggunakan metode OFAT dan RSM dengan desain CCD, dengan variabel respons berupa kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan ilmiah dalam pengembangan metode ekstraksi berbasis air (dekoksi) yang efisien dan terstandarisasi untuk daun sirsak segar, sehingga berkontribusi pada pemanfaatan daun sirsak secara optimal sebagai sumber antioksidan alami¹³.



1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Berapa kondisi optimum ekstraksi daun sirsak dengan parameter suhu, waktu, dan rasio sampel terhadap pelarut menggunakan metode OFAT yang digunakan sebagai titik tengah pada metode RSM?
2. Berapa kondisi optimum ekstraksi daun sirsak dengan parameter suhu, waktu, dan rasio sampel terhadap pelarut untuk memperoleh kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total maksimum dengan metode RSM?
3. Berapa kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total ekstrak daun sirsak yang diperoleh secara eksperimental pada kondisi optimum hasil optimasi menggunakan metode RSM?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Menentukan kondisi optimum ekstraksi daun sirsak dengan parameter suhu, waktu, dan rasio sampel terhadap pelarut menggunakan metode OFAT yang digunakan sebagai titik tengah pada metode RSM.
2. Menentukan kondisi optimum ekstraksi daun sirsak dengan parameter suhu, waktu, dan rasio sampel terhadap pelarut untuk memperoleh kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total maksimum dengan metode RSM.
3. Menentukan kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total ekstrak daun sirsak yang diperoleh secara eksperimental pada kondisi optimum hasil optimasi menggunakan metode RSM.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kondisi optimum ekstraksi daun sirsak dengan parameter suhu, waktu, dan rasio sampel terhadap pelarut menggunakan metode RSM untuk mendapatkan kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total yang maksimum. Selain itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi dan referensi bagi penelitian selanjutnya terkait ekstraksi senyawa antioksidan alami, serta mendukung pemanfaatan daun sirsak secara lebih optimal sebagai bahan baku potensial yang bernilai tambah dalam bidang pangan fungsional, farmasi, dan kesehatan.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Sirsak (*Annona muricata* L.)

Sirsak merupakan tanaman yang umumnya tumbuh di wilayah tropis maupun subtropis. Di Indonesia, tanaman ini dikenal dengan berbagai sebutan, seperti nangka belanda atau durian belanda. Penyebutannya pun beragam di berbagai daerah, misalnya nangka landa atau nangka sebrang (Jawa), boh iona (Aceh), nangko belando (Palembang), jambu landa (Lampung), nangka buris atau nangkulan (Madura), durian betawi (Minangkabau), srikaya jawa (Bali), sirsak atau nangka walanda (Sunda), hingga durio ulondro (Nias)¹⁴.

Sirsak diketahui mencakup sekitar 130 genus dengan kurang lebih 2.300 spesies. Tanaman ini telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional di berbagai belahan dunia. Selain di Indonesia, sirsak juga memiliki beragam nama lokal, antara lain *guanabana* (Spanyol), *graviola* (Portugis), *huanaba* (Guatemala), *guanaba* (El Salvador), *catuche* atau *catoche* (Venezuela), *sinini* (Bolivia), *zopote de viejas* dan *cabeza de negaro* (Meksiko), *zunrzak* atau *sorsaka* (Suriname), *anona de broquel* atau *anona de puntitas* (Argentina), serta *jaca do para*, *araticum do grande*, *brazilian paw paw*, atau *graviola* (Brazil)¹⁴.

Annona muricata L. adalah salah satu spesies dalam famili *Annonaceae* yang banyak dikenal sebagai tanaman tropis dengan manfaat etnomedis yang cukup penting. Tanaman ini telah lama dimanfaatkan secara tradisional di berbagai wilayah dunia. Pohon ini merupakan tanaman buah tropis dataran rendah yang bersifat *evergreen* (hijau sepanjang tahun), dengan tinggi umumnya mencapai 5 hingga 10 meter. Penyebarannya luas, mencakup kawasan tropis dan subtropis seperti Amerika Selatan, Afrika, Asia Tenggara, hingga kepulauan di Samudra Pasifik¹¹.



Gambar 2.1 *Annona muricata* L.¹⁵

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan salah satu tanaman yang kaya akan senyawa bioaktif dan telah banyak diteliti karena berbagai aktivitas farmakologinya. Analisis fitokimia menunjukkan bahwa daun sirsak mengandung berbagai metabolit sekunder, antara lain flavonoid, senyawa fenolik, alkaloid, terpenoid, dan asetogenin. Keberadaan senyawa-senyawa tersebut berkontribusi terhadap berbagai aktivitas biologis daun sirsak, termasuk

aktivitas antioksidan. Kandungan flavonoid dan fenolik yang terdapat dalam daun sirsak diketahui berperan penting dalam menangkal radikal bebas, sehingga tanaman ini berpotensi dikembangkan sebagai sumber antioksidan alami⁷.

klasifikasi taksonomi daun sirsak (*Annona muricata* L.) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Magnoliophyta (Angiospermae)*
Kelas : *Magnoliopsida (Dicotyledonae)*
Ordo : *Magnoliales*
Keluarga : *Annonaceae*
Genus : *Annona*
Spesies : *Annona muricata* L.¹⁶

Beberapa penelitian fitokimia melaporkan bahwa daun sirsak mengandung berbagai metabolit sekunder yang memiliki peran penting terhadap aktivitas biologis tanaman ini. Sampai saat ini, lebih dari 200 senyawa telah berhasil diisolasi dari beragam bagian *Annona muricata* L., meliputi golongan fenolik, flavonoid, alkaloid, serta senyawa khas famili *Annonaceae* yaitu asetogenin. Selain asetogenin, daun sirsak juga diketahui memiliki *Total Phenolic Content* (TPC) dan *Total Flavonoid Content* (TFC) yang cukup tinggi, sehingga memberikan kontribusi besar terhadap kapasitas antioksidan. Tingginya kapasitas antioksidan tersebut mendukung potensi daun sirsak sebagai sumber bahan alami untuk pengembangan obat tradisional. Kandungan antioksidan ini dapat dipengaruhi oleh faktor tempat tumbuh serta metode ekstraksi yang digunakan. Penelitian di Meksiko menunjukkan bahwa sediaan infus daun sirsak menghasilkan kapasitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol, dengan persentase inhibisi DPPH hingga 72,5%^{15,17}.

2. 2 Antioksidan

Stres oksidatif merupakan kondisi yang terjadi akibat ketidakseimbangan antara produksi ROS dengan kemampuan sistem antioksidan tubuh untuk menetralkannya. Dalam jumlah normal, ROS berperan dalam berbagai proses fisiologis, seperti transduksi sinyal dan regulasi fungsi sel. Namun, produksi ROS yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan biomolekul penting, termasuk lipid, protein, dan DNA. Akumulasi kerusakan tersebut berkontribusi terhadap perkembangan berbagai penyakit kronis dan degeneratif, seperti penyakit kardiovaskular, kanker, gangguan neurodegeneratif, diabetes, serta proses penuaan. Oleh karena itu, keberadaan antioksidan diperlukan untuk membantu menetralkan ROS berlebih dan mengurangi dampak stres oksidatif terhadap kesehatan¹⁸.

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat atau memperlambat proses oksidasi dengan menetralkan radikal bebas yang terbentuk di dalam tubuh. Senyawa ini berperan sebagai penangkap radikal bebas sehingga dapat mencegah terjadinya reaksi berantai oksidatif yang berpotensi menyebabkan kerusakan sel. Keberadaan antioksidan sangat penting dalam sistem biologis karena membantu melindungi biomolekul penting,

seperti lipid, protein, dan DNA, dari kerusakan akibat stres oksidatif. Antioksidan dapat diperoleh dari berbagai sumber, baik yang diproduksi secara alami oleh tubuh maupun yang berasal dari luar tubuh, terutama dari buah-buahan, sayuran, dan tanaman yang kaya senyawa bioaktif¹⁹.

Kapasitas antioksidan pada bahan alam umumnya berkaitan erat dengan keberadaan senyawa fenolik. Senyawa fenolik merupakan salah satu kelompok metabolit sekunder yang paling melimpah pada tumbuhan yang meliputi berbagai golongan senyawa, seperti flavonoid, asam fenolat, tanin, stilben, dan lignan. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki kapasitas antioksidan karena mampu mendonorkan atom hidrogen atau elektron kepada radikal bebas sehingga membentuk senyawa yang lebih stabil dan menghentikan reaksi berantai oksidatif. Kapasitas antioksidan senyawa fenolik juga dipengaruhi oleh struktur kimianya, terutama jumlah dan posisi gugus hidroksil pada cincin aromatik. Oleh karena itu, kandungan fenolik total banyak digunakan sebagai salah satu parameter dalam penentuan kapasitas antioksidan bahan alam karena senyawa fenolik berkontribusi signifikan terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas²⁰.

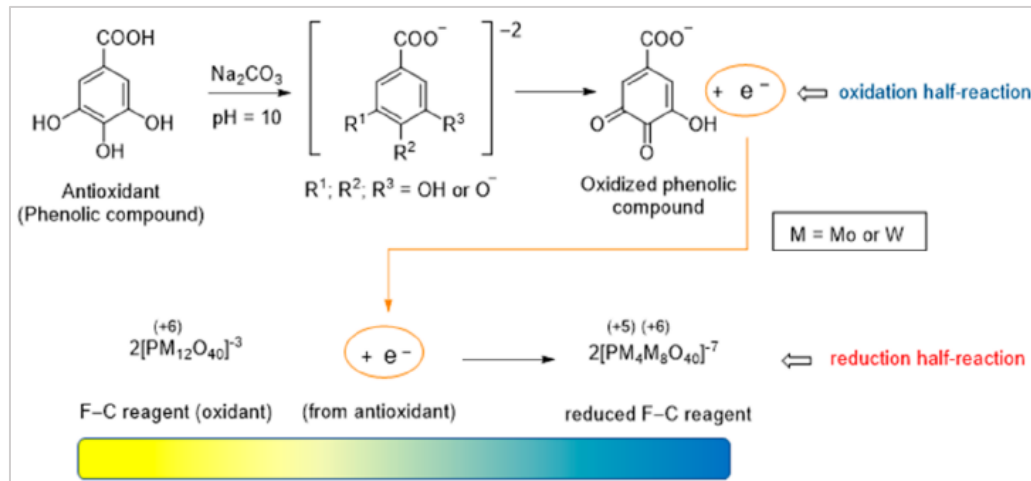
2.3 Total Phenolic Content (TPC)

Total Phenolic Content merupakan parameter yang digunakan untuk menentukan jumlah total senyawa fenolik yang terkandung dalam suatu bahan atau ekstrak. Pengukuran TPC banyak digunakan dalam penelitian bahan alam karena senyawa fenolik diketahui berkontribusi terhadap berbagai aktivitas biologis, terutama antioksidan. Kapasitas antioksidan senyawa fenolik berkaitan dengan kemampuannya mendonorkan atom hidrogen atau elektron untuk menstabilkan radikal bebas dan menghambat reaksi oksidasi. Selain itu, kapasitas antioksidan senyawa fenolik dipengaruhi oleh karakteristik struktur kimianya, seperti jumlah dan posisi gugus hidroksil pada cincin aromatik. Oleh karena itu, kandungan fenolik total banyak digunakan sebagai salah satu parameter dalam kajian kapasitas antioksidan bahan alam karena adanya hubungan yang erat antara senyawa fenolik dan kapasitas antioksidan²¹.

Kandungan fenolik total sering dikaitkan dengan kapasitas antioksidan karena senyawa fenolik berperan dalam mekanisme penangkapan radikal bebas. Secara umum, peningkatan kandungan senyawa fenolik dapat meningkatkan kemampuan suatu ekstrak dalam menghambat radikal bebas. Namun, hubungan tersebut juga dipengaruhi oleh karakteristik struktur senyawa fenolik, seperti jumlah dan posisi gugus hidroksil pada cincin aromatik. Oleh karena itu, kapasitas antioksidan suatu ekstrak tidak hanya ditentukan oleh jumlah senyawa fenolik yang terkandung, tetapi juga oleh jenis dan struktur senyawa fenolik tersebut²¹.

Penentuan TPC umumnya dilakukan menggunakan metode Folin–Ciocalteu karena prosedurnya relatif sederhana, cepat, dan memiliki reproduksibilitas yang baik. Metode ini didasarkan pada reaksi oksidasi-reduksi antara senyawa fenolik dan reagen Folin–Ciocalteu yang tersusun atas kompleks fosfomolibdat dan fosfotungstat. Dalam suasana basa, senyawa

fenolik akan mereduksi kompleks tersebut sehingga terjadi perubahan warna dari kuning menjadi biru. Intensitas warna biru yang terbentuk sebanding dengan kapasitas reduksi senyawa fenolik dalam sampel yang dapat diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang tertentu. Oleh karena itu, metode Folin–Ciocalteu hingga saat ini masih digunakan sebagai metode acuan dalam penentuan kandungan fenolik total pada berbagai bahan pangan dan ekstrak tumbuhan²¹.



Gambar 2.2 Mekanisme reaksi antara senyawa fenolik dan reagen Folin–Ciocalteu²¹

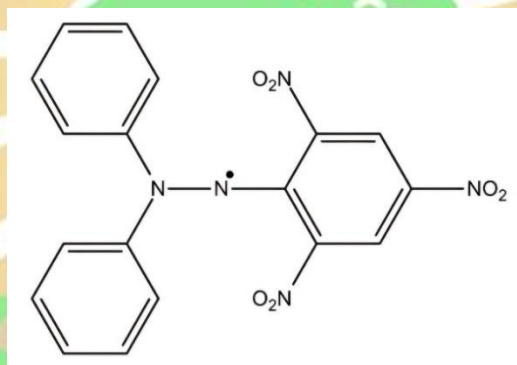
Gambar 2.2 menunjukkan mekanisme reaksi antara senyawa fenolik dan reagen Folin–Ciocalteu dalam penentuan kandungan fenolik total. Pada kondisi basa, gugus hidroksil pada senyawa fenolik mendonorkan elektron kepada kompleks fosfomolibdat dan fosfotungstat yang terkandung dalam reagen Folin–Ciocalteu. Proses transfer elektron tersebut menyebabkan ion molibdenum (Mo(VI)) dan tungsten (W(VI)) mengalami reduksi menjadi bentuk dengan bilangan oksidasi yang lebih rendah sehingga terbentuk kompleks berwarna biru. Semakin banyak senyawa fenolik yang terdapat dalam sampel, semakin besar jumlah kompleks biru yang terbentuk dan semakin tinggi nilai absorbansi yang dihasilkan. Oleh karena itu, intensitas warna biru yang terbentuk digunakan sebagai dasar untuk menentukan kandungan fenolik total secara spektrofotometri²¹.

Hasil pengukuran TPC umumnya dinyatakan sebagai *Gallic Acid Equivalent* (GAE), yaitu jumlah senyawa fenolik yang dinyatakan setara dengan asam galat sebagai senyawa standar. Asam galat banyak digunakan sebagai standar dalam metode Folin–Ciocalteu karena memiliki stabilitas yang baik, harga yang relatif ekonomis, dan mudah digunakan dalam pembuatan larutan standar untuk analisis kandungan fenolik total. Nilai TPC umumnya dinyatakan dalam satuan miligram ekuivalen asam galat per gram sampel atau ekstrak (mg GAE/g). Penentuan nilai tersebut dilakukan dengan membandingkan absorbansi sampel terhadap kurva kalibrasi yang dibuat menggunakan berbagai konsentrasi larutan standar asam galat sehingga kandungan fenolik total dalam sampel dapat dihitung sebagai ekuivalen asam galat^{21,22}.

2. 4 Metode DPPH

Beberapa metode analisis yang dapat digunakan untuk mengukur kapasitas antioksidan dalam suatu sampel, di antaranya ABTS (*2,2-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*), DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), serta metode Fenantroline (PM), dan lain sebagainya²³.

Metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan karena prosedurnya sederhana, cepat, mudah dilakukan, dan relatif ekonomis. DPPH merupakan radikal bebas stabil yang memiliki satu elektron tidak berpasangan pada atom nitrogen sehingga banyak digunakan sebagai model radikal dalam pengujian kapasitas antioksidan. Dalam bentuk radikal, DPPH memiliki warna ungu tua dengan serapan maksimum sekitar 517 nm yang dapat diukur secara spektrofotometri. Kapasitas antioksidan suatu sampel ditentukan berdasarkan kemampuannya dalam mereduksi radikal DPPH yang ditandai dengan penurunan intensitas warna ungu dan absorbansi larutan²⁴.

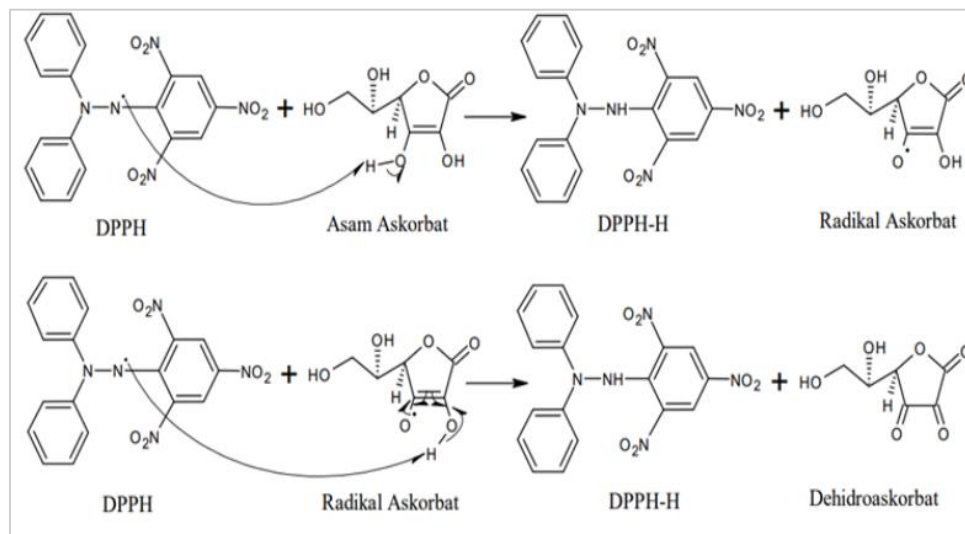


Gambar 2.3 Struktur kimia DPPH²⁵

Prinsip metode DPPH didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan untuk mendonorkan atom hidrogen atau elektron kepada radikal DPPH. Ketika bereaksi dengan antioksidan, radikal DPPH menerima atom hidrogen atau elektron sehingga berubah menjadi bentuk nonradikal yang lebih stabil. Reaksi tersebut menyebabkan berkurangnya konsentrasi radikal DPPH dalam larutan yang ditandai dengan memudarnya warna ungu dan menurunnya nilai absorbansi. Besarnya penurunan absorbansi mencerminkan kemampuan antioksidan dalam menetralkan radikal bebas. Reaksi antara DPPH dan antioksidan dapat berlangsung melalui mekanisme *hydrogen atom transfer* (HAT), *single electron transfer* (SET), atau kombinasi keduanya, bergantung pada struktur senyawa antioksidan dan kondisi reaksi yang digunakan²⁴.

Asam askorbat merupakan salah satu senyawa antioksidan yang banyak digunakan sebagai standar dalam pengukuran kapasitas antioksidan, termasuk metode DPPH. Kemampuan antioksidan asam askorbat berasal dari kemampuannya mendonorkan atom hidrogen atau elektron kepada spesies radikal sehingga radikal tersebut berubah menjadi bentuk yang lebih stabil. Setelah mendonorkan hidrogen atau elektron, asam askorbat

membentuk radikal askorbil yang relatif stabil sehingga mampu menghentikan reaksi berantai oksidatif. Selain memiliki kapasitas antioksidan yang tinggi, asam askorbat juga mudah diperoleh, larut dalam air, dan memberikan respons yang baik dalam pengujian penangkapan radikal bebas²⁶.



Gambar 2.4 Mekanisme reaksi asam askorbat pada penghambatan radikal DPPH²⁷

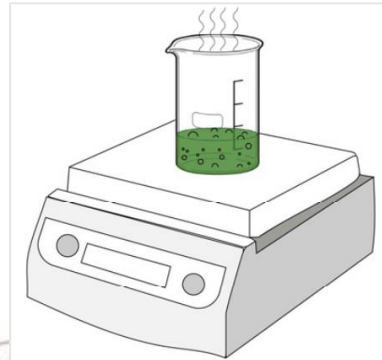
Gambar 2.4 menunjukkan mekanisme penghambatan radikal DPPH oleh asam askorbat sebagai senyawa antioksidan. Pada tahap pertama, asam askorbat mendonorkan atom hidrogen kepada radikal DPPH sehingga terbentuk DPPH-H yang lebih stabil dan radikal askorbat. Radikal askorbat yang terbentuk selanjutnya mengalami oksidasi lebih lanjut menjadi dehidroaskorbat. Proses transfer atom hidrogen tersebut menyebabkan berkurangnya jumlah radikal DPPH dalam larutan sehingga warna ungu DPPH memudar. Mekanisme ini menggambarkan prinsip dasar metode DPPH yang digunakan untuk mengevaluasi kemampuan suatu senyawa antioksidan dalam menetralkan radikal bebas melalui donor atom hidrogen atau elektron²⁷.

2.5 Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa bioaktif dari matriks bahan alam menggunakan pelarut yang sesuai berdasarkan perbedaan kelarutan dan perpindahan massa dari bahan ke dalam pelarut. Selama proses ekstraksi, senyawa target berdifusi dari jaringan tanaman menuju pelarut hingga tercapai kesetimbangan konsentrasi. Efisiensi ekstraksi dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti jenis pelarut, suhu, waktu ekstraksi, ukuran partikel, dan rasio bahan terhadap pelarut. Oleh karena itu, pemilihan kondisi ekstraksi yang tepat menjadi faktor penting untuk memperoleh senyawa bioaktif dalam jumlah optimum²⁸.

Dekoksi merupakan salah satu metode ekstraksi konvensional yang menggunakan air sebagai pelarut dan dilakukan melalui pemanasan bahan tanaman dalam air mendidih atau mendekati titik didih selama periode waktu tertentu. Metode ini banyak digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat polar dan larut dalam air, seperti asam fenolat, glikosida flavonoid, tanin, dan berbagai metabolit sekunder lainnya. Selama proses dekoksi, peningkatan suhu dapat meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam jaringan tanaman,

mempercepat difusi senyawa target, serta meningkatkan laju perpindahan massa dari matriks tanaman ke dalam pelarut sehingga efisiensi ekstraksi meningkat. Akan tetapi, pemanasan yang terlalu lama atau suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan perubahan struktur maupun degradasi senyawa yang sensitif terhadap panas sehingga memengaruhi komposisi ekstrak yang dihasilkan²⁹.



Gambar 2.5 Skema metode dekoksi²⁹

Suhu merupakan salah satu faktor penting yang memengaruhi efisiensi ekstraksi senyawa fenolik dan kapasitas antioksidan dari bahan tanaman. Peningkatan suhu umumnya dapat meningkatkan kelarutan senyawa fenolik dalam pelarut, menurunkan viskositas pelarut, serta meningkatkan koefisien difusi sehingga perpindahan massa dari matriks tanaman ke dalam pelarut berlangsung lebih cepat. Selain itu, suhu yang lebih tinggi dapat meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam jaringan tanaman melalui pelunakan dinding sel dan pelepasan senyawa fenolik yang terikat pada matriks sel. Namun, suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan degradasi, oksidasi, isomerisasi, maupun polimerisasi senyawa fenolik sehingga menurunkan kandungan fenolik total yang diperoleh²⁸.

Selain suhu, lama waktu ekstraksi juga berperan penting dalam menentukan efisiensi proses ekstraksi. Semakin lama kontak antara bahan dan pelarut, semakin besar kesempatan senyawa target untuk berdifusi dari matriks tanaman ke dalam pelarut sehingga jumlah senyawa yang terekstraksi cenderung meningkat. Peningkatan waktu ekstraksi memungkinkan proses perpindahan massa berlangsung lebih sempurna hingga mendekati kondisi kesetimbangan antara matriks dan pelarut. Namun, setelah mencapai titik tertentu, penambahan waktu ekstraksi tidak selalu menghasilkan peningkatan perolehan senyawa yang signifikan karena sebagian besar senyawa yang mudah larut telah terekstraksi. Selain itu, waktu ekstraksi yang terlalu lama dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya oksidasi maupun degradasi senyawa fenolik sehingga berpotensi menurunkan kandungan fenolik total dan kapasitas antioksidan ekstrak yang dihasilkan^{12,30}.

Rasio sampel terhadap pelarut juga merupakan parameter yang memengaruhi efisiensi ekstraksi karena berkaitan dengan gradien konsentrasi antara matriks tanaman dan pelarut. Peningkatan volume pelarut umumnya dapat meningkatkan kelarutan dan perpindahan massa senyawa target ke dalam pelarut dengan mempertahankan perbedaan konsentrasi yang menjadi gaya pendorong proses difusi. Selain itu, jumlah pelarut yang lebih

besar dapat memperluas kontak antara bahan dan pelarut sehingga meningkatkan pelepasan senyawa fenolik dari matriks tanaman. Namun, penggunaan pelarut dalam jumlah yang berlebihan tidak selalu menghasilkan peningkatan perolehan senyawa yang sebanding karena sistem ekstraksi dapat mencapai kondisi jenuh atau kesetimbangan. Oleh karena itu, penentuan rasio sampel terhadap pelarut yang optimum diperlukan untuk memperoleh kandungan fenolik total dan kapasitas antioksidan yang maksimal secara efisien^{12,31}.

2. 6 Metode Optimasi *One Factor At a Time* (OFAT)

One Factor at a Time (OFAT) merupakan metode optimasi yang dilakukan dengan memvariasikan satu faktor pada suatu waktu sementara faktor-faktor lainnya dipertahankan tetap. Metode ini digunakan untuk mengevaluasi pengaruh masing-masing faktor terhadap respons yang diamati dan mengidentifikasi kondisi yang memberikan respons terbaik. Melalui metode ini, pengaruh setiap faktor dapat diamati secara individual sehingga diperoleh informasi awal mengenai faktor-faktor yang memengaruhi suatu proses. Dalam penerapannya, OFAT dilakukan secara bertahap dengan menguji beberapa tingkat perlakuan untuk setiap faktor, sedangkan faktor lainnya dijaga konstan. Nilai faktor yang menghasilkan respons terbaik digunakan sebagai dasar untuk pengujian faktor berikutnya hingga diperoleh kondisi yang dianggap optimum. Pendekatan ini banyak digunakan pada tahap awal optimasi proses karena dapat membantu menentukan rentang faktor yang memberikan respons terbaik sebelum dilakukan optimasi yang lebih lanjut^{32,33}.

Meskipun banyak digunakan sebagai metode optimasi awal, OFAT memiliki beberapa keterbatasan. Metode ini tidak mampu mengevaluasi pengaruh interaksi antar faktor karena setiap faktor dipelajari secara terpisah. Selain itu, optimasi menggunakan OFAT dapat menjadi kurang efisien ketika jumlah faktor yang diteliti semakin banyak karena setiap faktor harus dievaluasi secara terpisah. Akibatnya, kondisi optimum yang diperoleh belum tentu menggambarkan kondisi optimum sebenarnya ketika beberapa faktor bekerja secara bersamaan. Oleh karena itu, OFAT sering digunakan sebagai tahap pendahuluan sebelum dilakukan optimasi menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM), yang mampu mengevaluasi pengaruh faktor tunggal maupun interaksi antar faktor terhadap respons yang diamati^{32,34}.

2. 7 *Response Surface Methodology* (RSM)

Response Surface Methodology merupakan suatu metode optimasi yang memanfaatkan pendekatan matematika dan statistika untuk mempelajari hubungan antara faktor-faktor yang memengaruhi suatu proses dengan respons yang dihasilkan. Metode ini digunakan untuk menyusun rancangan percobaan, membangun model empiris berdasarkan data hasil eksperimen, serta menentukan kombinasi faktor yang menghasilkan respons optimum. Selain digunakan untuk optimasi, RSM juga memungkinkan prediksi respons pada berbagai kombinasi faktor dalam rentang percobaan yang ditetapkan sehingga hubungan antara variabel proses dan respons dapat dipahami secara lebih menyeluruh^{35,36}.

Dibandingkan dengan metode optimasi konvensional, seperti OFAT, RSM memungkinkan beberapa faktor dipelajari secara simultan dalam satu rancangan percobaan. Selain mengevaluasi pengaruh masing-masing faktor terhadap respons, RSM juga mampu mengidentifikasi efek kuadratik serta interaksi antar faktor yang dapat memengaruhi respons. Data yang diperoleh dari hasil percobaan selanjutnya digunakan untuk membangun model matematis yang menggambarkan hubungan antara variabel independen dan respons. Model tersebut memungkinkan prediksi respons pada berbagai kombinasi faktor di dalam rentang percobaan yang ditetapkan, sehingga kondisi optimum dapat diperkirakan berdasarkan model yang dibangun tanpa harus menguji seluruh kemungkinan kombinasi faktor secara langsung. Dengan demikian, RSM menjadi metode optimasi yang mampu memberikan informasi yang lebih komprehensif mengenai pengaruh faktor-faktor proses terhadap respons yang diamati³⁵.

Hubungan antara variabel independen dan respons dalam RSM umumnya dinyatakan menggunakan model polinomial orde dua (*second-order polynomial model*). Model ini banyak digunakan karena mampu menggambarkan efek linier, efek kuadratik, dan interaksi antar variabel yang memengaruhi respons. Secara umum, model polinomial orde dua dapat dinyatakan sebagai berikut:

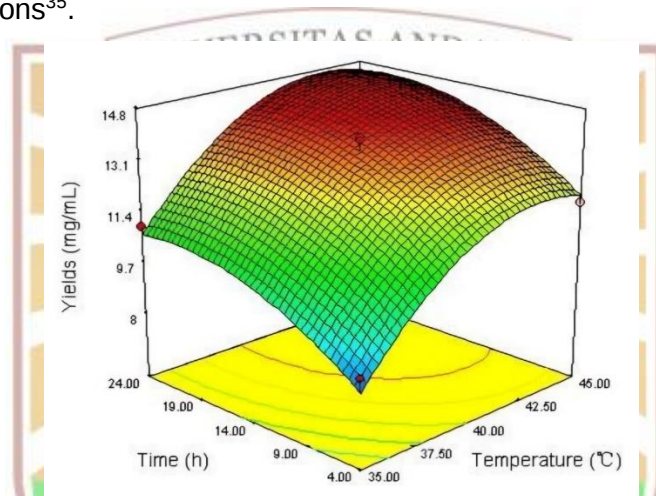
$$Y_{\text{respons}} = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^3 \beta_{ij} X_i X_j + e_i$$

Pada persamaan tersebut, Y menyatakan respons atau variabel terikat yang diamati, sedangkan β_0 merupakan konstanta atau nilai intersep model. β_i menunjukkan koefisien untuk efek linier dari masing-masing variabel independen (X_i), β_{ii} merupakan koefisien efek kuadratik yang menggambarkan pengaruh kuadrat dari setiap variabel independen, sedangkan β_{ij} menyatakan koefisien interaksi antara dua variabel independen (X_i dan X_j). Adapun e_i merupakan galat atau residual yang menggambarkan variasi respons yang tidak dapat dijelaskan oleh model. Melalui koefisien-koefisien tersebut, model polinomial orde dua mampu menggambarkan hubungan antara variabel independen dan respons sehingga dapat digunakan untuk memprediksi respons serta menentukan kondisi operasi yang optimum³⁶.

Setelah model matematis diperoleh, kesesuaian model dalam RSM dievaluasi menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA). ANOVA digunakan untuk menilai signifikansi model, signifikansi masing-masing faktor, pengaruh interaksi antar faktor, serta pengaruh kuadratik terhadap respons yang diamati. Signifikansi model maupun setiap faktor umumnya ditentukan berdasarkan nilai *p-value*, di mana model atau faktor dianggap memberikan pengaruh yang signifikan terhadap respons apabila memiliki nilai *p-value* kurang dari 0,05. Selain itu, kesesuaian model juga dapat dievaluasi melalui koefisien determinasi (R^2), yang menunjukkan seberapa baik model mampu menjelaskan variasi respons, serta uji *lack of fit* untuk menilai kesesuaian model terhadap data percobaan. Evaluasi model pada RSM juga dapat didukung oleh parameter statistik lain, seperti *Adjusted R²* dan *Coefficient of Variation* (CV). *Adjusted R²* digunakan untuk mengevaluasi kemampuan model dalam menjelaskan

variasi respons dengan mempertimbangkan jumlah variabel yang digunakan dalam model, sedangkan CV menunjukkan tingkat keragaman data terhadap nilai rata-ratanya sehingga dapat digunakan untuk menilai ketelitian dan reproduktibilitas model³⁵.

Model matematis yang diperoleh selanjutnya dapat divisualisasikan dalam bentuk plot permukaan respon (*response surface plot*) dan plot kontur (*contour plot*). Plot permukaan respon merupakan grafik tiga dimensi yang menggambarkan hubungan antara dua variabel independen dengan respons, sedangkan variabel lainnya dipertahankan pada nilai tertentu. Sementara itu, plot kontur merupakan representasi dua dimensi dari permukaan respon yang memudahkan pengamatan pola perubahan respons dan identifikasi daerah yang memberikan respons optimum. Kedua jenis plot tersebut banyak digunakan dalam RSM karena dapat memberikan gambaran yang lebih jelas mengenai pengaruh faktor maupun interaksi antar faktor terhadap respons³⁵.



Gambar 2.6 Plot 3D RSM³⁷

Dalam RSM, model matematis dibangun berdasarkan data yang diperoleh dari suatu rancangan percobaan (*experimental design*). Beberapa rancangan percobaan yang dapat digunakan untuk membangun model polinomial orde dua antara lain *Central Composite Design* (CCD), *Box-Behnken Design* (BBD), dan desain tiga level (*three-level design*). Setiap rancangan memiliki susunan titik percobaan yang berbeda sesuai dengan tujuan pemodelan. Salah satu rancangan yang banyak digunakan adalah CCD, yang terdiri atas titik faktorial, titik aksial, dan titik pusat sehingga mampu membangun model polinomial orde dua^{36,38}.

2.8 Central Composite Design (CCD)

Central Composite Design merupakan salah satu rancangan percobaan dalam RSM yang digunakan untuk membangun model polinomial orde dua. Rancangan ini disusun untuk memperoleh hubungan antara variabel independen dan respons, sehingga mampu menggambarkan pengaruh linier, pengaruh kuadratik, serta interaksi antar faktor terhadap respons yang diamati. Selain digunakan untuk membangun model matematis, CCD juga mendukung proses penentuan kondisi optimum melalui kombinasi percobaan yang dirancang secara sistematis³⁸.

CCD tersusun atas tiga jenis titik percobaan, yaitu titik faktorial (*factorial points*), titik

aksial (*axial* atau *star points*), dan titik pusat (*center points*). Titik faktorial digunakan untuk mengevaluasi pengaruh linier dari setiap faktor, sedangkan titik aksial berfungsi untuk mengidentifikasi adanya efek kuadratik sehingga model polinomial orde dua dapat dibentuk. Adapun titik pusat digunakan untuk memperkirakan galat percobaan (*pure error*) serta mendeteksi adanya kelengkungan respons. Kombinasi ketiga jenis titik tersebut memungkinkan model yang dihasilkan mampu menggambarkan hubungan antara faktor dan respons secara lebih representatif. Salah satu keunggulan CCD adalah kemampuannya untuk memodelkan pengaruh linier, pengaruh kuadratik, serta interaksi antar faktor dalam satu rancangan percobaan. Karakteristik tersebut memungkinkan proses optimasi dilakukan secara lebih efisien dan menghasilkan model matematis yang dapat digunakan untuk memprediksi respons pada berbagai kombinasi faktor di dalam daerah percobaan³⁸.



BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Desember 2025 hingga Februari 2026 di Laboratorium Pengukuran dan Kimia Organik Bahan Alam Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan meliputi spektrofotometer UV–Vis (Thermo Scientific, Genesys 30), neraca analitik (Shimadzu ATY224), *hotplate stirrer* (DLAB MS-H280 Pro, Dragon Lab), peralatan gelas laboratorium (Pyrex), serta perangkat lunak Design-Expert® versi 13.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daun sirsak segar (*Annona muricata* L.), asam askorbat (Merck), metanol (Merck), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich), asam galat (Sigma-Aldrich), reagen Folin–Ciocalteu (Merck), natrium karbonat (Na_2CO_3) (Merck), dan air suling. Seluruh bahan kimia yang digunakan berkualitas *pro analysis* (p.a.).

3.3 Pembuatan Reagen

3.3.1 Pembuatan Larutan Standar Asam Askorbat

Asam askorbat ditimbang sebanyak 0,0250 g kemudian dilarutkan dalam labu ukur 25 mL dengan air suling sampai tanda batas, konsentrasi larutan induk diperoleh sebesar 1000 mg/L. Selanjutnya larutan induk dipipet sebanyak 2,5 mL dan diencerkan dalam labu ukur 25 mL dengan air suling hingga tanda batas, dan diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 mg/L. Masing-masing larutan dipipet sebanyak (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4) mL dan dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan air suling sampai tanda batas, dan diperoleh larutan deret standar dengan konsentrasi berturut-turut (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14) mg/L. Perhitungan pembuatan larutan dilampirkan pada lampiran 1.

3.3.2 Pembuatan Larutan DPPH

DPPH ditimbang sebanyak 0,0020 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dengan metanol. Selanjutnya, volume larutan ditepatkan hingga tanda batas menggunakan metanol dan dihomogenkan sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 0,1 mM. Perhitungan pembuatan larutan dilampirkan pada lampiran 1.

3.3.3 Pembuatan Larutan Standar Asam Galat

Asam galat ditimbang sebanyak 0,0250 g lalu dilarutkan dalam labu ukur 25 mL dengan metanol sampai tanda batas, konsentrasi larutan induk diperoleh sebesar 1000 mg/L. Selanjutnya larutan standar induk dipipet sebanyak 2,5 mL dan diencerkan dalam labu ukur 25 mL dengan metanol hingga tanda batas dan diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 mg/L. Masing-masing larutan dipipet sebanyak (1, 2, 3, 4, 5, 6) mL dan dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan metanol sampai tanda batas, dan diperoleh larutan dengan konsentrasi berturut-turut (10, 20, 30, 40, 50, 60) mg/L. Perhitungan pembuatan larutan dilampirkan pada

lampiran 1.

3.3.4 Pembuatan Larutan Natrium Karbonat 7%

Natrium karbonat ditimbang sebanyak 3,5 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dengan air suling. Selanjutnya, volume larutan ditepatkan hingga tanda batas menggunakan air suling dan dihomogenkan sehingga diperoleh larutan natrium karbonat 7%. Perhitungan pembuatan larutan dilampirkan pada lampiran 1.

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Persiapan dan Identifikasi Sampel

Daun sirsak diperoleh dari daerah Piai Tengah, Kecamatan Pauh, Kota Padang, Sumatera Barat. Bagian tanaman yang terdiri atas daun, ranting, bunga, buah dan biji diambil untuk dilakukan uji identifikasi di Laboratorium Herbarium, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas. Daun yang telah teridentifikasi selanjutnya digunakan sebagai bahan uji penelitian.

3.4.2 Preparasi Sampel

Daun sirsak yang telah dipetik dikumpulkan, kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih dari pengotor yang menempel pada permukaannya. Selanjutnya, daun dikeringkan menggunakan tisu untuk menghilangkan sisa air pada permukaan daun, dipotong kecil-kecil, lalu ditimbang sebanyak 5 g.

3.4.3 Optimasi Ekstraksi dengan Metode OFAT

Pengujian awal dilakukan menggunakan metode OFAT untuk menentukan rentang kondisi ekstraksi yang akan digunakan pada optimasi RSM. Pada tahap pertama, suhu ekstraksi divariasikan pada 40, 50, 60, 70, dan 80 °C, sedangkan waktu ekstraksi dan rasio sampel terhadap pelarut dijaga konstan masing-masing selama 30 menit dan 1:20 g/mL. Ekstrak yang diperoleh dianalisis untuk menentukan kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total. Suhu yang menghasilkan respons terbaik kemudian digunakan sebagai kondisi tetap pada tahap kedua, yaitu variasi waktu ekstraksi pada 10, 20, 30, 40, dan 50 menit dengan rasio sampel terhadap pelarut tetap 1:20 g/mL. Selanjutnya, waktu optimum yang diperoleh digunakan sebagai kondisi tetap pada tahap ketiga, yaitu variasi rasio sampel terhadap pelarut pada 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, dan 1:30 g/mL, sementara suhu dan waktu ekstraksi dipertahankan pada nilai optimum yang telah diperoleh sebelumnya. Setiap kombinasi perlakuan pada tahap OFAT dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Ekstrak yang diperoleh dari setiap perlakuan kemudian dianalisis untuk menentukan kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total. Kondisi optimum pada setiap tahap ditentukan berdasarkan respons kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total tertinggi. Hasil optimum metode OFAT selanjutnya digunakan sebagai titik pusat (*center point*) dalam penyusunan desain optimasi menggunakan RSM.

Tabel 3.1 *Design experiment* menggunakan metode OFAT

a. Pengaruh suhu ($^{\circ}\text{C}$)

Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu (min)	Rasio sampel terhadap pelarut (g/mL)
40	30	1:20
50	30	1:20
60	30	1:20
70	30	1:20
80	30	1:20

b. Pengaruh waktu (menit)

Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu (menit)	Rasio sampel terhadap pelarut (g/mL)
Suhu optimum	10	1:20
	20	1:20
	30	1:20
	40	1:20
	50	1:20

c. Pengaruh rasio sampel terhadap pelarut (g/mL)

Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu (menit)	Rasio Sampel terhadap Pelarut (g/mL)
Suhu optimum	Waktu optimum	1:10
		1:15
		1:20
		1:25
		1:30

3.4.4 Optimasi Kondisi Ekstraksi dengan Metode RSM

Optimasi kondisi ekstraksi dilakukan menggunakan metode RSM dengan desain CCD yang disusun menggunakan *software Design-Expert* versi 13. Rentang nilai masing-masing variabel independen ditentukan berdasarkan hasil pengujian pendahuluan menggunakan metode OFAT. Nilai optimum yang diperoleh dari masing-masing variabel pada tahap OFAT digunakan sebagai titik pusat (*center point*, level 0). Selanjutnya, batas bawah (-1) dan batas atas ($+1$) ditentukan berdasarkan rentang nilai di sekitar titik pusat tersebut, sedangkan level aksial ($-\alpha$ dan $+\alpha$) dihitung secara otomatis oleh *software Design-Expert*.

Variabel independen yang dioptimasi meliputi suhu ekstraksi ($^{\circ}\text{C}$), waktu ekstraksi (menit), dan rasio sampel terhadap volume pelarut (g/mL). Masing-masing variabel dikodekan ke dalam lima level, yaitu $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, dan $+\alpha$ sebagaimana disajikan pada Tabel 3.2. Respons yang digunakan dalam proses optimasi adalah kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total ekstrak daun sirsak.

Tabel 3.2 Faktor eksperimen dan tingkat yang digunakan dalam eksperimen

Simbol	Variabel independen	Tingkat Variabel Kode				
		- α	-1	0	+1	+ α
A	Suhu ekstraksi ($^{\circ}\text{C}$)	53	60	70	80	87
B	Waktu ekstraksi (menit)	23	30	40	50	57
C	Rasio sampel/pelarut (g/mL)	1:12	1:15	1:20	1:25	1:28

Keterangan: (- α): Titik aksial bawah; (-1): Batas bawah; (0): Titik tengah; (+1): Batas atas; (+ α): Titik aksial atas.

Berdasarkan variabel, level, dan respon yang telah ditentukan, *software Design-Expert* menghasilkan kombinasi perlakuan yang digunakan sebagai rancangan percobaan sebagaimana disajikan pada Tabel 3.3. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode dekoksi sesuai kombinasi perlakuan yang dihasilkan. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya dianalisis untuk menentukan kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total sebagai respons penelitian.

Tabel 3.3 Kombinasi perlakuan untuk optimasi ekstraksi menggunakan RSM dengan desain CCD

Run	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu (menit)	Rasio sampel/pelarut (g/mL)
1	70	40	1:20
2	80	50	1:25
3	70	40	1:20
4	60	50	1:25
5	70	57	1:20
6	70	40	1:28
7	70	40	1:12
8	80	50	1:15
9	70	40	1:20
10	70	40	1:20
11	70	40	1:20
12	60	50	1:15
13	80	30	1:25
14	60	30	1:15
15	87	40	1:20
16	60	30	1:25
17	70	23	1:20
18	80	30	1:15
19	53	40	1:20
20	70	40	1:20

Data respons yang diperoleh dimasukkan ke dalam *software Design-Expert* untuk dianalisis menggunakan model polinomial kuadrat. Analisis dilakukan melalui uji *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengevaluasi signifikansi model, pengaruh masing-masing variabel, serta interaksi antarvariabel terhadap respons. Hubungan antara variabel independen dan respons divisualisasikan menggunakan kurva permukaan respon tiga dimensi (*3D response*

surface plot). Berdasarkan model yang diperoleh, dilakukan optimasi numerik (*numeric optimization*) untuk menentukan kombinasi suhu, waktu, dan rasio sampel terhadap pelarut yang menghasilkan respons optimum berupa kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total. Validasi kondisi optimum dilakukan dengan melakukan percobaan pada kombinasi suhu, waktu, dan rasio sampel terhadap pelarut hasil prediksi optimum oleh *software Design-Expert*. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan, kemudian dilakukan pengukuran kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total. Nilai respons hasil percobaan selanjutnya dibandingkan dengan nilai respons prediksi model untuk mengevaluasi keakuratan model yang dihasilkan.

3.4.5 Penentuan Kapasitas Antioksidan dengan Metode DPPH

3.4.5.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar Asam Askorbat

Larutan standar asam askorbat dengan variasi konsentrasi (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14) mg/L masing-masing dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2,5 mL DPPH 0,1 mM, kemudian diinkubasi pada tempat gelap selama 30 menit, selanjutnya ditentukan panjang gelombang maksimum dan absorbansi larutan standar asam askorbat diukur pada panjang gelombang maksimum (520 nm) menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Kemudian dibuat kurva kalibrasi standar asam askorbat.

3.4.5.2 Penentuan Kapasitas Antioksidan dalam Sampel

Ekstrak daun sirsak dipipet sebanyak 1 mL dan ditambahkan 2,5 mL DPPH 0,1 mM. kemudian diinkubasi pada tempat gelap selama 30 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Larutan blanko yang digunakan yaitu 2,5 mL DPPH 0,1 mM dan 1 mL air suling.

3.4.6 Penentuan Fenolik Total dengan Metode Folin-Ciocalteu

3.4.6.1 Pembuatan Larutan Standar Asam Galat

Larutan standar asam galat dibuat dengan variasi konsentrasi (10, 20, 30, 40, 50, 60) mg/L, kemudian masing-masing dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu. Larutan dikocok dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan larutan Na_2CO_3 7% sebanyak 4 mL dan ditambahkan air suling hingga tanda batas, lalu diinkubasi ditempat gelap selama 2 jam. Selanjutnya ditentukan panjang gelombang maksimum dan absorbansi larutan standar asam galat diukur pada panjang gelombang maksimum (725 nm) menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Kemudian dibuat kurva kalibrasi standar asam galat.

3.4.6.2 Penentuan Kandungan Fenolik Total dalam Sampel

Ekstrak daun sirsak dipipet sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu. Larutan dikocok dan didiamkan selama 5 menit lalu ditambahkan larutan Na_2CO_3 7% sebanyak 4 mL. Larutan ditepatkan volumenya dengan air suling hingga volume 10 mL dan didiamkan selama 2 jam. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 725 nm menggunakan Spektrofotometer UV- Vis.

BAB IV. HASIL DAN DISKUSI

4.1 Identifikasi Sampel

Identifikasi sampel tanaman sirsak dilakukan di Laboratorium Herbarium Universitas Andalas (ANDA), Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Berdasarkan dokumen hasil identifikasi Nomor 733/K-ID/ANDA/XII/2025 (terlampir pada Lampiran 4). Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini telah diidentifikasi sebagai berikut:



Gambar 4.1 Tanaman sirsak

Keluarga : *Annonaceae*
Genus : *Annona*
Spesies : *Annona muricata* L.

4.2 Kondisi Optimum Ekstraksi Daun Sirsak dengan Metode OFAT

Penentuan kondisi optimum ekstraksi merupakan tahapan penting dalam memperoleh senyawa bioaktif secara maksimal dari daun sirsak (*Annona muricata* L.), karena kondisi proses yang tepat akan memengaruhi efisiensi pelepasan senyawa aktif seperti fenolik dan antioksidan dari matriks tanaman. Pada penelitian ini, optimasi awal dilakukan menggunakan metode OFAT, yaitu pendekatan dengan memvariasikan satu variabel independen pada satu waktu sementara variabel lain dijaga konstan. Pendekatan ini digunakan untuk mengevaluasi pengaruh spesifik masing-masing parameter ekstraksi terhadap respon yang diamati, sehingga dapat diketahui faktor mana yang paling berpengaruh serta rentang kondisi yang potensial untuk optimasi lanjutan. Daffa'Aththobarani *et al.* (2025) menyatakan bahwa metode OFAT efektif digunakan sebagai tahap awal karena mampu memberikan gambaran dasar mengenai pengaruh setiap variabel proses sebelum dilakukan optimasi dengan beberapa variabel secara bersamaan yang lebih kompleks. Dengan demikian, metode OFAT dalam penelitian ini digunakan sebagai langkah awal untuk menentukan rentang kondisi ekstraksi yang paling relevan dan berpengaruh, sehingga dapat menjadi dasar dalam penyusunan batas variabel pada optimasi lanjutan menggunakan RSM³³.

Variabel yang diteliti dalam metode OFAT meliputi suhu ekstraksi, waktu ekstraksi, dan rasio sampel terhadap pelarut, karena ketiga faktor tersebut secara teoritis berperan langsung terhadap proses perpindahan massa, kelarutan senyawa bioaktif, dan efisiensi kontak antara

sampel dengan pelarut. Suhu ekstraksi memengaruhi difusi pelarut ke dalam matriks sel serta kelarutan senyawa target, sehingga peningkatan suhu pada batas tertentu dapat meningkatkan pelepasan senyawa aktif, namun suhu berlebih berpotensi menyebabkan degradasi senyawa termolabil. Waktu ekstraksi menentukan lamanya interaksi antara pelarut dan sampel, sehingga waktu yang cukup diperlukan untuk mencapai kesetimbangan ekstraksi, sedangkan waktu yang terlalu lama dapat menurunkan kualitas ekstrak akibat oksidasi atau kerusakan senyawa aktif. Rasio sampel terhadap pelarut juga berperan penting karena memengaruhi gradien konsentrasi yang mendorong perpindahan senyawa target ke dalam pelarut. Hal ini sejalan dengan penelitian oleh Mahesh dan Selvakumarsamy (2024) menjelaskan bahwa parameter proses seperti suhu, waktu, dan rasio sampel terhadap pelarut merupakan faktor penting yang memengaruhi efisiensi ekstraksi senyawa bioaktif dari daun sirsak, termasuk antioksidan dan asetogenin¹².

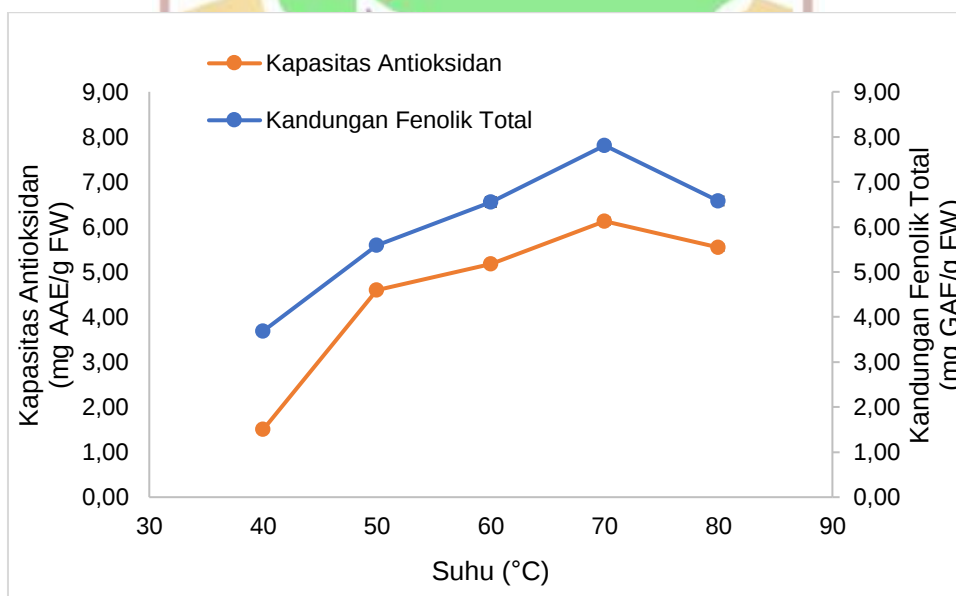
Setiap perlakuan pada metode OFAT dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (triplo) untuk meningkatkan ketelitian, keakuratan, dan konsistensi data (hasil perhitungan disajikan pada Lampiran 8 dan 9). Pengulangan ini penting karena hasil menunjukkan bahwa pelaksanaan percobaan secara berulang memungkinkan penilaian variasi antarhasil dan mengurangi pengaruh kesalahan acak selama proses ekstraksi maupun pengukuran. Dengan demikian, semakin seragam hasil dari setiap pengulangan, semakin tinggi tingkat ketepatan metode yang digunakan. Secara teoritis, pengukuran berulang merupakan prinsip penting dalam kimia analitik karena dapat meningkatkan keandalan data melalui perhitungan simpangan baku serta evaluasi penyebaran hasil. Araujo (2009) menyatakan bahwa validasi metode analitik memerlukan evaluasi presisi melalui pengukuran berulang untuk memastikan bahwa metode menghasilkan data yang konsisten dan dapat dipercaya, sehingga hasil analisis yang diperoleh lebih valid³⁹.

Selain itu, dilakukan uji *outlier* untuk mengidentifikasi data yang menyimpang secara signifikan dari pola umum pengulangan sehingga nilai ekstrem yang berpotensi berasal dari kesalahan teknis, kesalahan pembacaan instrumen, atau faktor eksperimental lain dapat dieliminasi (hasil perhitungan *outlier* disajikan pada Lampiran 10). Hasil ini menunjukkan bahwa validitas data meningkat karena analisis hanya menggunakan data yang seragam dan mewakili kondisi sebenarnya. Secara teori, uji *outlier* merupakan langkah penting dalam pengendalian mutu data karena keberadaan nilai ekstrem dapat menggeser nilai rata-rata dan memperbesar simpangan baku secara berlebihan, sehingga interpretasi hasil menjadi kurang akurat. Zenkevich *et al.* (2022) menjelaskan bahwa pengolahan data analitik memerlukan identifikasi nilai menyimpang agar interpretasi hasil lebih tepat dan dapat dipercaya. Dengan demikian, kombinasi pengulangan triplo dan uji *outlier* menjadikan hasil OFAT lebih andal secara statistik, karena tidak hanya memiliki ketelitian yang baik tetapi juga telah melalui evaluasi untuk meminimalkan penyimpangan data yang dapat menurunkan kualitas interpretasi hasil⁴⁰.

4.2.1 Variasi Suhu

Suhu merupakan salah satu parameter penting dalam proses ekstraksi karena berpengaruh langsung terhadap efisiensi perpindahan massa, kelarutan senyawa, serta stabilitas senyawa bioaktif yang diekstraksi. Secara teoritis, peningkatan suhu dapat mempercepat difusi senyawa dari matriks tanaman ke dalam pelarut melalui peningkatan energi kinetik molekul, sehingga laju ekstraksi meningkat. Selain itu, suhu yang lebih tinggi juga mampu meningkatkan kelarutan senyawa bioaktif, serta membantu merusak atau melunakkan dinding sel tanaman sehingga senyawa target lebih mudah terlepas. Namun, suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan degradasi termal, oksidasi, atau perubahan struktur senyawa bioaktif yang sensitif terhadap panas. Oleh karena itu, pemilihan suhu ekstraksi harus mempertimbangkan keseimbangan antara peningkatan efisiensi ekstraksi dan kestabilan senyawa yang dihasilkan²⁸.

Pada penelitian ini, suhu ekstraksi divariasikan pada 40, 50, 60, 70, dan 80 °C, sedangkan waktu ekstraksi dijaga konstan selama 30 menit dan rasio sampel terhadap pelarut ditetapkan sebesar 1:20. Pengaturan ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh suhu secara spesifik terhadap kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total daun sirsak, sehingga perubahan respons yang diperoleh dapat secara langsung dikaitkan dengan variasi suhu tanpa dipengaruhi oleh faktor lain.



Gambar 4.2 Pengaruh suhu ekstraksi daun sirsak terhadap respons dengan metode OFAT

Nilai kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total dihitung menggunakan kurva kalibrasi standar asam askorbat dan asam galat (Lampiran 6 dan Lampiran 7). Berdasarkan hasil penelitian pada Gambar 4.2, peningkatan suhu ekstraksi dari 40 °C hingga 70 °C terbukti berpengaruh positif terhadap kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total daun sirsak. Kapasitas antioksidan meningkat dari $1,5004 \pm 0,05$ mg AAE/g FW pada 40 °C menjadi $6,1263 \pm 0,08$ mg AAE/g FW pada 70 °C, sedangkan kandungan fenolik total meningkat dari $3,6862 \pm 0,09$ mg GAE/g FW menjadi $7,8091 \pm 0,07$ mg GAE/g FW pada suhu yang sama. Hasil ini

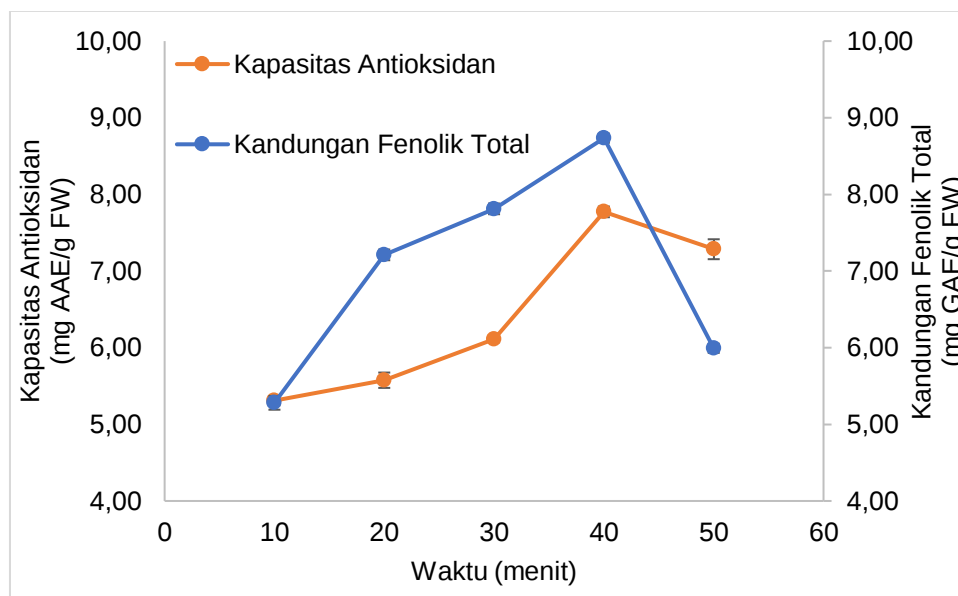
menunjukkan bahwa semakin tinggi suhu hingga batas optimum, semakin besar jumlah senyawa antioksidan dan fenolik yang berhasil diekstraksi. Kondisi tersebut berarti bahwa kenaikan suhu meningkatkan efektivitas proses ekstraksi melalui peningkatan kelarutan senyawa bioaktif, percepatan difusi, serta pelepasan senyawa dari jaringan daun ke pelarut. Hasil ini sejalan dengan teori perpindahan massa yang menyatakan bahwa suhu yang lebih tinggi meningkatkan koefisien difusi dan efisiensi transfer senyawa dari matriks padat ke fase cair. Hasil ini juga didukung oleh Castillo-Correa *et al.* (2025) yang melaporkan bahwa peningkatan suhu pada rentang optimum secara signifikan meningkatkan perolehan fenolik total dan kapasitas antioksidan karena meningkatnya pelepasan senyawa bioaktif dari matriks tanaman²⁸.

Namun, pada suhu 80 °C terjadi penurunan kapasitas antioksidan menjadi $5,5397 \pm 0,07$ mg AAE/g FW dan kandungan fenolik total menjadi $6,5770 \pm 0,10$ mg GAE/g FW. Hasil ini menunjukkan bahwa suhu yang terlalu tinggi justru menurunkan jumlah senyawa bioaktif yang terdeteksi. Penurunan tersebut mengindikasikan bahwa sebagian senyawa antioksidan dan fenolik mengalami degradasi termal atau oksidasi akibat paparan panas berlebih, sehingga stabilitas senyawa menurun. Hal ini sejalan dengan penelitian Markhali *et al.* (2022) pada ekstraksi daun zaitun (*olive mill leaves*) dengan variasi suhu 45, 55, dan 75 °C, di mana total fenolik tertinggi diperoleh pada 55 °C sebesar 42,53 mg GAE/g ekstrak, sedangkan pada suhu 75 °C kandungan fenolik menurun meskipun aktivitas antioksidan tertentu masih tinggi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa peningkatan suhu hanya meningkatkan efisiensi ekstraksi hingga titik optimum, sedangkan suhu yang lebih tinggi dapat menurunkan kestabilan sebagian senyawa fenolik akibat degradasi termal. Dengan demikian, suhu 70 °C dapat dianggap sebagai kondisi optimum pada tahap OFAT untuk menghasilkan kapasitas antioksidan dan fenolik total tertinggi⁴¹.

4.2.2 Variasi Waktu

Selain suhu, waktu ekstraksi merupakan parameter penting dalam proses ekstraksi karena menentukan lamanya kontak antara pelarut dan matriks sampel, yang secara langsung memengaruhi efisiensi perpindahan massa senyawa bioaktif dari sampel ke dalam pelarut. Semakin lama waktu ekstraksi, maka semakin besar kesempatan pelarut menembus dinding sel untuk melarutkan senyawa antioksidan dan fenolik sehingga jumlah senyawa yang terekstraksi cenderung meningkat. Namun, waktu ekstraksi yang terlalu lama juga dapat memberikan efek negatif karena senyawa fenolik dan antioksidan rentan mengalami degradasi akibat paparan panas dan oksidasi berkepanjangan. Oleh karena itu, penentuan waktu ekstraksi optimum menjadi penting untuk memperoleh hasil ekstraksi yang maksimal tanpa menurunkan kestabilan senyawa bioaktif. Hal ini sejalan dengan Nurcholis *et al.* (2022) yang melaporkan bahwa durasi ekstraksi secara signifikan memengaruhi kandungan fenolik total dan aktivitas antioksidan, di mana peningkatan waktu ekstraksi dapat meningkatkan hasil hingga batas optimum tertentu sebelum akhirnya menurun akibat degradasi senyawa³⁰.

Pada penelitian ini, waktu ekstraksi divariasikan pada 10, 20, 30, 40, dan 50 menit, sedangkan suhu ekstraksi dijaga konstan pada 70 °C dan rasio sampel terhadap pelarut ditetapkan sebesar 1:20 g/mL. Pengaturan kondisi tersebut bertujuan untuk mengkaji secara spesifik pengaruh waktu terhadap perolehan senyawa antioksidan dan fenolik total dari daun sirsak. Dengan demikian, perubahan respons yang diperoleh dapat secara langsung dikaitkan dengan variasi waktu ekstraksi, karena parameter lainnya dipertahankan tetap.



Gambar 4.3 Pengaruh waktu ekstraksi daun sirsak terhadap respons dengan metode OFAT

Pengaruh variasi waktu ekstraksi daun sirsak terhadap kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total dapat dilihat pada Gambar 4.3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu ekstraksi berpengaruh signifikan terhadap kedua respons, di mana peningkatan waktu dari 10 hingga 40 menit menyebabkan kapasitas antioksidan meningkat dari $5,3095 \pm 0,06$ mg AAE/g FW menjadi $7,7718 \pm 0,07$ mg AAE/g FW, sedangkan kandungan fenolik total meningkat dari $5,2807 \pm 0,09$ mg GAE/g FW menjadi $8,7336 \pm 0,06$ mg GAE/g FW. Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama waktu ekstraksi hingga batas optimum, maka semakin banyak jumlah senyawa bioaktif yang berhasil diekstraksi. Peningkatan tersebut terjadi karena waktu kontak yang lebih lama memungkinkan pelarut berdifusi lebih optimal ke dalam jaringan daun, melunakkan dinding sel, dan meningkatkan pelepasan senyawa fenolik serta antioksidan ke dalam pelarut. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian optimasi ekstraksi daun sirsak oleh Hartati *et al.* (2024), yang melaporkan bahwa kondisi ekstraksi yang memberikan waktu kontak lebih optimal menghasilkan aktivitas antioksidan lebih tinggi karena pelepasan senyawa aktif, khususnya fenolik dan flavonoid, berlangsung lebih efektif¹¹.

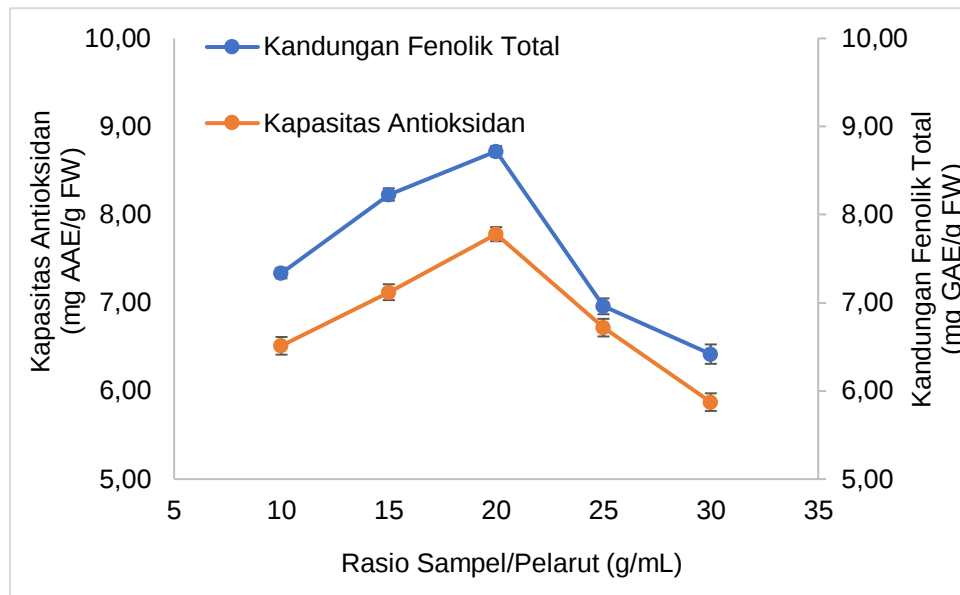
Ketika waktu ekstraksi diperpanjang hingga 50 menit, kapasitas antioksidan menurun menjadi $7,2846 \pm 0,12$ mg AAE/g FW dan kandungan fenolik total turun menjadi $5,9922 \pm 0,06$ mg GAE/g FW. Penurunan ini menunjukkan bahwa waktu ekstraksi yang terlalu lama dapat menyebabkan degradasi senyawa fenolik akibat paparan panas berkepanjangan. Senyawa fenolik diketahui sensitif terhadap suhu tinggi, sehingga pemanasan berlebih dapat memicu

kerusakan struktur kimia dan oksidasi gugus hidroksil. Hal ini sejalan dengan penelitian Yefrida *et al.* (2026) pada ekstraksi daun kelor (*Moringa oleifera*) menggunakan metode dekoksi berbasis air, yang menunjukkan bahwa waktu ekstraksi berpengaruh terhadap kapasitas antioksidan dengan pola meningkat hingga titik optimum, kemudian menurun pada durasi lebih lama. Pada penelitian tersebut, kapasitas antioksidan meningkat tajam dari waktu 10 menit dan mencapai nilai maksimum pada 20 menit, kemudian menurun pada 30 dan 40 menit akibat pemanasan berkepanjangan. Hal serupa juga didukung oleh penelitian Megawati *et al.* (2020) pada ekstraksi daun sirsak menggunakan metode *microwave-assisted extraction* (MAE), yang menunjukkan bahwa peningkatan waktu ekstraksi dari 2 hingga 8 menit pada daya 600 W meningkatkan rendemen dan total fenol secara signifikan hingga mencapai kondisi optimum pada 8 menit dengan rendemen maksimum 33,98% dan total fenol tertinggi sebesar 24,10 mg GAE/g ekstrak. Namun, ketika waktu ekstraksi diperpanjang hingga 10 menit, peningkatan total fenol tidak lagi signifikan karena sebagian besar senyawa fenolik telah terekstraksi, sedangkan paparan energi panas yang lebih lama mulai menurunkan stabilitas senyawa bioaktif^{34,42}.

4.2.3 Variasi Rasio Sampel terhadap Pelarut

Selain suhu dan waktu, rasio sampel terhadap pelarut juga merupakan parameter penting dalam proses ekstraksi karena menentukan keseimbangan antara jumlah sampel yang diekstraksi dan kapasitas pelarut dalam melarutkan senyawa bioaktif. Rasio sampel terhadap pelarut berpengaruh langsung terhadap efektivitas perpindahan massa, karena jumlah pelarut yang memadai akan meningkatkan gradien konsentrasi antara matriks sampel dan pelarut sehingga senyawa aktif lebih mudah berdifusi keluar dari jaringan tanaman. Menurut Siddiqui *et al.* (2025), rasio padat-cair yang tepat dapat meningkatkan kelarutan senyawa fenolik, memperluas kontak antara pelarut dan permukaan bahan, serta mempercepat proses difusi, sehingga efisiensi ekstraksi meningkat. Sebaliknya, rasio yang terlalu rendah dapat menyebabkan pelarut cepat jenuh dan membatasi pelepasan senyawa bioaktif, sedangkan rasio yang terlalu tinggi dapat menurunkan efisiensi karena efek pengenceran. Oleh karena itu, optimasi rasio sampel terhadap pelarut diperlukan untuk memperoleh kondisi ekstraksi yang paling efektif³¹.

Pada penelitian ini, rasio sampel terhadap pelarut divariasikan pada 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, dan 1:30 dengan suhu dan waktu ekstraksi dijaga konstan pada 70 °C selama 40 menit. Kondisi suhu dan waktu tersebut dipilih berdasarkan hasil optimasi sebelumnya yang menunjukkan bahwa keduanya merupakan kondisi terbaik untuk menghasilkan kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total tertinggi. Penetapan suhu dan waktu secara konstan bertujuan agar perubahan respons yang diamati hanya disebabkan oleh variasi rasio sampel terhadap pelarut, sehingga pengaruh rasio terhadap efisiensi ekstraksi dapat dianalisis secara lebih spesifik.



Gambar 4.4 Pengaruh rasio sampel/pelarut terhadap respons dengan metode OFAT

Pengaruh variasi rasio sampel/pelarut terhadap kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total dapat dilihat pada Gambar 4.4. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan rasio sampel terhadap pelarut dari 1:10 hingga 1:20 meningkatkan kapasitas antioksidan dari $6,5122 \pm 0,10$ mg AAE/g FW menjadi $7,7792 \pm 0,08$ mg AAE/g FW dan kandungan fenolik total dari $7,3377 \pm 0,06$ mg GAE/g FW menjadi $8,7192 \pm 0,06$ mg GAE/g FW. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar rasio pelarut hingga titik optimum, maka semakin banyak jumlah senyawa antioksidan dan fenolik yang berhasil diekstraksi. Peningkatan ini menunjukkan bahwa penambahan volume pelarut hingga rasio tertentu mampu meningkatkan efisiensi ekstraksi melalui peningkatan gradien konsentrasi, sehingga perpindahan massa senyawa fenolik dan antioksidan dari matriks tanaman ke pelarut berlangsung lebih efektif. Namun, pada rasio yang lebih tinggi yaitu 1:25 dan 1:30, kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total mengalami penurunan. Kapasitas antioksidan turun menjadi $6,7184 \pm 0,10$ mg AAE/g FW pada rasio 1:25, kemudian kembali turun menjadi $5,8735 \pm 0,10$ mg AAE/g FW pada rasio 1:30. Pola serupa juga terjadi pada kandungan fenolik total, yang turun menjadi $6,9603 \pm 0,09$ mg GAE/g FW pada rasio 1:25 dan $6,4179 \pm 0,11$ mg GAE/g FW pada rasio 1:30. Hal ini menunjukkan bahwa setelah titik optimum tercapai, penambahan pelarut berlebih tidak lagi meningkatkan jumlah senyawa yang terekstraksi secara signifikan, tetapi justru menyebabkan penurunan konsentrasi ekstrak akibat efek pengenceran. Senyawa antioksidan dan fenolik yang telah larut tersebar dalam volume pelarut yang lebih besar sehingga konsentrasi senyawa dalam ekstrak menurun.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Wang *et al.* (2024) pada daun *Moringa oleifera* yang melaporkan bahwa peningkatan rasio pelarut meningkatkan kandungan fenolik total dan kandungan flavonoid total hingga mencapai rasio optimum 1:40 g/mL, tetapi pada rasio yang lebih tinggi (1:50–1:60 g/mL) hasil ekstraksi justru menurun. Pada penelitian tersebut, TPC tertinggi diperoleh sebesar 85,22 mg GAE/g pada rasio optimum, kemudian

turun menjadi 66,50 mg GAE/g pada rasio 1:60 g/mL. Kesamaan tren ini menunjukkan bahwa rasio sampel terhadap pelarut memberikan pola umum berupa peningkatan hasil ekstraksi hingga titik optimum, kemudian menurun akibat pengenceran. Dengan demikian, hasil penelitian ini memperkuat bahwa rasio sampel terhadap pelarut merupakan parameter penting yang harus dioptimalkan secara tepat, dan pada metode dekoksi daun sirsak, rasio 1:20 merupakan kondisi terbaik untuk memperoleh kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total maksimum⁴³.

4.3 Kondisi Optimum Ekstraksi Daun Sirsak dengan Metode RSM

Setelah kondisi awal optimum masing-masing parameter diperoleh melalui metode OFAT, optimasi selanjutnya dilakukan menggunakan RSM dengan desain CCD. Metode ini digunakan karena mampu menganalisis pengaruh beberapa variabel proses secara bersamaan, termasuk interaksi antarvariabel, terhadap respons yang diamati sehingga optimasi dapat dilakukan secara lebih komprehensif dibandingkan pendekatan satu faktor. Melalui desain CCD, kombinasi perlakuan disusun secara sistematis untuk menghasilkan model prediktif yang dapat menggambarkan hubungan antarvariabel serta menentukan kondisi optimum proses dengan jumlah percobaan yang lebih efisien. Pendekatan ini sejalan dengan penelitian Sivaji *et al.* (2025) yang melaporkan bahwa RSM dengan desain seperti CCD dan BBD merupakan metode optimasi yang efektif karena mampu mengevaluasi hubungan variabel proses secara menyeluruh sekaligus meningkatkan efisiensi eksperimen dalam penentuan kondisi optimum⁴⁴.

Dalam penelitian ini, optimasi menggunakan RSM dengan desain CCD melibatkan tiga variabel bebas, yaitu suhu ekstraksi (53–87 °C), waktu ekstraksi (23–57 menit), dan rasio sampel terhadap pelarut (1:12–1:28 g/mL), dengan dua respons yang diamati berupa kapasitas antioksidan (mg AAE/g FW) dan kandungan fenolik total (mg GAE/g FW). Rentang masing-masing variabel ditentukan berdasarkan hasil optimasi awal metode OFAT, di mana suhu 70 °C, waktu 40 menit, dan rasio 1:20 memberikan kondisi terbaik sehingga digunakan sebagai titik pusat (*center point*) dalam desain. Penetapan titik pusat berdasarkan kondisi awal optimum bertujuan agar desain eksperimen terfokus pada area yang paling berpotensi menghasilkan respons maksimum. Dalam CCD, setiap variabel disusun pada lima tingkat perlakuan yang terdiri atas level rendah, tinggi, titik pusat, serta dua titik aksial ($\pm\alpha$) untuk memperluas ruang eksperimen. Penggunaan titik aksial ini memungkinkan identifikasi efek kuadratik atau hubungan non-linear antarvariabel, sehingga model permukaan respons orde dua yang dihasilkan menjadi lebih akurat dalam memprediksi kondisi optimum. Pendekatan ini sejalan dengan Bhattacharya (2021) yang menjelaskan bahwa CCD dirancang untuk mengevaluasi efek linear, interaksi, dan kuadratik secara sistematis melalui kombinasi titik faktorial, titik pusat, dan titik aksial dalam proses optimasi³⁸.

Berdasarkan data yang tersaji pada Tabel 4.1, kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total yang dihasilkan dari 20 run percobaan desain CCD menunjukkan variasi yang

cukup besar antar perlakuan. kapasitas antioksidan berkisar antara 4,7227 mg AAE/g FW (run ke-19: suhu 53 °C, waktu 40 menit, rasio 1:20) hingga 8,2457 mg AAE/g FW (run ke-3: suhu 70 °C, waktu 40 menit, rasio 1:20), sementara kandungan fenolik total berkisar antara 6,0688 mg GAE/g FW (run ke-16: suhu 60 °C, waktu 30 menit, rasio 1:25) hingga 9,2290 mg GAE/g FW (run ke-11: suhu 70 °C, waktu 40 menit, rasio 1:20). Keragaman nilai respons yang cukup besar ini mengindikasikan bahwa ketiga variabel independen, yaitu suhu, waktu, dan rasio sampel terhadap pelarut memiliki pengaruh yang nyata terhadap kedua respons, baik secara individual maupun melalui interaksi antarvariabel.

Nilai tertinggi untuk kedua respons secara konsisten diperoleh pada kondisi titik pusat desain CCD, yaitu pada suhu 70 °C, waktu 40 menit, dan rasio sampel terhadap pelarut 1:20, dengan kapasitas antioksidan sebesar 8,2457 mg AAE/g FW (run ke-3) dan kandungan fenolik total sebesar 9,2290 mg GAE/g FW (run ke-11). Konsistensi antara kondisi optimum yang diidentifikasi melalui OFAT dengan nilai tertinggi yang diperoleh pada titik pusat desain CCD mengkonfirmasi bahwa pendekatan bertahap dari OFAT ke RSM merupakan strategi optimasi yang sistematis dan efektif dalam penentuan kondisi ekstraksi optimal senyawa bioaktif dari daun sirsak.



Tabel 4.1 Hasil respons aktual dan prediksi model pada optimasi menggunakan RSM dengan desain CCD

Variabel Independen				Respons			
Run	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Rasio sampel/pelarut (g/mL)	kapasitas Antioksidan (mg AAE/g FW)		Kandungan Fenolik Total (mg GAE/g FW)	
				Aktual	Predikal	Aktual	Predikal
1	70	40	1:20	7,6686	7,9054	8,5194	8,8070
2	80	50	1:25	7,0402	6,9004	7,8017	7,6298
3	70	40	1:20	8,2457	7,9054	9,1534	8,8070
4	60	50	1:25	6,1793	5,8292	6,8204	6,4553
5	70	57	1:20	6,7608	7,1199	7,5488	7,9062
6	70	40	1:28	6,1109	6,4158	6,7491	7,1241
7	70	40	1:12	7,3946	7,5243	8,2967	8,4104
8	80	50	1:15	7,8978	7,7625	8,7701	8,6734
9	70	40	1:20	7,7782	7,9054	8,5188	8,8070
10	70	40	1:20	7,8886	7,9054	8,7059	8,8070
11	70	40	1:20	8,0263	7,9054	9,2290	8,8070
12	60	50	1:15	6,8763	6,6619	7,6499	7,4186
13	80	30	1:25	7,1095	7,0457	7,8956	7,8143
14	60	30	1:15	5,9374	5,7990	6,5577	6,4170
15	87	40	1:20	7,5034	7,5257	8,3326	8,3562
16	60	30	1:25	5,4182	5,2754	6,0688	5,8528
17	70	23	1:20	6,4841	6,5099	7,1363	7,2117
18	80	30	1:15	7,5268	7,5987	8,4065	8,4589
19	53	40	1:20	4,7227	5,0854	5,2130	5,6222
20	70	40	1:20	7,9166	7,9054	8,8185	8,8070

Perubahan respons pada percobaan titik aksial menunjukkan pengaruh suhu terhadap kedua parameter yang diamati. Pada variasi suhu, run ke-19 yang berada pada titik aksial bawah (53 °C) menghasilkan nilai terendah, yaitu 4,7227 mg AAE/g FW untuk kapasitas antioksidan dan 5,2130 mg GAE/g FW untuk kandungan fenolik total. Sementara itu, run ke-15 pada titik aksial atas (87 °C) juga menunjukkan respons yang lebih rendah dibandingkan titik pusat, dengan nilai masing-masing 7,5034 mg AAE/g FW dan 8,3326 mg GAE/g FW. Hal ini menunjukkan bahwa suhu ekstraksi yang terlalu rendah maupun terlalu tinggi sama-sama kurang efektif dalam menghasilkan ekstrak dengan kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total yang optimum. Pada suhu rendah, energi panas yang tersedia belum cukup untuk meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam matriks sel serta mempercepat difusi senyawa fenolik dan antioksidan, sehingga pelepasan senyawa bioaktif masih terbatas. Sebaliknya, suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan degradasi termal, oksidasi, atau kerusakan struktur senyawa fenolik yang bersifat termolabil sehingga jumlah senyawa aktif yang terukur menurun. Hal ini sejalan dengan penelitian Mahesh dan Selvakumarsamy (2024) pada

optimasi ekstraksi daun sirsak menggunakan RSM dengan variasi suhu 30–50 °C, di mana kondisi optimum diperoleh pada suhu 39 °C, menghasilkan aktivitas penangkal radikal DPPH sebesar 90,27% dan kandungan acetogenin total sebesar 17,48 mg/g, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi dari kondisi optimum terjadi penurunan respons ekstraksi¹².

Pada variabel waktu, run ke-17 yang mewakili titik aksial bawah (23 menit) menghasilkan kapasitas antioksidan sebesar 6,4841 mg AAE/g FW dan kandungan fenolik total 7,1363 mg GAE/g FW, sedangkan run ke-5 pada titik aksial atas (57 menit) memberikan nilai 6,7608 mg AAE/g FW dan 7,5488 mg GAE/g FW. Kedua hasil tersebut lebih rendah dibandingkan respons pada titik pusat, yang menunjukkan bahwa waktu ekstraksi yang terlalu singkat maupun terlalu lama sama-sama kurang optimal. Waktu yang terlalu pendek menyebabkan proses perpindahan massa belum berlangsung maksimal, sehingga senyawa bioaktif belum terekstraksi secara sempurna, sementara waktu yang terlalu lama dapat meningkatkan risiko degradasi atau oksidasi senyawa target selama proses ekstraksi. Hal ini juga sejalan dengan penelitian Mahesh dan Selvakumarsamy (2024) pada optimasi ekstraksi daun sirsak menggunakan RSM dengan variasi waktu 24–72 jam, yang melaporkan bahwa peningkatan waktu ekstraksi meningkatkan perolehan senyawa bioaktif hingga mencapai kondisi optimum pada 45,5 jam dengan aktivitas antioksidan DPPH sebesar 90,27% dan kandungan asetogenin total 17,48 mg/g, namun respons menurun pada waktu yang lebih lama. Hasil tersebut menunjukkan bahwa waktu ekstraksi yang berlebihan dapat menurunkan stabilitas senyawa aktif sehingga efisiensi ekstraksi berkurang¹².

Pada variabel rasio sampel terhadap pelarut, run ke-7 yang mewakili titik aksial bawah (rasio 1:12) menghasilkan nilai respons yang lebih rendah dibandingkan titik pusat, yaitu dengan kapasitas antioksidan sebesar 7,3946 mg AAE/g FW dan kandungan fenolik total 8,2967 mg GAE/g FW, sedangkan run ke-6 pada titik aksial atas (rasio 1:28) juga menunjukkan nilai respons yang lebih rendah dibandingkan titik pusat. Untuk kapasitas antioksidan yaitu sebesar 6,1109 mg AAE/g FW dan kandungan fenolik total sebesar 6,7491 mg GAE/g FW. Kedua hasil tersebut lebih rendah dibandingkan titik pusat (rasio 1:20), yang menunjukkan bahwa rasio pelarut yang terlalu rendah maupun terlalu tinggi sama-sama kurang optimal. Pada rasio rendah, jumlah pelarut terbatas sehingga pelarut lebih cepat jenuh dan kemampuan melarutkan senyawa bioaktif menjadi berkurang. Sebaliknya, pada rasio terlalu tinggi terjadi efek pengenceran, di mana senyawa antioksidan dan fenolik yang telah larut tersebar dalam volume pelarut yang lebih besar sehingga konsentrasi senyawa dalam ekstrak menurun. Hal juga ini sejalan dengan penelitian Mahesh dan Selvakumarsamy (2024) pada optimasi ekstraksi daun sirsak menggunakan RSM, yang melaporkan bahwa rasio sampel terhadap pelarut optimum diperoleh pada 1:34 dengan aktivitas penangkal radikal DPPH sebesar 90,27% dan kandungan acetogenin total sebesar 17,48 mg/g, sedangkan peningkatan rasio hingga mendekati 1:50 menyebabkan respons menurun dibandingkan kondisi optimum¹².

Persamaan polinomial orde dua digunakan dalam RSM untuk memodelkan hubungan antara variabel independen dengan respons serta memprediksi kondisi optimum proses. Model matematis tersebut dinyatakan sebagai berikut:

$$Y_{\text{respons}} = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^3 \beta_{ij} X_i X_j + e_i$$

Dalam persamaan tersebut, Y merupakan respons yang diamati, yaitu kapasitas antioksidan atau kandungan fenolik total; X_1 , X_2 , dan X_3 adalah variabel independen; β_0 adalah konstanta atau intersep; β_i menunjukkan koefisien pengaruh linier; β_{ii} menunjukkan koefisien pengaruh kuadratik; β_{ij} menunjukkan koefisien interaksi antarvariabel; sedangkan e_i merupakan galat atau *error*. Model ini digunakan untuk mengevaluasi pengaruh masing-masing faktor, baik secara individu maupun interaksi, terhadap respons sehingga dapat digunakan dalam penentuan kondisi optimum. Hal ini sejalan dengan penelitian oleh Nurcholis *et al.* (2023) yang menjelaskan bahwa model polinomial orde dua pada RSM efektif untuk menganalisis pengaruh linier, kuadratik, dan interaksi variabel proses terhadap kandungan fenolik total serta aktivitas antioksidan, sehingga mampu memprediksi kondisi ekstraksi optimum secara lebih akurat⁴⁵.

Berdasarkan *output Design-Expert* versi 13, persamaan model polinomial orde dua dalam faktor terkode (*coded factors*) untuk masing-masing respons adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{kapasitas antioksidan} = & 7,91 + 0,7177A + 0,1794B - 0,3464C - 0,1748AB - 0,0074AC \\ & - 0,0773BC - 0,5536A^2 - 0,3773B^2 - 0,3654C^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kandungan fenolik total} = & 8,81 + 0,8041A + 0,2043B - 0,4020C - 0,1968AB - 0,0201AC \\ & - 0,0998BC - 0,6290A^2 - 0,4318B^2 - 0,4061C^2 \end{aligned}$$

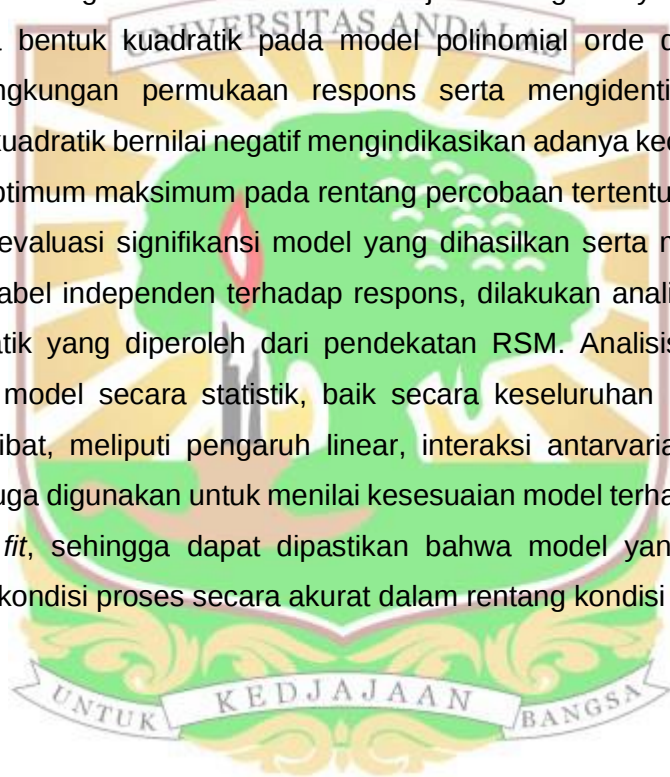
Persamaan tersebut menunjukkan hubungan matematis antara variabel independen, yaitu suhu (A), waktu (B), dan rasio sampel terhadap pelarut (C), terhadap respons berupa kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total. Nilai intersep positif, yaitu 7,91 pada kapasitas antioksidan dan 8,81 pada kandungan fenolik total, menunjukkan nilai prediksi respons pada titik pusat desain (*center point*), sehingga merepresentasikan rata-rata respons dasar pada kondisi percobaan. Hal ini sejalan dengan penelitian oleh Nurcholis *et al.* (2023) yang menjelaskan bahwa intersep dalam model polinomial orde dua pada RSM menggambarkan nilai respons ketika seluruh variabel berada pada level tengah desain (*coded value* = 0), sehingga berfungsi sebagai dasar prediksi model sebelum pengaruh faktor perlakuan dianalisis lebih lanjut⁴⁵.

Koefisien linier (A, B, C) menunjukkan pengaruh masing-masing variabel terhadap respons. Koefisien linier A dan B yang bernilai positif menunjukkan bahwa peningkatan suhu dan waktu cenderung meningkatkan respons hingga batas tertentu, sedangkan koefisien negatif pada C menunjukkan bahwa peningkatan rasio sampel terhadap pelarut yang terlalu tinggi dapat menurunkan respons. Menurut Bezerra *et al.* (2008), tanda koefisien pada model kuadratik RSM menunjukkan arah pengaruh variabel terhadap respons, di mana koefisien

positif mengindikasikan peningkatan respons, sedangkan koefisien negatif menunjukkan penurunan respons³⁵.

Selain itu, adanya interaksi antarvariabel (AB, AC, dan BC) mengindikasikan bahwa kombinasi suhu, waktu, dan rasio sampel terhadap pelarut saling memengaruhi dalam menentukan respons, sehingga pengaruh suatu variabel dapat berubah tergantung pada kondisi variabel lainnya. Sementara itu, bentuk kuadrat (A^2 , B^2 , dan C^2) menunjukkan adanya hubungan non-linear, di mana peningkatan variabel hingga titik tertentu akan meningkatkan respons, tetapi setelah melewati kondisi optimum respons cenderung menurun. Model polinomial orde dua yang dihasilkan melalui pendekatan RSM telah banyak digunakan dalam optimasi proses ekstraksi senyawa bioaktif, karena mampu menggambarkan hubungan kompleks antara variabel proses dan respons secara menyeluruh, termasuk adanya interaksi antarvariabel serta hubungan non-linear. Hal ini sejalan dengan Myers *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa bentuk kuadrat pada model polinomial orde dua digunakan untuk menunjukkan kelengkungan permukaan respons serta mengidentifikasi titik optimum, sehingga koefisien kuadrat bernilai negatif mengindikasikan adanya kecenderungan respons mencapai kondisi optimum maksimum pada rentang percobaan tertentu³⁶.

Untuk mengevaluasi signifikansi model yang dihasilkan serta mengetahui pengaruh masing-masing variabel independen terhadap respons, dilakukan analisis varians (ANOVA) pada model kuadrat yang diperoleh dari pendekatan RSM. Analisis ini bertujuan untuk menguji kelayakan model secara statistik, baik secara keseluruhan maupun pada setiap pengaruh yang terlibat, meliputi pengaruh linear, interaksi antarvariabel, serta kuadrat. Selain itu, ANOVA juga digunakan untuk menilai kesesuaian model terhadap data eksperimen melalui uji *lack of fit*, sehingga dapat dipastikan bahwa model yang dihasilkan mampu merepresentasikan kondisi proses secara akurat dalam rentang kondisi yang diteliti.



Tabel 4.2 Hasil ANOVA model kuadratik untuk kapasitas antioksidan dari daun sirsak

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	16,57	9	1,84	22,19	< 0,0001	<i>significant</i>
A-Suhu	7,10	1	7,10	85,56	< 0,0001	
B-Waktu	0,4435	1	0,4435	5,35	0,0434	
C-Rasio	1,57	1	1,57	18,98	0,0014	
AB	0,2444	1	0,2444	2,95	0,1169	
AC	0,0004	1	0,0004	0,0052	0,9438	
BC	0,0478	1	0,0487	0,5759	0,4654	
A ²	4,58	1	4,58	55,25	< 0,0001	
B ²	2,13	1	2,13	25,67	0,0005	
C ²	1,65	1	1,65	19,86	0,0012	
Residual	0,8297	10	0,0830			
<i>Lack of Fit</i>	0,6280	5	0,1256	3,11	0,1191	<i>not significant</i>
<i>Pure Error</i>	0,2017	5	0,0403			
Cor Total	17,40	19				
R ² = 0,9523 Adjusted R ² = 0,9094 CV % = 4,10						

Tabel 4.3 Hasil ANOVA model kuadratik untuk ekstraksi kandungan fenolik total dari daun sirsak

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	21,21	9	2,36	19,14	< 0,0001	<i>significant</i>
A-Suhu	8,91	1	8,91	72,39	< 0,0001	
B-Waktu	0,5749	1	0,5749	4,67	0,0560	
C-Rasio	2,12	1	2,12	17,23	0,0020	
AB	0,3097	1	0,3097	2,52	0,1437	
AC	0,0032	1	0,0032	0,0263	0,8745	
BC	0,0796	1	0,0796	0,6470	0,4399	
A ²	5,92	1	5,92	48,08	< 0,0001	
B ²	2,79	1	2,79	22,66	0,0008	
C ²	2,04	1	2,04	16,54	0,0023	
Residual	1,23	10	0,1231			
<i>Lack of Fit</i>	0,7583	5	0,1517	1,61	0,3081	<i>not significant</i>
<i>Pure Error</i>	0,4724	5	0,0945			
Cor Total	22,44	19				
R ² = 0,9451 Adjusted R ² = 0,8958 CV % = 4,49						

Berdasarkan hasil ANOVA pada Tabel 4.2 dan Tabel 4.3, model kuadratik untuk respons kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total menunjukkan nilai *p-value* < 0,0001. Nilai ini mengindikasikan bahwa model yang diperoleh signifikan secara statistik, sehingga variasi respons tidak terjadi secara kebetulan, melainkan dipengaruhi secara nyata oleh variabel proses yang diteliti, yaitu suhu, waktu, dan rasio pelarut. Dengan demikian,

perubahan pada faktor-faktor tersebut memberikan pengaruh yang signifikan terhadap respon ekstraksi, baik dalam meningkatkan maupun menurunkan kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total. Selain itu, hasil uji *lack of fit* menunjukkan nilai *p-value* > 0,05, yang mengindikasikan bahwa *lack of fit* tidak signifikan. Hal ini berarti tidak terdapat perbedaan nyata antara nilai prediksi model dengan data eksperimen, sehingga model kuadratik yang diperoleh memiliki kesesuaian yang baik terhadap data aktual. Dengan kata lain, model yang dihasilkan mampu menggambarkan pola hubungan antara variabel proses dan respons secara memadai dalam rentang kondisi penelitian, sehingga dapat digunakan untuk analisis dan prediksi optimasi proses ekstraksi.

Secara teoritis, Myers *et al.* (2016) dalam *Response Surface Methodology* menjelaskan bahwa evaluasi model dilakukan melalui analisis signifikansi model menggunakan ANOVA untuk menilai pengaruh variabel-variabel terhadap respons, serta uji *lack of fit* untuk mengevaluasi kecukupan model terhadap data eksperimen melalui perbandingan galat murni dan galat ketidaksesuaian model. Dengan demikian, model yang menunjukkan signifikansi statistik dan *lack of fit* yang tidak signifikan dapat dianggap memadai dalam menjelaskan hubungan antara variabel proses dan respons, sehingga layak digunakan untuk prediksi dan optimasi³⁶.

Nilai koefisien determinasi (R^2) pada model kuadratik untuk kedua respons menunjukkan tingkat kecocokan model yang sangat baik. Pada respons kapasitas antioksidan, nilai R^2 sebesar 0,9523 menunjukkan bahwa 95,23% variasi respons dapat dijelaskan oleh model, sedangkan sisanya sebesar 4,77% dipengaruhi oleh faktor lain di luar model atau galat eksperimen. Sementara itu, nilai R^2 sebesar 0,9451 pada kandungan fenolik total menunjukkan bahwa model mampu menjelaskan 94,51% variasi respons. Menurut Myers *et al.* (2016), koefisien determinasi digunakan untuk menunjukkan besarnya variasi respons yang dapat dijelaskan oleh model regresi, sehingga nilai R^2 yang mendekati 1 mengindikasikan bahwa model memiliki kemampuan yang tinggi dalam menjelaskan hubungan antara variabel independen dan respons. Dengan demikian, nilai R^2 pada penelitian ini menunjukkan bahwa model kuadratik yang diperoleh mampu menggambarkan hubungan antara suhu, waktu, dan rasio pelarut dengan kapasitas antioksidan maupun kandungan fenolik total secara baik dalam rentang kondisi yang diteliti³⁶.

Nilai *Adjusted R²* pada kedua respons, yaitu 0,9094 untuk kapasitas antioksidan dan 0,8958 untuk kandungan fenolik total, menunjukkan hasil yang tidak berbeda jauh dari nilai R^2 masing-masing. Menurut Myers *et al.* (2016), *Adjusted R²* digunakan untuk menilai kecocokan model dengan menyesuaikan nilai R^2 terhadap jumlah variabel dalam model. Oleh karena itu, nilai *Adjusted R²* yang tetap tinggi dan mendekati R^2 menunjukkan bahwa model masih mampu menjelaskan sebagian besar variasi respons setelah penyesuaian dilakukan. Hal ini menunjukkan bahwa model yang diperoleh memiliki kecocokan yang baik terhadap data, sehingga persamaan yang dihasilkan cukup andal untuk menggambarkan hubungan antara

variabel proses dan respons serta dapat digunakan untuk tujuan prediksi dan optimasi³⁶.

Selain itu, nilai koefisien variasi (CV) yang rendah, yaitu sebesar 4,10% pada kapasitas antioksidan dan 4,49% pada kandungan fenolik total, menunjukkan bahwa data eksperimen memiliki tingkat presisi yang baik. Nilai CV yang rendah mengindikasikan bahwa variasi antarulangan relatif kecil, sehingga metode eksperimen yang digunakan mampu menghasilkan data yang konsisten pada kondisi yang sama. Hal ini sejalan dengan Younis *et al.* (2022), yang melaporkan bahwa model RSM dengan nilai CV di bawah 10% menunjukkan tingkat presisi yang baik dan hasil yang konsisten. Nilai CV yang diperoleh pada penelitian ini berada jauh di bawah batas tersebut, sehingga menunjukkan bahwa data yang dihasilkan memiliki tingkat kepercayaan yang tinggi. Oleh karena itu, berdasarkan keseluruhan parameter statistik yang diperoleh, model kuadratik pada penelitian ini dapat dinyatakan valid dan layak digunakan untuk analisis, prediksi, serta optimasi proses ekstraksi daun sirsak⁴⁶.

Selain menunjukkan bahwa model kuadratik yang diperoleh valid, hasil ANOVA juga memperlihatkan bahwa masing-masing variabel proses memberikan pengaruh yang berbeda terhadap respons ekstraksi. Berdasarkan nilai *p-value*, suhu (A) merupakan faktor yang berpengaruh sangat signifikan ($p\text{-value} < 0,0001$) terhadap kapasitas antioksidan maupun kandungan fenolik total, yang menunjukkan bahwa perubahan suhu memberikan pengaruh nyata terhadap efisiensi ekstraksi daun sirsak. Rasio sampel terhadap pelarut (C) juga berpengaruh signifikan pada kedua respons ($p\text{-value} < 0,05$), sehingga kedua variabel ini menjadi faktor utama yang menentukan proses ekstraksi. Peningkatan suhu dapat membantu mempercepat pelepasan senyawa bioaktif melalui peningkatan kelarutan dan difusi, sedangkan rasio pelarut yang lebih tinggi meningkatkan efektivitas pelarutan senyawa target. Sementara itu, waktu ekstraksi (B) hanya signifikan terhadap kapasitas antioksidan ($p\text{-value} = 0,0434$), tetapi tidak signifikan terhadap kandungan fenolik total ($p\text{-value} = 0,0560$), yang menunjukkan bahwa durasi ekstraksi lebih memengaruhi kapasitas antioksidan dibandingkan kandungan fenolik total. Hasil ini sejalan dengan penelitian Yefrida *et al.* (2026) pada daun *Moringa oleifera*, yang melaporkan bahwa suhu dan rasio sampel terhadap pelarut merupakan faktor utama dalam optimasi ekstraksi antioksidan, sedangkan waktu ekstraksi menunjukkan pengaruh yang relatif kecil³⁴.

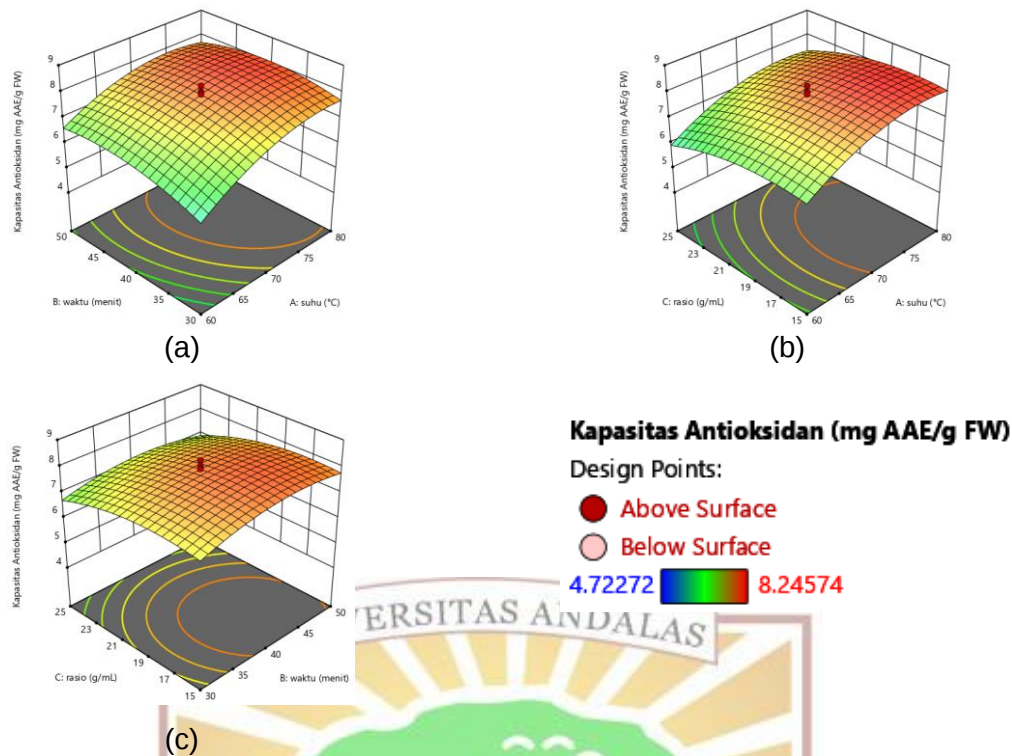
Interaksi antarvariabel pada kedua respons menunjukkan nilai $p\text{-value} > 0,05$, sehingga kombinasi antara suhu dan waktu (AB), suhu dan rasio sampel terhadap pelarut (AC), maupun waktu dan rasio sampel terhadap pelarut (BC) tidak berpengaruh signifikan terhadap kapasitas antioksidan maupun kandungan fenolik total. Hal ini menunjukkan bahwa pengaruh masing-masing variabel terhadap respons ekstraksi cenderung bekerja secara independen, sehingga kombinasi perubahan antarvariabel tidak memberikan pengaruh gabungan yang signifikan. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa optimasi proses lebih banyak ditentukan oleh pengaruh masing-masing variabel dibandingkan efek interaksi antarvariabel. Hal ini juga sejalan dengan penelitian yang dilaporkan oleh Yefrida *et al.* (2026) pada ekstraksi

antioksidan daun *Moringa oleifera*, di mana hanya interaksi antara suhu dan rasio sampel terhadap pelarut (AC) yang berpengaruh signifikan ($p\text{-value} = 0,04$), sedangkan interaksi suhu dan waktu (AB) serta waktu dan rasio pelarut (BC) tidak signifikan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak semua kombinasi antarvariabel memberikan pengaruh nyata terhadap respons ekstraksi³⁴.

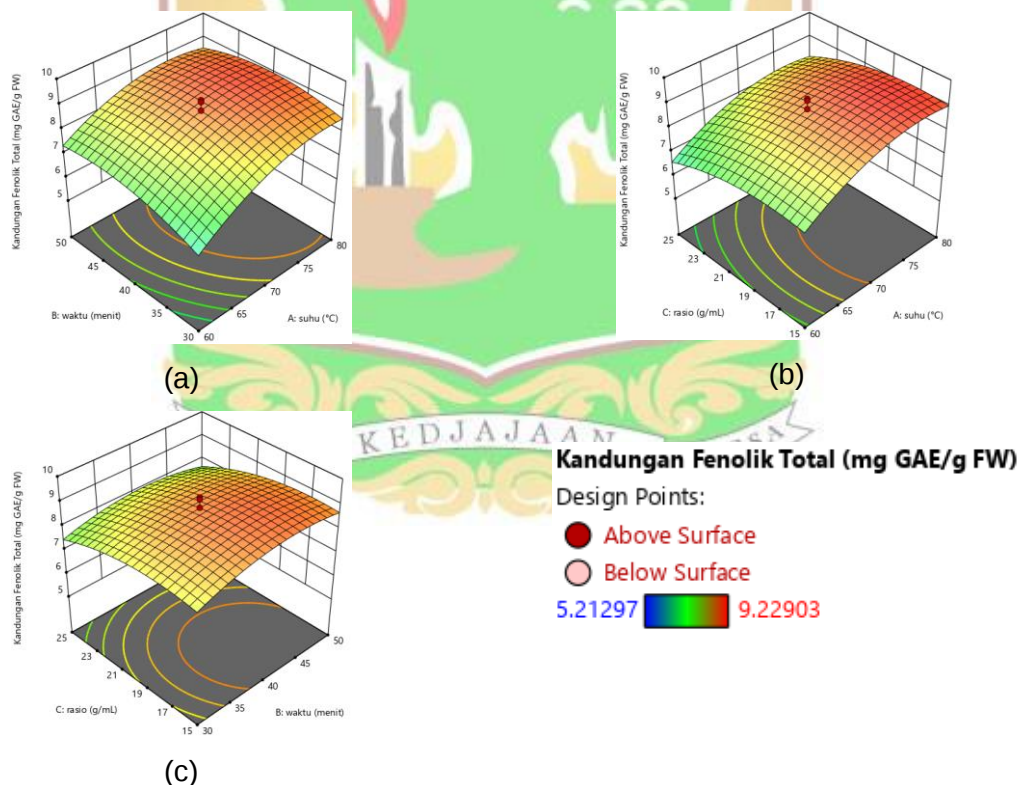
Berbeda dengan faktor interaksi, seluruh faktor kuadratik (A^2 , B^2 , dan C^2) pada kedua reapons menunjukkan pengaruh yang signifikan ($p\text{-value} < 0,05$), yang menandakan adanya hubungan non-linear antara variabel proses dan respons. Keberadaan faktor kuadratik yang signifikan ini menunjukkan bahwa peningkatan suhu, waktu, maupun rasio sampel terhadap pelarut tidak selalu meningkatkan respons secara berkelanjutan, melainkan hanya sampai pada kondisi optimum tertentu sebelum mengalami penurunan. Hal tersebut menunjukkan bahwa setiap variabel memiliki batas optimum, di mana peningkatan variabel pada awalnya mampu meningkatkan ekstraksi senyawa antioksidan dan fenolik, tetapi kondisi yang terlalu tinggi dapat menurunkan respons. Hal ini sejalan dengan Che Sulaiman *et al.* (2017), yang melaporkan bahwa faktor kuadratik suhu, waktu, dan rasio pelarut berperan penting dalam membentuk respons non-linear pada ekstraksi senyawa fenolik. Dengan demikian, signifikansi faktor kuadratik pada penelitian ini memperkuat bahwa proses ekstraksi daun sirsak memiliki titik optimum yang jelas, sehingga pendekatan RSM kuadratik sesuai digunakan untuk menentukan kondisi ekstraksi terbaik⁴⁷.

Dalam metode RSM, grafik permukaan respons tiga dimensi (3D) digunakan untuk memvisualisasikan hubungan antara variabel independen dan respons yang diamati. Pada grafik ini, dua variabel independen ditampilkan pada sumbu horizontal, sedangkan respons ditunjukkan pada sumbu vertikal dengan variabel lain dijaga konstan. Melalui visualisasi tersebut, perubahan respons akibat kombinasi variabel dapat diamati dengan lebih jelas, termasuk daerah optimum yang ditunjukkan oleh puncak maupun lembah pada permukaan grafik. Hal ini sejalan dengan Cano-Lamadrid *et al.* (2023) yang menyatakan bahwa *surface response* plot berperan penting dalam membantu interpretasi hubungan antarvariabel serta penentuan kondisi optimum pada proses optimasi menggunakan RSM⁴⁸.

Gradasi warna pada grafik permukaan respons 3D digunakan untuk memperjelas distribusi nilai respons pada setiap kombinasi variabel proses. Perbedaan intensitas warna menunjukkan perbedaan besar respons yang dihasilkan, sehingga daerah dengan respons tinggi maupun rendah dapat diidentifikasi dengan lebih mudah tanpa harus melihat nilai numerik secara langsung. Melalui visualisasi ini, pola perubahan respons serta daerah optimum pada permukaan grafik dapat diamati secara lebih jelas. Ponphaiboon *et al.* (2023) juga menjelaskan bahwa variasi warna pada contour plot dan grafik permukaan respons membantu menunjukkan distribusi nilai respons serta mempermudah interpretasi area dengan respons minimum maupun maksimum dalam proses optimasi menggunakan RSM⁴⁹.



Gambar 4.5 Grafik permukaan 3D interaksi antar variabel terhadap kapasitas antioksidan (a) pengaruh suhu dan waktu, (b) pengaruh suhu dan rasio s/p, (c) pengaruh waktu dan rasio s/p.



Gambar 4.6 Grafik permukaan 3D interaksi antar variabel terhadap kandungan fenolik total (a) pengaruh suhu dan waktu, (b) pengaruh suhu dan rasio s/p, (c) pengaruh waktu dan rasio s/p.

Grafik permukaan respon 3D yang menggambarkan hubungan antara suhu dan waktu ekstraksi disajikan pada Gambar 4.5(a) untuk kapasitas antioksidan dan Gambar 4.6(a) untuk kandungan fenolik total. Kedua grafik menunjukkan permukaan respon yang melengkung dengan nilai respons maksimum berada pada area tengah ruang desain, yaitu pada kisaran

suhu 70–76 °C dan waktu 40–45 menit. Bentuk permukaan tersebut menunjukkan bahwa peningkatan suhu dan waktu ekstraksi meningkatkan respons hingga mencapai kondisi optimum, kemudian respons cenderung menurun setelah melewati daerah optimum. Karakteristik ini menunjukkan adanya pengaruh kuadratik dari variabel proses terhadap respons, sehingga kondisi optimum berada pada titik puncak permukaan respon, sesuai dengan karakteristik model kuadratik pada RSM³⁵.

Peningkatan suhu dari 60 °C menuju kisaran optimum menyebabkan kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa kenaikan suhu mampu meningkatkan kelarutan senyawa fenolik dan mempercepat difusi senyawa bioaktif dari matriks tanaman ke dalam pelarut, sehingga jumlah senyawa yang terekstrak menjadi lebih tinggi. Namun, pada suhu mendekati 80 °C respons mulai menurun, yang mengindikasikan terjadinya degradasi atau oksidasi senyawa bioaktif akibat paparan panas berlebih. Sementara itu, peningkatan waktu ekstraksi hingga kisaran optimum juga meningkatkan respons, tetapi pada waktu yang lebih lama peningkatannya tidak lagi signifikan dan cenderung menurun. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa bioaktif telah terekstraksi pada waktu tertentu, sehingga penambahan waktu ekstraksi tidak lagi efektif dan bahkan dapat memicu degradasi senyawa aktif.

Hal ini sejalan dengan penelitian Yuliantari *et al.* (2016) pada ekstraksi daun sirih menggunakan metode ultrasonik, yang melaporkan bahwa peningkatan suhu dari 35 °C menjadi 45 °C meningkatkan kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak. Kondisi optimum diperoleh pada suhu 45 °C dan waktu ekstraksi 20 menit dengan kandungan flavonoid total sebesar 903,90 mg QE/g serta nilai IC₅₀ terendah yaitu 258,155 mg/L. Namun, pada suhu 55 °C dan waktu ekstraksi yang lebih lama, respons mengalami penurunan akibat menurunnya stabilitas senyawa bioaktif selama proses ekstraksi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa suhu dan waktu ekstraksi memiliki hubungan non-linear terhadap respons, sehingga diperlukan kondisi optimum untuk memperoleh ekstrak dengan kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik yang maksimal⁵⁰.

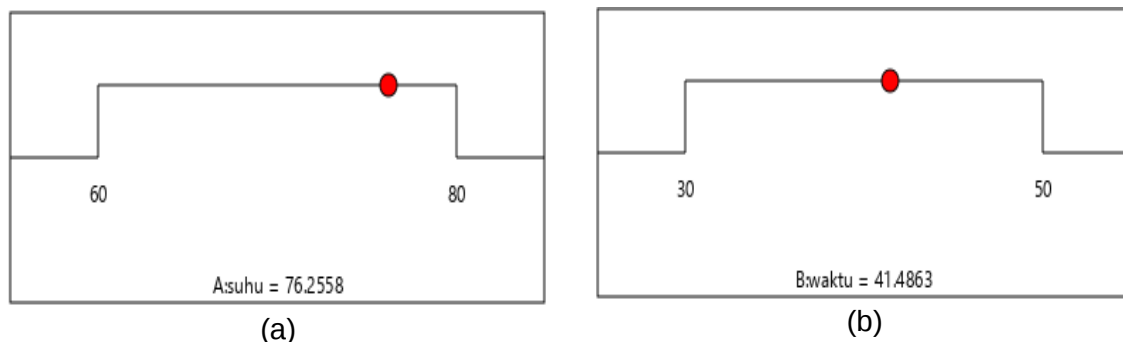
Gambar 4.5(b) dan Gambar 4.6(b) menunjukkan hubungan antara suhu dan rasio sampel terhadap pelarut terhadap kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total. Permukaan respon pada kedua grafik tampak melengkung dengan puncak yang berada pada kisaran suhu 70–76 °C dan rasio pelarut mendekati 1:17. Bentuk permukaan tersebut menunjukkan bahwa peningkatan suhu dan rasio pelarut mula-mula meningkatkan respons hingga mencapai kondisi optimum, kemudian respons cenderung melandai dan menurun setelah melewati daerah optimum. Karakteristik ini menunjukkan adanya pengaruh kuadratik dari kedua variabel terhadap respons, sehingga kondisi optimum berada pada daerah tengah ruang desain³⁵.

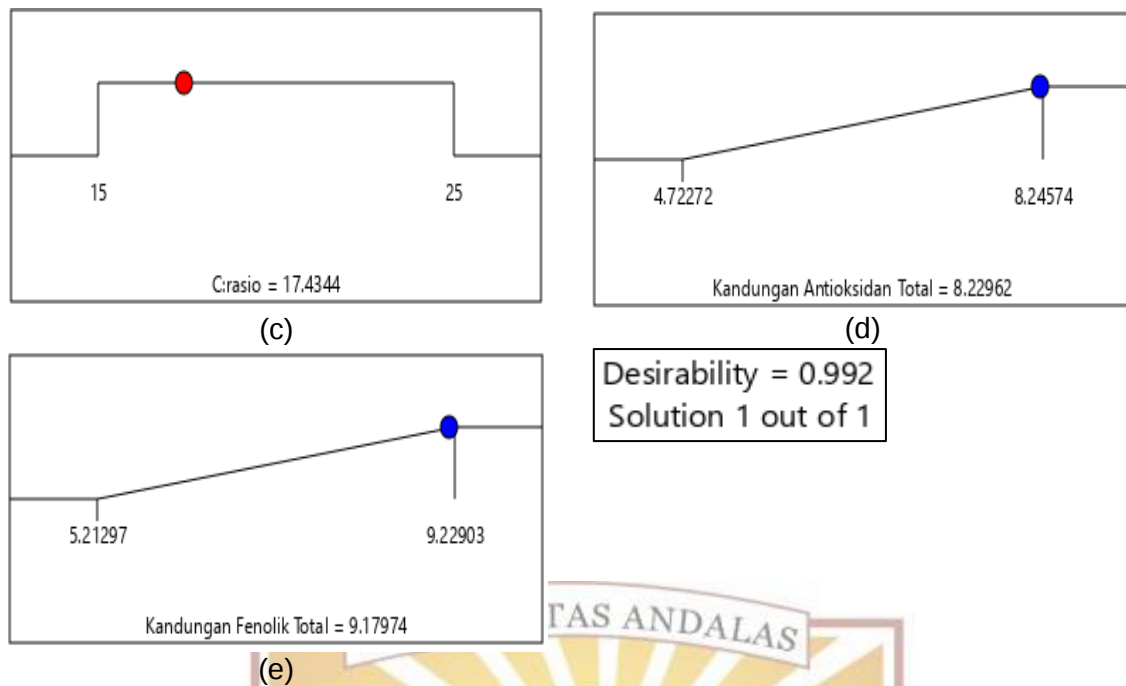
Peningkatan suhu hingga kisaran optimum meningkatkan pelepasan senyawa bioaktif dari matriks daun, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi respons menurun akibat

kemungkinan degradasi senyawa bioaktif. Sementara itu, peningkatan rasio pelarut yang terlalu besar cenderung menurunkan respons akibat efek pengenceran, di mana senyawa bioaktif yang telah larut tersebar dalam volume pelarut yang lebih besar sehingga konsentrasi senyawa dalam ekstrak menjadi lebih rendah. Hal ini sejalan dengan penelitian Yefrida *et al.* (2026) pada optimasi ekstraksi antioksidan daun kelor menggunakan RSM–CCD. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa peningkatan suhu ekstraksi dan rasio sampel terhadap pelarut meningkatkan kapasitas antioksidan hingga mencapai kondisi optimum, namun pada rasio pelarut yang lebih tinggi respons mulai menurun akibat efek pengenceran. Kondisi optimum diperoleh pada suhu 80 °C, waktu ekstraksi 10 menit, dan rasio sampel terhadap pelarut 1:25 dengan kapasitas antioksidan sebesar 9,49 mg AAE/g FW³⁴.

Gambar 4.5(c) dan Gambar 4.6(c) menunjukkan hubungan antara waktu ekstraksi dan rasio sampel terhadap pelarut terhadap kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total. Permukaan respon pada kedua grafik tampak melengkung dengan puncak yang berada pada kisaran waktu ekstraksi 40–45 menit dan rasio sampel terhadap pelarut sekitar 1:17–1:20. Bentuk permukaan tersebut menunjukkan bahwa peningkatan waktu ekstraksi dan rasio pelarut mula-mula meningkatkan respons hingga mencapai kondisi optimum, kemudian respons cenderung melandai dan menurun setelah melewati daerah optimum. Karakteristik ini menunjukkan adanya pengaruh kuadratik dari kedua variabel terhadap respons, sehingga kondisi optimum berada pada daerah tengah ruang desain³⁵.

Peningkatan waktu ekstraksi hingga kisaran optimum meningkatkan respons karena proses difusi senyawa bioaktif ke dalam pelarut berlangsung lebih maksimal. Namun, pada waktu yang terlalu lama respons mulai menurun akibat degradasi atau oksidasi senyawa antioksidan dan fenolik. Sementara itu, rasio pelarut yang terlalu besar juga menyebabkan respons menurun akibat efek pengenceran, di mana senyawa bioaktif yang telah larut tersebar dalam volume pelarut yang lebih besar sehingga konsentrasi ekstrak menjadi lebih rendah. Hal ini sejalan dengan penelitian Handayani *et al.* (2015) pada ekstraksi daun sirih menggunakan metode *ultrasonic bath*, yang melaporkan bahwa rasio bahan terhadap pelarut berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan dan kandungan fenolik ekstrak. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa kondisi terbaik diperoleh pada rasio 1:10 dan waktu ekstraksi 20 menit, dengan kandungan total fenol sebesar 15213,33 ppm, aktivitas antioksidan 78,14% dan nilai IC₅₀ 15,58 ppm⁵¹.





Gambar 4.7 Kondisi optimum ekstraksi (a) suhu, (b) waktu, (c) rasio sampel terhadap pelarut, (d) kapasitas antioksidan (e) kandungan fenolik total

Optimasi kondisi ekstraksi dilakukan menggunakan metode RSM untuk memperoleh kombinasi variabel yang menghasilkan respons optimum. Berdasarkan hasil optimasi, kondisi optimum diperoleh pada suhu 76°C , waktu ekstraksi 41 menit, dan rasio sampel terhadap pelarut 1:17. Visualisasi hasil optimasi menggunakan pendekatan fungsi desirabilitas ditunjukkan pada Gambar 4.7 dengan nilai desirabilitas sebesar 0,992. Nilai desirabilitas yang mendekati 1 menunjukkan bahwa kondisi tersebut mampu menghasilkan respons yang sangat mendekati target optimum yang diinginkan. Bezerra *et al.* (2008) menyatakan bahwa fungsi desirabilitas dalam RSM digunakan untuk mengoptimasi beberapa respons secara simultan sehingga kondisi optimum dapat ditentukan berdasarkan kombinasi variabel yang memberikan respons terbaik³⁵.

Sebagai tahap validasi, ekstraksi dilakukan kembali menggunakan kondisi optimum hasil prediksi model. Berdasarkan hasil prediksi pada Gambar 4.7, kondisi optimum tersebut diperkirakan menghasilkan kapasitas antioksidan sebesar 8,2296 mg AAE/g FW dan kandungan fenolik total sebesar 9,1797 mg GAE/g FW. Sementara itu, hasil aktual menunjukkan kapasitas antioksidan sebesar $8,1831 \pm 0,05$ mg AAE/g FW dan kandungan fenolik total sebesar $9,0042 \pm 0,08$ mg GAE/g FW. Perhitungan nilai aktual pada kondisi optimum tersebut disajikan pada Lampiran 11. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Setyani *et al.* (2023) pada optimasi ekstraksi daun kelor menggunakan RSM, yang menunjukkan bahwa nilai hasil aktual memiliki kesesuaian yang baik dengan hasil prediksi model. Pada penelitian tersebut, nilai prediksi kandungan fenolik total sebesar 97,16 mg GAE/g ekstrak dan hasil aktual sebesar 97,26 mg GAE/g ekstrak. Kedekatan nilai prediksi dan aktual tersebut menunjukkan bahwa model RSM memiliki validitas dan kemampuan prediksi yang baik dalam menentukan kondisi optimum ekstraksi⁵².

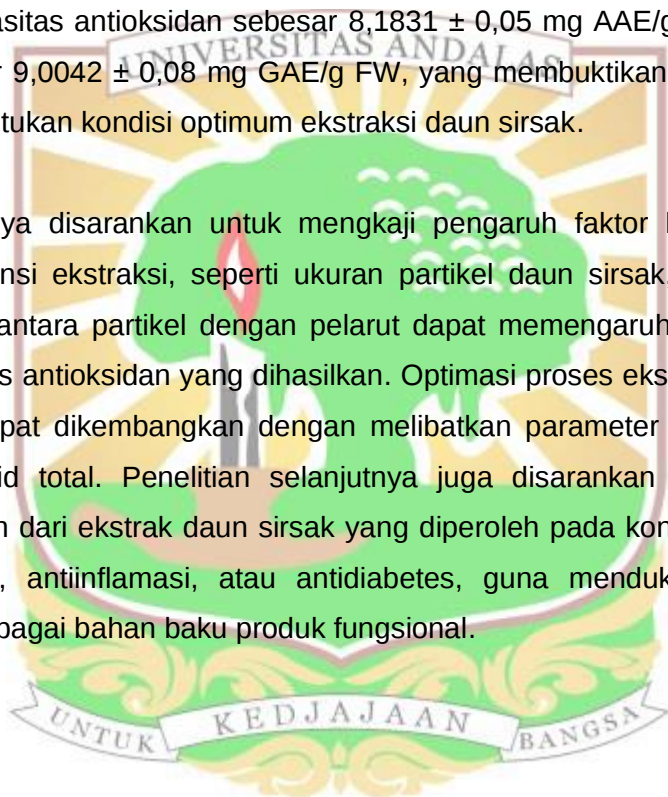
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, kondisi optimum ekstraksi daun sirsak (*Annona muricata* L.) menggunakan metode dekoksi yang ditentukan melalui metode OFAT adalah suhu 70 °C, waktu ekstraksi 40 menit, dan rasio sampel terhadap pelarut 1:20 g/mL. Kondisi tersebut selanjutnya digunakan sebagai titik tengah (*center point*) dalam optimasi menggunakan metode RSM. Hasil optimasi menggunakan metode RSM dengan desain CCD menghasilkan kondisi optimum pada suhu 76 °C, waktu ekstraksi 41 menit, dan rasio sampel terhadap pelarut 1:17 g/mL, dengan nilai prediksi kapasitas antioksidan sebesar 8,2296 mg AAE/g FW dan kandungan fenolik total sebesar 9,1797 mg GAE/g FW. Validasi secara eksperimental pada kondisi optimum hasil optimasi tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki kapasitas antioksidan sebesar $8,1831 \pm 0,05$ mg AAE/g FW dan kandungan fenolik total sebesar $9,0042 \pm 0,08$ mg GAE/g FW, yang membuktikan bahwa metode RSM efektif dalam menentukan kondisi optimum ekstraksi daun sirsak.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya disarankan untuk mengkaji pengaruh faktor lain yang berpotensi memengaruhi efisiensi ekstraksi, seperti ukuran partikel daun sirsak, karena variasi luas permukaan kontak antara partikel dengan pelarut dapat memengaruhi laju difusi senyawa fenolik dan kapasitas antioksidan yang dihasilkan. Optimasi proses ekstraksi pada penelitian mendatang juga dapat dikembangkan dengan melibatkan parameter respons lain, seperti kandungan flavonoid total. Penelitian selanjutnya juga disarankan untuk mengevaluasi aktivitas biologis lain dari ekstrak daun sirsak yang diperoleh pada kondisi optimum, seperti aktivitas antibakteri, antiinflamasi, atau antidiabetes, guna mendukung pengembangan pemanfaatannya sebagai bahan baku produk fungsional.



DAFTAR PUSTAKA

1. Sikder MM, Li X, Akumwami S, Labony SA. Reactive oxygen species: role in pathophysiology, and mechanism of endogenous and dietary antioxidants during oxidative stress. *Chonnam Med J*. 2025;61(1):32.
2. Muharram FR, Multazam CECZ, Mustofa A, et al. The 30 years of shifting in the Indonesian cardiovascular burden-analysis of the global burden of disease study. *J Epidemiol Glob Health*. 2024;14(1):193-212.
3. Ansari WA, Srivastava K, Nasibullah M, Khan MF. Reactive oxygen species (ROS): sources, generation, disease pathophysiology, and antioxidants. Published online 2025.
4. Chibuye B, Singh I Sen, Ramasamy S, Maseka KK. Natural antioxidants: A comprehensive elucidation of their sources, mechanisms, and applications in health. *Next Res*. 2024;1(2):100086.
5. Rudrapal M, Rakshit G, Singh RP, Garse S, Khan J. Dietary Polyphenols: Review on Chemistry/Sources, Bioavailability/Metabolism, Antioxidant Effects, and Their Role in Disease Management. Published online 2024.
6. Zhang Z, Li X, Sang S, et al. Polyphenols as plant-based nutraceuticals: health effects, encapsulation, nano-delivery, and application. *Foods*. 2022;11(15):2189.
7. Zubaidi SN, Nani HM, Saleh M, et al. *Annona muricata*: Comprehensive Review on the Ethnomedicinal, Phytochemistry, and Pharmacological Aspects Focusing on Antidiabetic Properties. Published online 2023.
8. Ilango S, Sahoo DK, Paital B, et al. A Review on *Annona muricata* and Its Anticancer Activity. Published online 2022:1-31.
9. Aguilar-Hernández G, García-Magaña M de L, Vivar-Vera M de los Á, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Annona muricata* by-products and pulp. *Molecules*. 2019;24(5):904.
10. Ibrahim A, Syazlie M, Ibrahim C, et al. Effects of *Annona muricata* extraction on inhibition of polyphenoloxidase and microbiology quality of *Macrobrachium rosenbergii*. *J Food Sci Technol*. 2022;59(3):859-868. doi:10.1007/s13197-021-05081-w
11. Hartati R, Rompis FM, Pramastya H, Fidrianny I. Optimization of antioxidant activity of soursop (*Annona muricata* L.) leaf extract using response surface methodology. Published online 2024:1-13. doi:10.3892/br.2024.1854
12. Mahesh JS, Selvakumarsamy S. Optimization of drying and extraction techniques for antioxidants and acetogenins In *Annona muricata* leaves using response surface methodology. *Food Humanit*. 2024;3:100447.
13. Karabegović I, Stojanović SS, Mančić S, Đorđević N, Malićanin M, Danilović B. Optimization of food-grade bioactive compound extraction from plant sources by response surface methodology approach: A comprehensive review. *MASO Int FOOD Sci Technol*. 2024;13(1):31-47.
14. Fatmawati S, Anggraini Putri D, Malina Annur R, Hidayat F. *Bioaktivitas Dan Konstituen Kimia Tanaman Obat Indonesia*. CV BUDI UTAM; 2019.
15. Nurkhasanah MA, Si A, Mochammad S, et al. *Antioksidan Dan Stres Oksidatif*.; 2023.
16. Shahabi Mohammadabadi S, Goli M, Naji Tabasi S. Optimization of Bioactive Compound Extraction from Eggplant Peel by Response Surface Methodology: Ultrasound-Assisted Solvent Qualitative and Quantitative Effect. *Foods*. 2022;11(20). doi:10.3390/foods11203263
17. Nolasco-González Y, Chacón-López MA, Ortiz-Basurto RI, et al. *Annona muricata* Leaves as a Source of Bioactive Compounds: Extraction and Quantification Using Ultrasound. *Horticulturae*. 2022;8(7):1-17. doi:10.3390/horticulturae8070560
18. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K. *Reactive Oxygen Species , Toxicity , Oxidative Stress , and Antioxidants : Chronic Diseases and Aging*. Vol 97. Springer Berlin Heidelberg; 2023. doi:10.1007/s00204-023-03562-9

19. Rahaman M, Hossain R, Torequl M, et al. Natural antioxidants from some fruits, seeds, foods, natural products, and associated health benefits: An update. 2023;(December 2022):1657-1670. doi:10.1002/fsn3.3217
20. Zhang Y, Cai P, Cheng G. A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. Published online 2022. doi:10.1177/1934578X211069721
21. Pérez M, Dominguez-López I, Lamuela-Raventós RM. The chemistry behind the folin-ciocalteu method for the estimation of (poly) phenol content in food: Total phenolic intake in a mediterranean dietary pattern. *J Agric Food Chem*. 2023;71(46):17543-17553.
22. Wianowska D, Olszowy-Tomczyk M. A concise profile of gallic acid-From its natural sources through biological properties and chemical methods of determination. *Molecules*. 2023;28(3):1186.
23. Yefrida, Suyani H, Aziz H, Efdi M. Comparison of iron reduction methods on the determination of antioxidants content in vegetables sample. *Orient J Chem*. 2018;34(5):2418-2424. doi:10.13005/ojc/340525
24. Gulcin İ, Alwasel SH. DPPH radical scavenging assay. *Processes*. 2023;11(8):2248.
25. Irianti T, Mada UG, Ugm S, et al. Antioksidan. 2017;(October).
26. Njus D, Kelley PM, Tu YJ, Schlegel HB. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*. 2020;159:37-43.
27. Muliasari H, Hanifa NI, Hajrin W, Andanalusia M, Hidayati AR. Determination of Antioxidants by DPPH Scavenging Activity of Ashitaba Herb (*Angelica keiskei*) Methanol Extract. *J Biol Trop*. 2023;23(4):482-490.
28. Castillo-Correa M, Montalbán-Hernández C, Navarro-Hortal MD, et al. Exploring the Influence of Extraction Methods, Solvents, and Temperature on Total Phenolic Recovery and Antioxidant Capacity in Olive Leaf Extracts: A Systematic Review with Quantitative Synthesis. *Separations*. 2025;12(9). doi:10.3390/separations12090236
29. Travis CR, McMaster J, Rivas F. Advances in Natural Product Extraction: Established and Emerging Technologies. *Molecules*. 2026;31(7):1136.
30. Nurcholis W, Alfadzrin R, Izzati N, et al. Effects of Methods and Durations of Extraction on Total Flavonoid and Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Java Cardamom (*Amomum compactum* Soland Ex Maton) Fruit. *Plants*. 2022;11(17):1-13. doi:10.3390/plants11172221
31. Siddiqui SA, Ali Redha A, Salauddin M, Harahap IA, Rupasinghe HPV. Factors Affecting the Extraction of (Poly)Phenols from Natural Resources Using Deep Eutectic Solvents Combined with Ultrasound-Assisted Extraction. *Crit Rev Anal Chem*. 2025;55(1):139-160. doi:10.1080/10408347.2023.2266846
32. Beg S, Swain S, Rahman M, Hasnain MS, Imam SS. *Application of Design of Experiments (DoE) in Pharmaceutical Product and Process Optimization*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/B978-0-12-815799-2.00003-4
33. Daffa'Aththobarani M, Priyanto AD, Putra AYT, et al. Optimization Approach of Microwave Assisted Extraction Anthocyanins Pigments Butterfly Pea Flowoers (*Clitoria Ternatea* L.) Using OFAT (One-Factor-At-a-Time) Method. *AGRITEPA J Ilmu dan Teknol Pertan*. 2025;12(1):31-44.
34. Yefrida Y, Hayana H. Optimization of Antioxidant Extraction from *Moringa oleifera* Leaves Using an Integrated OFAT and RSM-CCD Approach. 2026;9(7):1283-1296.
35. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 2008;76(5):965-977. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019
36. Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. John Wiley & Sons; 2016.

37. Li W, Zhao L chun, Wang Z, Zheng Y nan, Liang J, Wang H. Response Surface Methodology to Optimize Enzymatic Preparation of Deapio-Platycodin D and Platycodin D from Radix Platycodi. Published online 2012:4089-4100. doi:10.3390/ijms13044089
38. Bhattacharya S. Central Composite Design for Response Surface Methodology and Its Application in Pharmacy. *Response Surf Methodol Eng Sci*. Published online 2021. doi:10.5772/intechopen.95835
39. Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. 2009;877:2224-2234. doi:10.1016/j.jchromb.2008.09.030
40. Zenkevich IG, Nikitina DA, Kushakova AS. Processing and Interpretation of Analytical Data with a High Degree of Uncertainty. 2022;77(11):1399-1412. doi:10.1134/S1061934822090143
41. Markhali FS, Teixeira JA. clean technologies Effect of Ohmic Heating on the Extraction Yield, Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Olive Mill Leaves. Published online 2022:512-528.
42. Megawati, Fardhyanti DS, Widjanarko D, Hanifah, Bungsu GM, Rizky MHF. Kinetics of soursop leaves antioxidant extraction using microwave-assisted extraction. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Vol 572. IOP Publishing; 2020:12041.
43. Wang Z, Tian Y, Yang M, et al. Extraction of phenolic compounds from Moringa oleifera Lam. leaves with ultrasonic-assisted deep eutectic solvents. *Front Nutr*. 2024;11(August):1-16. doi:10.3389/fnut.2024.1405128
44. Sivaji S, Gunasekaran S, Saengrayap R, et al. Response surface methodology in postharvest and food technology research: A bibliometric assessment. *Appl Food Res*. 2025;5(2). doi:10.1016/j.afres.2025.101461
45. Nurcholis W, Safithri M, Marliani N, Iqbal M. Response surface modeling to optimize sonication extraction with the maceration method for the phenolic content and antioxidant activity of Justicia gendarussa Burm f. *J Appl Pharm Sci*. 2023;13(10):181-187. doi:10.7324/JAPS.2023.143746
46. Younis M, Mohamed Ahmed IA, Ahmed KA, et al. Response surface methodology (RSM) optimization of the physicochemical quality attributes of ultraviolet (UV-C)-treated barhi dates. *Plants*. 2022;11(17):2322.
47. Che Sulaiman IS, Basri M, Fard Masoumi HR, Chee WJ, Ashari SE, Ismail M. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of Clinacanthus nutans Lindau leaves by response surface methodology. *Chem Cent J*. 2017;11(1):54.
48. Cano-Lamadrid M, Martínez-Zamora L, Mozafari L, Bueso MC, Kessler M, Artés-Hernández F. Response Surface Methodology to Optimize the Extraction of Carotenoids from Horticultural By-Products-A Systematic Review. *Foods*. 2023;12(24):1-17. doi:10.3390/foods12244456
49. Ponphaiboon J, Krongrawa W, Aung WW, Chinatangkul N, Limmatvapirat S, Limmatvapirat C. Advances in natural product extraction techniques, electrospun fiber fabrication, and the integration of experimental design: a comprehensive review. *Molecules*. 2023;28(13):5163.
50. Yuliantari NWA, Widarta IWR, Permana I. The Influence of Time and Temperature on Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Sirsak Leaf (Annona muricata L.) Using Ultrasonic. *Media Ilm Teknol Pangan (Scientific J Food)*. Published online 2017.
51. Handayani H, Sriherfyna FH, Yunianta Y. Antioxidant extraction of soursop leaf with ultrasonic bath (Study of material: Solvent ratio and extraction time). *J Pangan Dan Agroindustri*. 2016;4(1):262-272.
52. Setyani W, Murwanti R, Sulaiman TNS, Hertiani T. Application of Response Surface Methodology (RSM) for the optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of Moringa oleifera: Extraction yield, content of bioactive compounds, and biological effects

in vitro. *Plants*. 2023;12(13):2455.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Pembuatan Reagen

1. Pembuatan Reagen Penentuan Kapasitas Antioksidan dengan Metode DPPH

- a. Pembuatan Larutan Induk Asam Askorbat 1000 mg/L

$$\text{mg ditimbang} = \frac{1000 \text{ mg asam askorbat}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 25 \text{ mL} = 25 \text{ mg}$$

- b. Larutan Asam Askorbat 100 mg/L

$$V = \frac{100 \text{ mg/L asam askorbat} \times 25 \text{ mL}}{1000 \text{ mg/L asam askorbat}} = 2,5 \text{ mL}$$

- c. Larutan Standar Asam Askorbat 2 mg/L

$$V = \frac{2 \text{ mg/L asam askorbat} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam askorbat}} = 0,2 \text{ mL}$$

- d. Larutan Standar Asam Askorbat 4 mg/L

$$V = \frac{4 \text{ mg/L asam askorbat} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam askorbat}} = 0,4 \text{ mL}$$

- e. Larutan Standar Asam Askorbat 6 mg/L

$$V = \frac{6 \text{ mg/L asam askorbat} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam askorbat}} = 0,6 \text{ mL}$$

- f. Larutan Standar Asam Askorbat 8 mg/L

$$V = \frac{8 \text{ mg/L asam askorbat} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam askorbat}} = 0,8 \text{ mL}$$

- g. Larutan Standar Asam Askorbat 10 mg/L

$$V = \frac{10 \text{ mg/L asam askorbat} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam askorbat}} = 1 \text{ mL}$$

- h. Larutan Standar Asam Askorbat 12 mg/L

$$V = \frac{12 \text{ mg/L asam askorbat} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam askorbat}} = 1,2 \text{ mL}$$

- i. Larutan Standar Asam Askorbat 14 mg/L

$$V = \frac{14 \text{ mg/L asam askorbat} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam askorbat}} = 1,4 \text{ mL}$$

- j. Penentuan Massa DPPH 0,1 mM

$$\begin{aligned} \text{Massa DPPH} &= \frac{1 \times 10^{-4} \text{ mol DPPH}}{1 \text{ L larutan}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL larutan}} \times \frac{394,33 \text{ g DPPH}}{1 \text{ mol DPPH}} \times 50 \text{ mL} \\ &= 0,0020 \text{ g} \end{aligned}$$

2. Pembuatan Reagen Penentuan Kandungan Fenolik Total (TPC)

- a. Pembuatan Larutan Asam Galat 1000 mg/L

$$\text{mg ditimbang} = \frac{1000 \text{ mg asam galat}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 10 \text{ mL} = 10 \text{ mg}$$

- b. Larutan Asam Galat 100 mg/L

$$V = \frac{100 \text{ mg/L asam galat} \times 25 \text{ mL}}{1000 \text{ mg/L asam galat}} = 2,5 \text{ mL}$$

- c. Larutan Standar Asam Galat 10 mg/L

$$V = \frac{10 \text{ mg/L asam galat} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam galat}} = 1 \text{ mL}$$

- d. Larutan Standar Asam Galat 20 mg/L

$$V = \frac{20 \text{ mg/L asam galat} \times 20 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam galat}} = 2 \text{ mL}$$

- e. Larutan Standar Asam Galat 30 mg/L

$$V = \frac{30 \text{ mg/L asam galat} \times 25 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam galat}} = 3 \text{ mL}$$

- f. Larutan Standar Asam Galat 40 mg/L

$$V = \frac{40 \text{ mg/L asam galat} \times 25 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam galat}} = 4 \text{ mL}$$

- g. Larutan Standar Asam Galat 50 mg/L

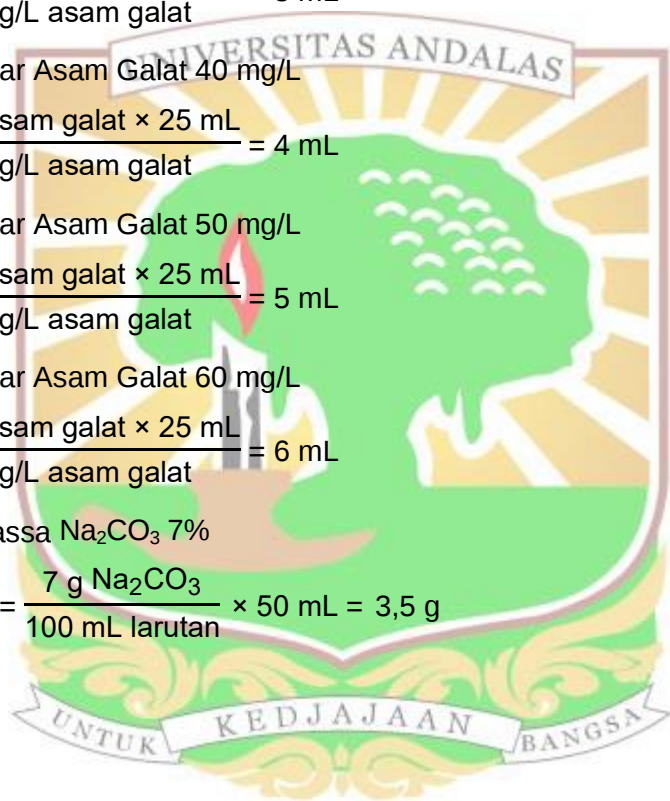
$$V = \frac{50 \text{ mg/L asam galat} \times 25 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam galat}} = 5 \text{ mL}$$

- h. Larutan Standar Asam Galat 60 mg/L

$$V = \frac{60 \text{ mg/L asam galat} \times 25 \text{ mL}}{100 \text{ mg/L asam galat}} = 6 \text{ mL}$$

- i. Penentuan Massa Na_2CO_3 7%

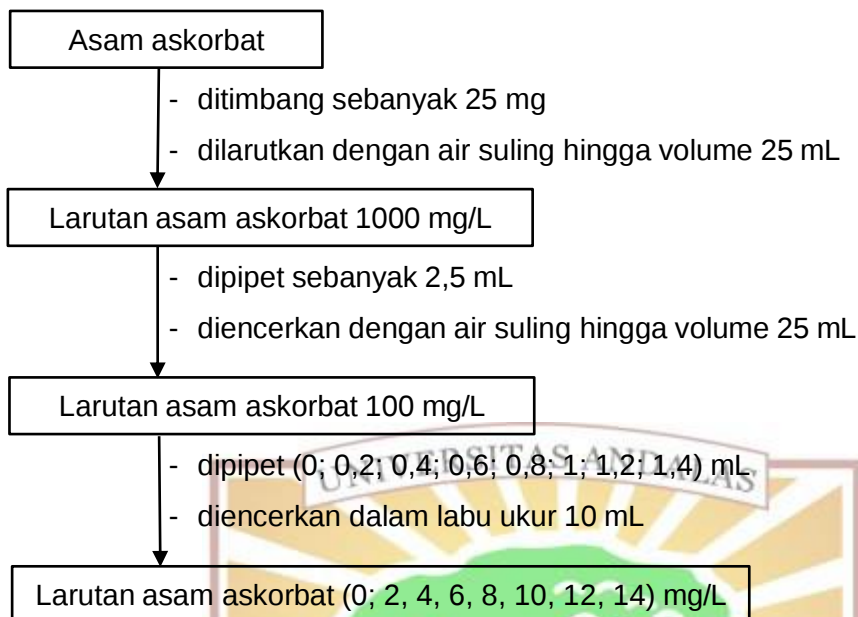
$$\text{Massa DPPH} = \frac{7 \text{ g Na}_2\text{CO}_3}{100 \text{ mL larutan}} \times 50 \text{ mL} = 3,5 \text{ g}$$



Lampiran 2. Skema Kerja Pembuatan Reagen

1. Pembuatan Reagen Penentuan Kapasitas Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan Standar Asam Askorbat

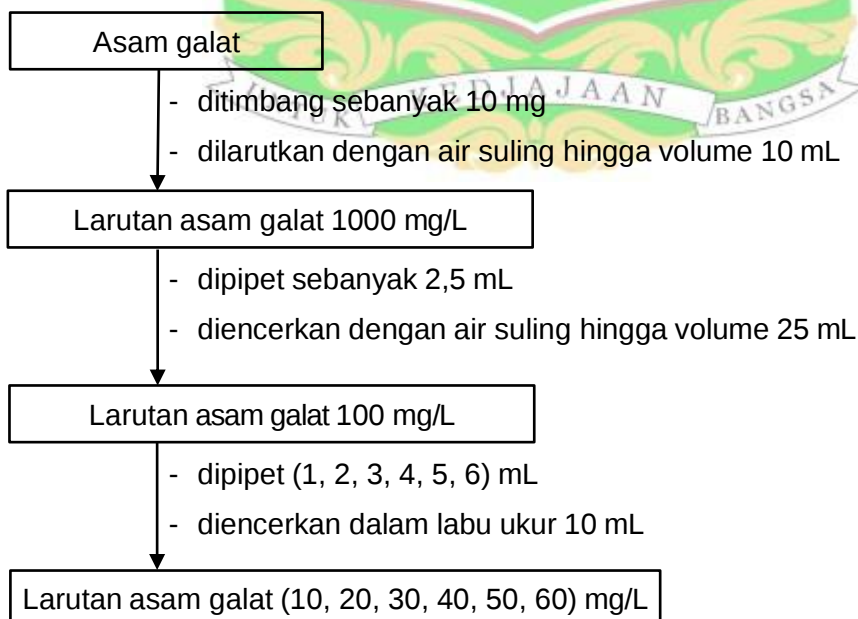


b. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

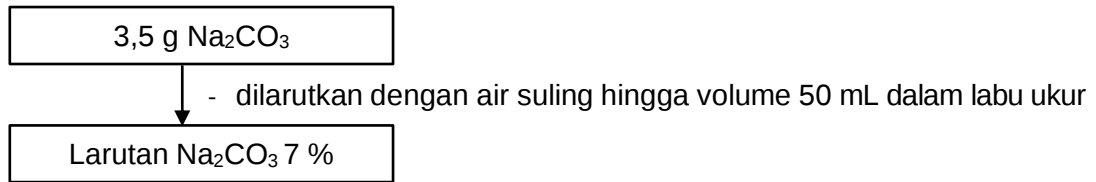


2. Pembuatan Reagen Penentuan Kandungan Fenolik Total (TPC)

a. Pembuatan Larutan Standar Asam Galat

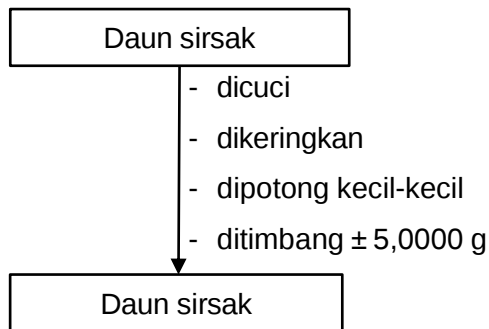


b. Pembuatan Larutan Na_2CO_3 7%

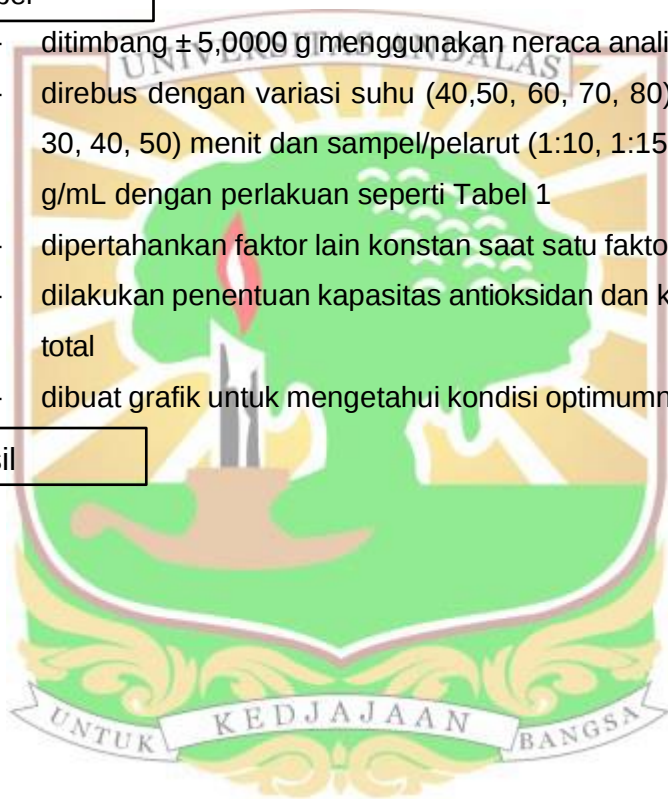
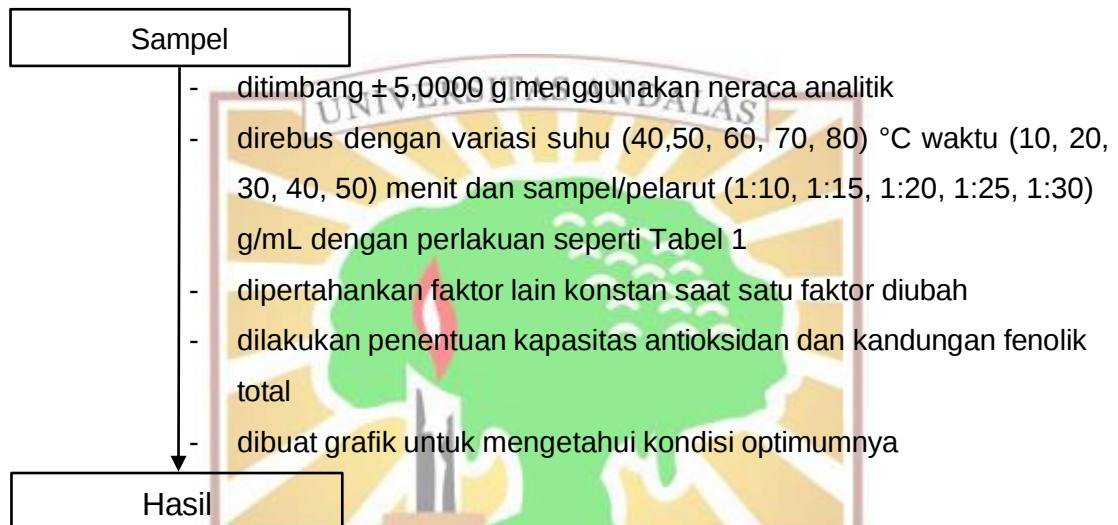


Lampiran 3. Skema Kerja Penelitian

1. Preparasi Sampel



2. Optimasi Ekstraksi dengan Metode OFAT

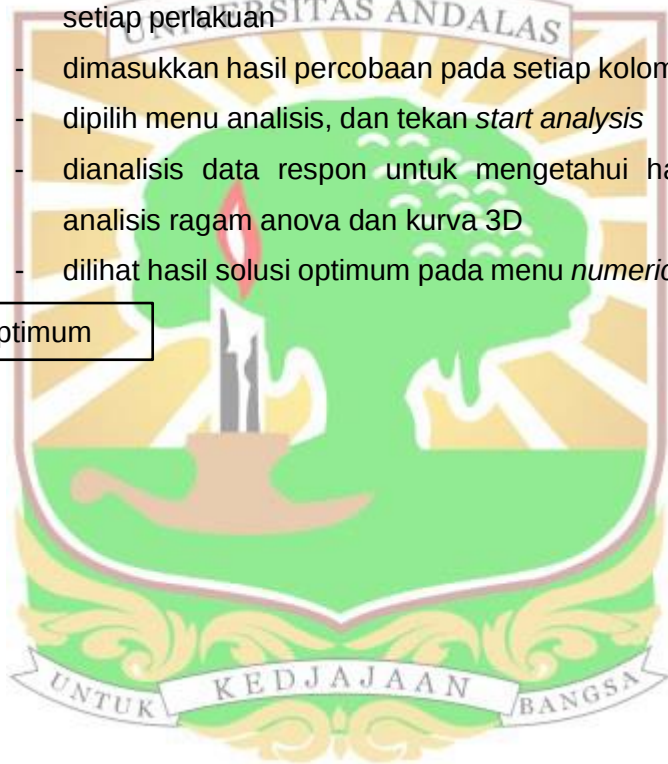


3. Optimasi Kondisi Ekstraksi dengan Metode RSM

Design Expert 13

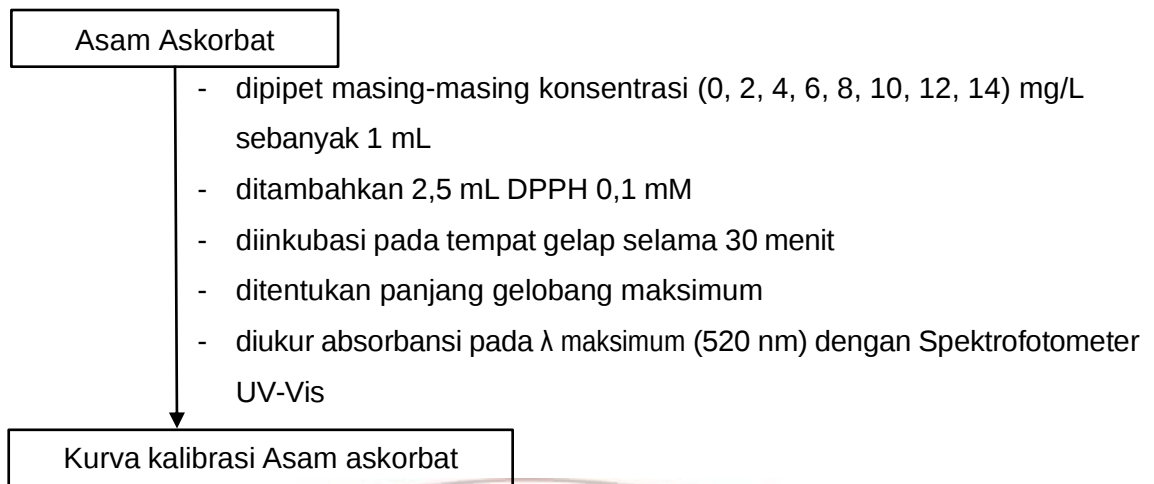
- dipilih metode RSM dan model rancangan percobaan CCD
- dimasukkan nama dan satuan serta batas maksimal dan minimal untuk parameter yang didapatkan dari OFAT
- ditetapkan respon yang digunakan yaitu: kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total
- di klik *finish*
- dilakukan proses dekoksi sesuai dengan desain eksperimen yang diberikan oleh *Design Expert*
- ditentukan kapasitas antioksidan dan kandungan fenolik total dari setiap perlakuan
- dimasukkan hasil percobaan pada setiap kolom respon perlakuan
- dipilih menu analisis, dan tekan *start analysis*
- dianalisis data respon untuk mengetahui hasil perhitungan analisis ragam anova dan kurva 3D
- dilihat hasil solusi optimum pada menu *numeric optimization*

Kondisi optimum

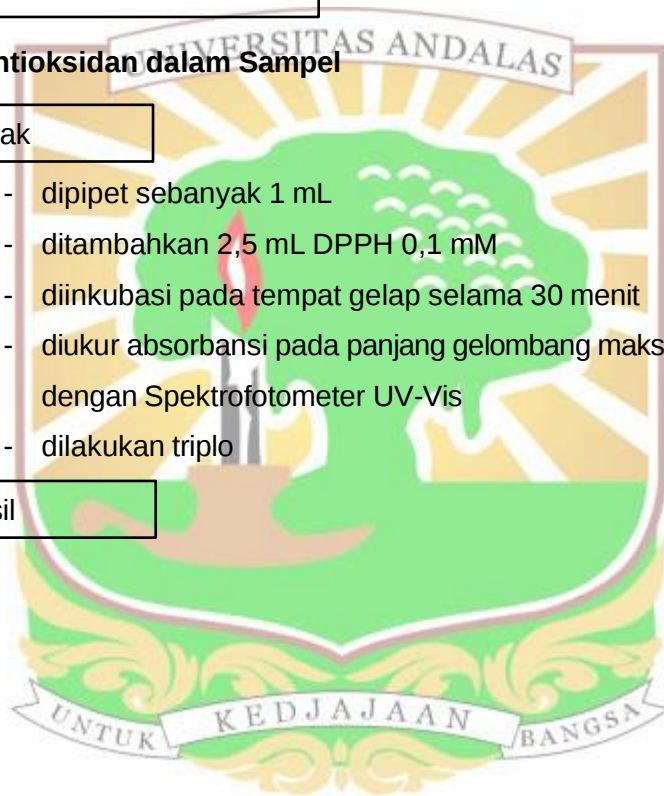
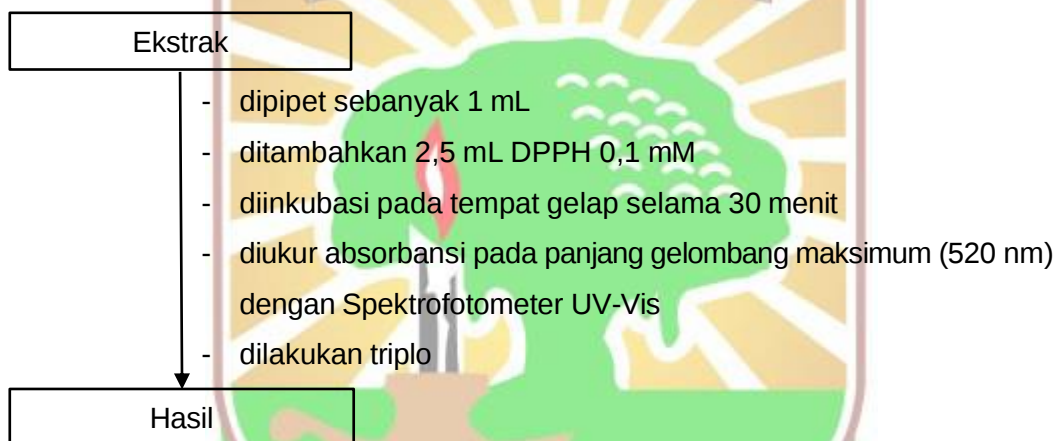


4. Penentuan Kapasitas Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar Asam Askorbat

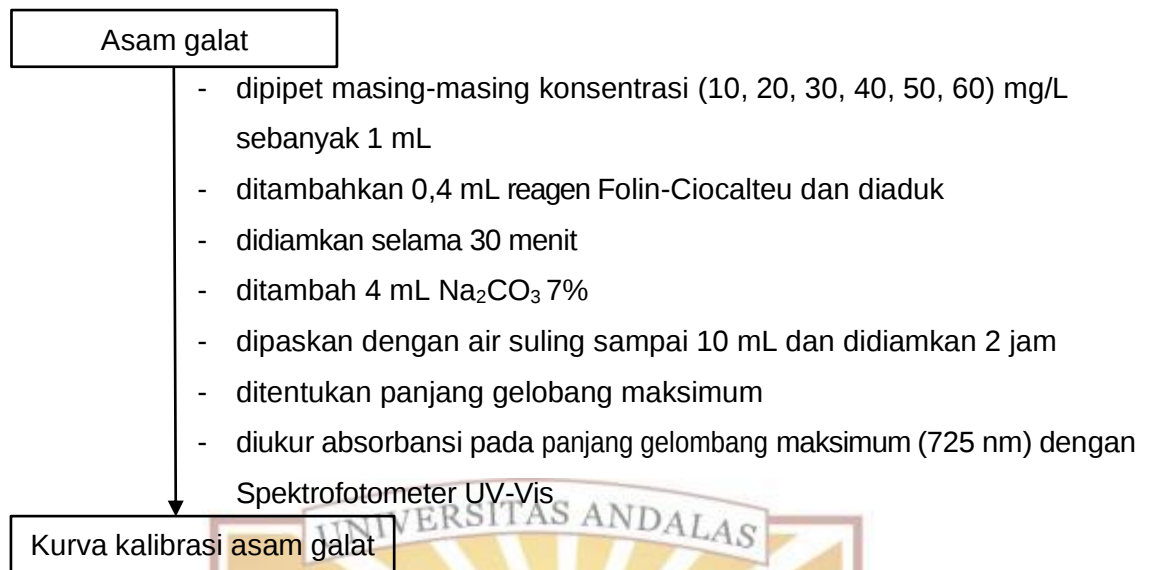


b. Penentuan Antioksidan dalam Sampel

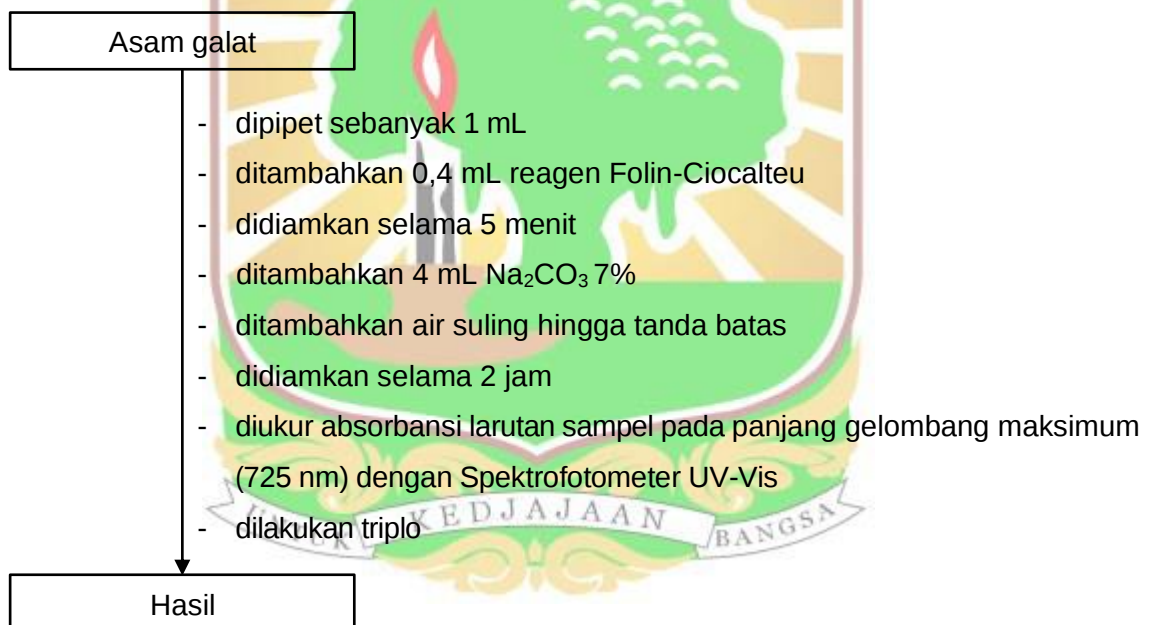


5. Penentuan Fenolik Total dengan Metode Folin-Ciocalteu

a. Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar Asam Galat



b. Penentuan Kandungan Fenolik Total dalam Sampel



Lampiran 4. Hasil identifikasi sampel



HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)

Departemen Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang
Sumbar Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 e-mail: herbariumanda@yahoo.com

Nomor : 733/K-ID/ANDA/XII/2025
Lampiran : -
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada yth,
Valia Dwi Putri
Di
Tempat

Dengan hormat,
Sehubungan dengan surat permohonan determinasi sampel dari Departemen Kimia,
Universitas Andalas tanggal 24 Desember 2025 di Herbarium Universitas Andalas
Departemen Biologi FMIPA Universitas Andalas, kami telah membantu mengidentifikasi
tumbuhan yang dibawa, dari:

Nama : Valia Dwi Putri
NIM : 2210412035
Instansi : Kimia-Universitas Andalas

Berikut ini diberikan hasil identifikasi yang dikeluarkan dari Herbarium Universitas Andalas.

No	Family	Spesies
1.	Annonaceae	<i>Annona muricata</i> L.

Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

Padang, 29 Desember 2025
Kepala,

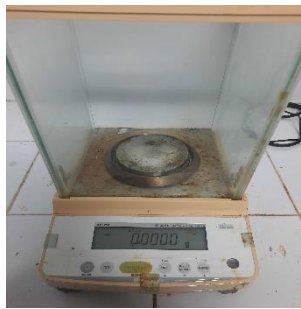
Dr. Nurainas
NIP. 196908141995122001

Lampiran 5. Gambar Alat dan Penelitian

5.1 Alat yang digunakan



(a)



(b)



(c)

Gambar 5.1 Peralatan yang digunakan pada penelitian (a) Spektrofotometer thermoscientific, Genesys 30, (b) Neraca analitik (c) Hotplate (Penangas) Dragon Lab, DLAB MS H280 Pro

5.2 Kerja Penelitian



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

Gambar 5.2 Tahapan yang dilakukan dalam penelitian (a) Daun sirsak dibersihkan, (b) Daun sirsak dipotong kecil-kecil, (c) Penimbangan sampel, (d) Ekstraksi sampel, (e) Hasil ekstraksi sampel

5.3 Gambar tahap penentuan kapasitas antioksidan dalam sampel



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)

Gambar 5.3 Tahapan penentuan kapasitas antioksidan dalam sampel (a) Penimbangan asam askorbat, (b) Pembuatan larutan deret standar asam askorbat, (c) Penimbangan DPPH, (d) Larutan DPPH, (e) inkubasi larutan setelah ditambahkan DPPH, (f) Larutan setelah diinkubasi, (g) Pengukuran absorbansi.

6.4 Gambar tahap penentuan kandungan fenolik total dalam sampel



(a)



(b)



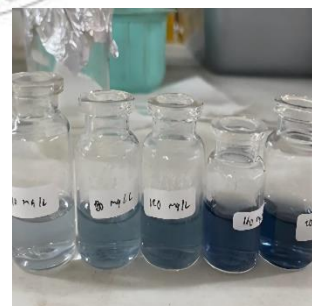
(c)



(d)



(e)



(f)



(g)

Gambar 5.4 Tahapan penentuan kandungan fenolik total dalam sampel (a) Penimbangan asam galat, (b) Pembuatan larutan deret standar asam galat, (c) Penimbangan Na_2CO_3 , (d) Larutan Na_2CO_3 7% , (e) inkubasi larutan setelah ditambahkan reagen Folin-Ciocalteu dan Na_2CO_3 7% , (f) Larutan setelah diinkubasi, (g) Pengukuran absorbansi.

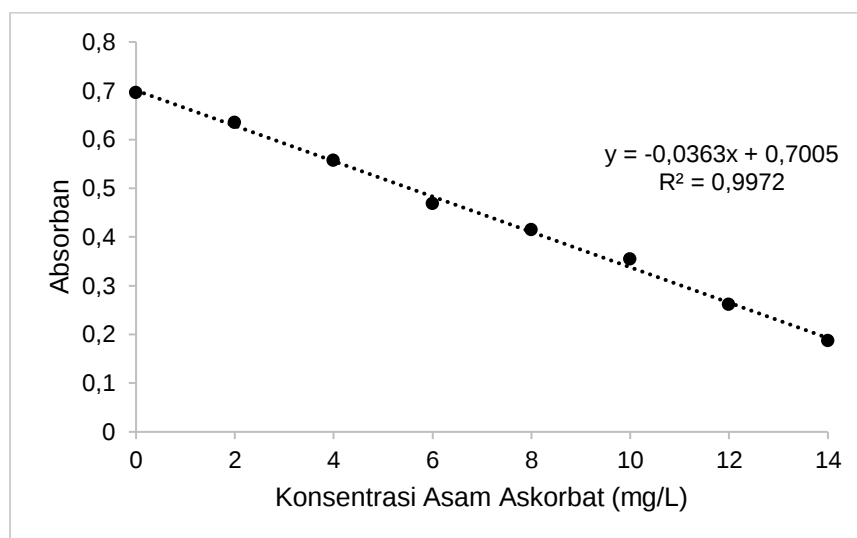


Lampiran 6. Kurva Kalibrasi Standar Asam Askorbat dengan Metode DPPH

Tabel 5.1 Data pengukuran absorbansi larutan standar asam askorbat

Konsentrasi (mg/L)	Absorban
0	0,696
2	0,635
4	0,557
6	0,468
8	0,414
10	0,354
12	0,261
14	0,187

Panjang gelombang maksimum: 520 nm



Gambar 5.5 Kurva kalibrasi standar asam askorbat

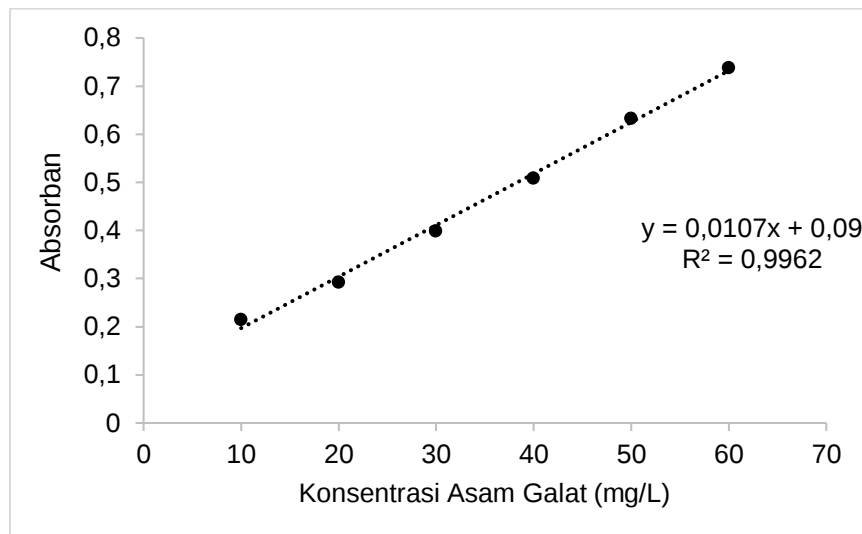


Lampiran 7. Kurva Kalibrasi Standar Asam Galat dengan Metode Folin–Ciocalteu

Tabel 5.2 Data pengukuran absorbansi larutan standar asam galat

Konsentrasi (mg/L)	Absorban
10	0,215
20	0,293
30	0,399
40	0,509
50	0,633
60	0,738

Panjang gelombang maksimum: 725 nm



Gambar 5.6 Kurva kalibrasi standar asam galat



Lampiran 8. Perhitungan kapasitas Antioksidan dalam Daun Sirsak dengan Metode DPPH

Contoh perhitungan:

Absorban (y) = 0,648

Persamaan regresi

$$y = -0,0363x + 0,7005$$

Dimana x: konsentrasi (mg AAE/L) dan y: absorban, sehingga:

$$y = -0,0363x + 0,7005$$

$$0,648 = -0,0363x + 0,7005$$

$$x = (0,648 - 0,7005) / -0,0363$$

$$x = 1,4463 \text{ mg AAE/L}$$

Berat sampel = 5,0026 g

Volume pelarut = 0,1 L

Faktor pengenceran = 50

kapasitas antioksidan total

$$= \frac{1,4463 \text{ mg AAE}}{1 \text{ L}} \times 0,1 \text{ L} \times \frac{1}{5,0026 \text{ g}} \times 50 = 1,4455 \text{ mg AAE/g FW}$$

Tabel 5.3 Kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi suhu

Suhu (°C)	Pengulangan	Absorban	Kapasitas antioksidan (mg AAE/g FW)	Kapasitas antioksidan rata-rata (mg AAE/g FW)
40	1	0,648	1,4455	1,5004 ± 0,05
	2	0,646	1,5004	
	3	0,644	1,5554	
50	1	0,532	4,6396	4,5939 ± 0,06
	2	0,536	4,5298	
	3	0,533	4,6123	
60	1	0,510	5,2466	5,1825 ± 0,06
	2	0,514	5,1368	
	3	0,513	5,1642	
70	1	0,481	6,0442	6,1263 ± 0,08
	2	0,478	6,1262	
	3	0,475	6,2086	
80	1	0,497	5,6035	5,5397 ± 0,07
	2	0,502	5,4668	
	3	0,499	5,5490	

Tabel 5.4 Kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi waktu

Waktu (menit)	Pengulangan	Absorban	kapasitas antioksidan (mg AAE/g FW)	Kapasitas antioksidan rata-rata (mg AAE/g FW)
10	1	0,507	5,3279	5,3095 ± 0,06
	2	0,506	5,3550	
	3	0,510	5,2454	
20	1	0,495	5,6578	5,5754 ± 0,10
	2	0,497	5,6028	
	3	0,502	5,4655	
30	1	0,479	6,1002	6,1096 ± 0,04
	2	0,480	6,0734	
	3	0,477	6,1551	
40	1	0,418	7,7811	7,7718 ± 0,07
	2	0,421	7,6988	
	3	0,416	7,8354	
50	1	0,440	7,1752	7,2846 ± 0,13
	2	0,431	7,4216	
	3	0,437	7,2571	

Tabel 5.5 Kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi rasio sampel terhadap pelarut

Rasio sampel/ Pelarut (g/mL)	Pengulangan	Absorban	kapasitas antioksidan (mg AAE/g FW)	kapasitas antioksidan rata-rata (mg AAE/g FW)
1:10	1	0,236	6,3968	6,5112 ± 0,10
	2	0,222	6,5885	
	3	0,225	6,5481	
1:15	1	0,359	7,0524	7,1209 ± 0,09
	2	0,357	7,0936	
	3	0,351	7,2166	
1:20	1	0,421	7,6971	7,7792 ± 0,08
	2	0,418	7,7793	
	3	0,415	7,8612	
1:25	1	0,508	6,6269	6,7184 ± 0,10
	2	0,506	6,6956	
	3	0,502	6,8325	
1:30	1	0,557	5,9287	5,8735 ± 0,10
	2	0,561	5,7631	
	3	0,557	5,9287	

Lampiran 9. Perhitungan Kandungan Fenolik Total dalam Daun Sirsak dengan Metode Folin-Ciocalteu

Contoh perhitungan:

Absorban (y) = 0,282

Persamaan regresi

$$y = 0,0107x + 0,09$$

Dimana x: konsentrasi (mg GAE/L) dan y: absorban, sehingga:

$$y = 0,0107x + 0,0900$$

$$0,282 = 0,0107x + 0,09$$

$$x = (0,282 - 0,09) / 0,0107$$

$$x = 17,9439 \text{ mg GAE/L}$$

$$\text{Berat sampel} = 5,0026 \text{ g}$$

$$\text{Volume pelarut} = 0,1 \text{ L}$$

$$\text{Faktor pengenceran} = 10$$

Kandungan fenolik total

$$= \frac{17,9439 \text{ mg GAE}}{1 \text{ L}} \times 0,1 \text{ L} \times \frac{1}{5,0026 \text{ g}} \times 10 = 3,5869 \text{ mg GAE/g FW}$$

Tabel 5.6 Kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi suhu

Suhu (°C)	Pengulangan	Absorban	Kandungan fenolik total (mg GAE/g FW)	Kandungan fenolik total rata-rata (mg GAE/g FW)
40	1	0,282	3,5869	3,6862 ± 0,09
	2	0,289	3,7172	
	3	0,291	3,7544	
50	1	0,387	5,5486	5,5925 ± 0,05
	2	0,392	5,6425	
	3	0,389	5,5863	
60	1	0,268	6,6525	6,5531 ± 0,11
	2	0,262	6,4287	
	3	0,266	6,5780	
70	1	0,297	7,7349	7,8091 ± 0,07
	2	0,299	7,8089	
	3	0,301	7,8834	
80	1	0,268	6,6511	6,5770 ± 0,10
	2	0,263	6,4655	
	3	0,267	6,6144	

Tabel 5.7 Kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi waktu

Waktu (menit)	Pengulangan	Absorban	Kandungan fenoli total (mg GAE/g FW)	Kandungan fenolik total rata-rata (mg GAE/g FW)
10	1	0,231	5,2684	5,2807 ± 0,09
	2	0,234	5,3801	
	3	0,229	5,1938	
20	1	0,285	7,2853	7,2109 ± 0,07
	2	0,283	7,2108	
	3	0,281	7,1365	
30	1	0,299	7,8109	7,8111 ± 0,07
	2	0,297	7,7371	
	3	0,301	7,8853	
40	1	0,322	8,6715	8,7336 ± 0,06
	2	0,324	8,7466	
	3	0,325	8,7828	
50	1	0,249	5,9430	5,9922 ± 0,06
	2	0,252	6,0539	
	3	0,250	5,9798	

Tabel 5.8 Kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi rasio sampel terhadap pelarut

Rasio sampel/ Pelarut (g/mL)	Pengulangan	Absorban	Kandungan fenolik total (mg GAE/g FW)	Kandungan fenolik total rata-rata (mg AAE/g FW)
1:10	1	0,480	7,2883	7,3377 ± 0,06
	2	0,486	7,3992	
	3	0,482	7,3255	
1:15	1	0,381	8,1550	8,2293 ± 0,07
	2	0,384	8,2389	
	3	0,386	8,2939	
1:20	1	0,322	8,6699	8,7192 ± 0,06
	2	0,323	0,7068	
	3	0,325	8,7808	
1:25	1	0,237	6,8672	6,6903 ± 0,09
	2	0,239	6,9605	
	3	0,241	7,0531	
1:30	1	0,323	6,5287	6,4179 ± 0,11
	2	0,315	6,3070	
	3	0,319	6,4181	

Lampiran 10. Uji *Outlier* (Uji Data Terpencil)

Contoh perhitungan *outlier* (uji data terpencil)

Tabel 5.9 Tabel uji *outlier* yang dilakukan secara triplo

Suhu (°C)	Pengulangan	Absorban	Kapasitas antioksidan (mg AAE/g FW)
40	1	0,648	1,4455
	2	0,646	1,5004
	3	0,644	1,5554

Mean $\pm$ standar deviasi = 1,5004 $\pm$ 0,05

Nilai yang dicurigai = 1,5554

Nilai standar = standardize (Nilai yang dicurigai, Mean, std. Deviasi)

= standardize (1,5554; 1,5004; 0,0549)

= 1,0002

Nilai standar absolut = ABS (nilai standar)

= ABS (1,0002)

= 1,0002

Data dikatakan *outlier* jika nilai standar absolut >3 . Data diatas nilai standar absolut 1,0002 < 3 , maka data ini tidak *outlier*.

Tabel 5.10 Uji *outlier* kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi suhu

Suhu (°C)	Absorban	kapasitas antioksidan (mg AAE/g FW)	Standardize	ABS standart	Outlier/Tidak
40	0,648	1,4455	-0,9998	0,9998	Tidak
	0,646	1,5004	-1,5004	1,5004	Tidak
	0,644	1,5554	1,0002	1,0002	Tidak
50	0,532	4,6396	0,7991	0,7991	Tidak
	0,536	4,5298	-1,1214	1,1214	Tidak
	0,533	4,6123	0,3223	0,3223	Tidak
60	0,510	5,2466	1,1212	1,1212	Tidak
	0,514	5,1368	-0,7998	0,7998	Tidak
	0,513	5,1642	-0,3214	0,3214	Tidak
70	0,481	6,0442	-0,9990	0,9990	Tidak
	0,478	6,1262	-0,0019	0,0019	Tidak
	0,475	6,2086	1,0010	1,0010	Tidak
80	0,497	5,6035	0,9262	0,9262	Tidak
	0,502	5,4668	-1,0602	1,0602	Tidak
	0,499	5,5490	0,1340	0,1340	Tidak

Tabel 5.11 Uji *outlier* kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi waktu

Waktu (menit)	Absorban	kapasitas antioksidan (mg AAE/g FW)	Standardize	ABS standart	Outlier/Tidak
10	0,507	5,3279	0,3234	0,3234	Tidak
	0,506	5,3550	0,7983	0,7983	Tidak
	0,510	5,2454	-1,1217	1,1217	Tidak
20	0,495	5,6578	0,8321	0,8321	Tidak
	0,497	5,6028	0,2773	0,2773	Tidak
	0,502	5,4655	-1,1094	1,1094	Tidak
30	0,479	6,1002	-0,2245	0,2245	Tidak
	0,480	6,0734	-0,8687	0,8687	Tidak
	0,477	6,1551	1,0932	1,0932	Tidak
40	0,418	7,7811	0,1358	0,1358	Tidak
	0,421	7,6988	-1,0609	1,0609	Tidak
	0,416	7,8354	0,9252	0,9252	Tidak
50	0,440	7,1752	-0,8721	0,8721	Tidak
	0,431	7,4216	1,0915	1,0915	Tidak
	0,437	7,2571	-0,2194	0,2194	Tidak

Tabel 5.12 Uji *outlier* kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH variasi rasio sampel terhadap pelarut

Rasio sampel/ pelarut (menit)	Absorban	kapasitas antioksidan (mg AAE/g FW)	Standardize	ABS standart	Outlier/Tidak
1:10	0,236	6,3968	-1,1314	1,1314	Tidak
	0,222	6,5885	0,7655	0,7655	Tidak
	0,225	6,5481	0,3659	0,3659	Tidak
1:15	0,359	7,0524	-0,8012	0,8012	Tidak
	0,357	7,0936	-0,3195	0,3195	Tidak
	0,351	7,2166	1,1207	1,1207	Tidak
1:20	0,421	7,6971	-1,0003	1,0003	Tidak
	0,418	7,7793	0,0007	0,0007	Tidak
	0,415	7,8612	0,9997	0,9997	Tidak
1:25	0,508	6,6269	-0,8736	0,8736	Tidak
	0,506	6,6956	-0,2171	0,2171	Tidak
	0,502	6,8325	1,0907	1,0907	Tidak
1:30	0,557	5,9287	0,5774	0,5774	Tidak
	0,561	5,7631	-1,1547	1,1547	Tidak
	0,557	5,9287	0,5774	0,5774	Tidak

Tabel 5.13 Uji *outlier* kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi suhu

Suhu (°C)	Absorban	Kandungan fenolik total (mg GAE/g FW)	Standardize	ABS standart	Outlier/Tidak
40	0,282	3,5869	-1,1287	1,1287	Tidak
	0,289	3,7172	0,3532	0,3532	Tidak
	0,291	3,7544	0,7755	0,7755	Tidak
50	0,387	5,5486	-0,9285	0,9285	Tidak
	0,392	5,6425	1,0588	1,0588	Tidak
	0,389	5,5863	-0,1303	0,1303	Tidak
60	0,268	6,6525	0,8725	0,8725	Tidak
	0,262	6,4287	-1,0913	1,0913	Tidak
	0,266	6,5780	0,2187	0,2187	Tidak
70	0,297	7,7349	-0,9986	0,9986	Tidak
	0,299	7,8089	-0,0028	0,0028	Tidak
	0,301	7,8834	1,0014	1,0014	Tidak
80	0,268	6,6511	0,7539	0,7539	Tidak
	0,263	6,4655	-1,1344	1,1344	Tidak
	0,267	6,6144	0,3806	0,3806	Tidak

Tabel 5.14 Uji *outlier* kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi waktu

Waktu (menit)	Absorban	Kandungan fenolik total (mg GAE/g FW)	Standardize	ABS standart	Outlier/Tidak
10	0,231	5,2807	-0,1317	0,1317	Tidak
	0,234	5,3801	1,0593	1,0593	Tidak
	0,229	5,1938	-0,9276	0,9276	Tidak
20	0,285	7,2853	1,0006	1,0006	Tidak
	0,283	7,2108	-0,0013	0,0013	Tidak
	0,281	7,1365	-0,9994	0,9994	Tidak
30	0,299	7,8109	-0,0028	0,0028	Tidak
	0,297	7,7371	-0,9986	0,9986	Tidak
	0,301	7,8853	1,0014	1,0014	Tidak
40	0,322	8,6715	-0,0946	0,0946	Tidak
	0,324	8,7466	0,2288	0,2288	Tidak
	0,325	8,7828	0,8658	0,8658	Tidak
50	0,249	5,9430	-0,8714	0,8714	Tidak
	0,252	6,0539	1,0918	1,0918	Tidak
	0,250	5,9798	-0,2204	0,2204	Tidak

Tabel 5.15 Uji *outlier* kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu variasi rasio sampel terhadap pelarut

Rasio sampel/ pelarut (menit)	Absorban	Kandungan fenolik total (mg GAE/g FW)	Standardize	ABS standart	Outlier/Tidak
1:10	0,480	7,2883	-0,8748	0,8748	Tidak
	0,486	7,3992	1,0901	1,0901	Tidak
	0,482	7,3255	-0,2154	0,2154	Tidak
1:15	0,381	8,1550	-1,0616	1,0616	Tidak
	0,384	8,2389	0,1375	0,1375	Tidak
	0,386	8,2939	0,9242	0,9242	Tidak
1:20	0,322	8,6699	-0,8720	0,8720	Tidak
	0,323	0,7068	-0,2195	0,2195	Tidak
	0,325	8,7808	1,0915	1,0915	Tidak
1:25	0,237	6,8672	-1,0013	1,0013	Tidak
	0,239	6,9605	0,0025	0,0025	Tidak
	0,241	7,0531	0,9987	0,9987	Tidak
1:30	0,323	6,5287	0,9992	0,9992	Tidak
	0,315	6,3070	-1,0008	1,0008	Tidak
	0,319	6,4181	0,0017	0,0017	Tidak

Tabel 5.16 Uji *outlier* kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH pada kondisi optimum (suhu 76°C, waktu 41 menit, rasio sampel terhadap pelarut 1:17 g/mL)

Absorban	Kapasitas antioksidan (mg GAE/g FW)	Standardize	ABS standart	Outlier/Tidak
0,349	8,2228	0,8068	0,8086	Tidak
0,450	8,1984	0,3120	0,3120	Tidak
0,353	8,1279	-1,1188	1,1188	Tidak

Tabel 5.17 Uji *outlier* kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu pada kondisi optimum (suhu 76°C, waktu 41 menit, rasio sampel terhadap pelarut 1:17 g/mL)

Absorban	Kapasitas antioksidan (mg GAE/g FW)	Standardize	ABS standart	Outlier/Tidak
0,371	8,9204	-1,0589	1,0589	Tidak
0,374	9,0146	0,1307	0,1307	Tidak
0,376	9,0777	0,9282	0,9282	Tidak

Lampiran 11. Nilai aktual respons pada kondisi optimum

Tabel 5.18 Kapasitas antioksidan daun sirsak dengan metode DPPH pada kondisi optimum

Pengulangan	Absorban	Kapasitas antioksidan (mg AAE/g FW)	Kapasitas antioksidan rata-rata (mg AAE/g FW)
1	0,349	8,2228	8,1831 $\pm$ 0,05
2	0,450	8,1984	
3	0,353	8,1279	

Tabel 5.19 Kandungan fenolik total daun sirsak dengan metode Folin-Ciocalteu pada kondisi optimum

Pengulangan	Absorban	Kandungan fenolik total (mg GAE/g FW)	Kandungan fenolik total (mg GAE/g FW)
1	0,371	8,9204	9,0042 $\pm$ 0,08
2	0,374	9,0146	
3	0,376	9,0777	



Skripsi Valia Dwi Putri

by Valia Putri

ORIGINALITY REPORT

4%

SIMILARITY INDEX

0%

INTERNET SOURCES

0%

PUBLICATIONS

4%

STUDENT PAPERS

MATCHED SOURCE

1

Submitted to Universitas Andalas

Student Paper

4%

4%

★ Submitted to Universitas Andalas

Student Paper

Exclude quotes

On

Exclude matches

< 3%

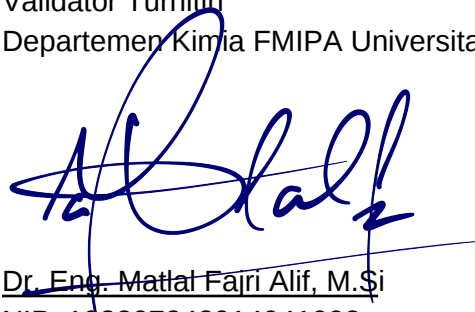
Exclude bibliography

On

Padang, 6 Agustus 2026

Validator Turnitin

Departemen Kimia FMIPA Universitas Andalas



Dr. Eng. Matlal Fajri Alif, M.Si

NIP. 198207242014041002