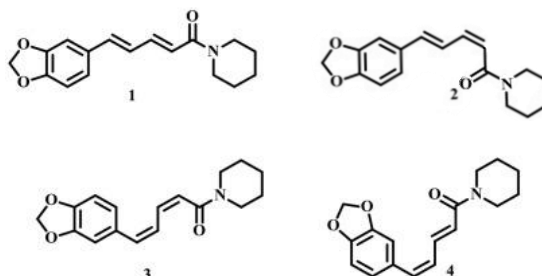


BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lada hitam (*Piper nigrum* L.) merupakan salah satu komoditas rempah yang paling banyak digunakan di dunia. Manfaatnya yang luas sebagai bumbu dan bahan obat-obatan menjadikan lada hitam memiliki nilai ekonomi yang tinggi (Srinivasan, 2007). Selain itu, lada hitam telah lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional. Tanaman ini diketahui mengandung banyak senyawa bioaktif di dalamnya, di antaranya *piperine*, *piperamide*, *piperamine*, *pipericide*, sarmentosin, sarmentin, *chavicine*, *piperylline*, piperolein, *piperanine*, *dihydrocarveol*, saponin, flavonoid, pati, dan minyak atsiri (Dillasamola & Sari, 2023). Aktivitas farmakologis ditunjukkan oleh salah satu senyawanya yang paling khas, yakni piperin. Piperin telah lama diteliti untuk mengetahui aktivitasnya, beberapa yang telah dipublikasikan adalah kemampuan piperin sebagai antiinflamasi, antioksidan, antikanker, antimikroba, antikonvulsan, antiparasit, neuroprotektif, hepatoprotektif, dan masih banyak lagi (Meghwal et al., 2021).

Piperin, atau dengan nama IUPAC (2*E*,4*E*)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidin-1-ylpenta-2,4-dien-1-one, memiliki bentuk kristal putih dan bau menyerupai lada hitam (PubChem, 2025). Struktur piperin sendiri terdiri dari cincin piperidin dan gugus 5-(3,4-methylenedioxyphenyl) yang dihubungkan oleh rantai alifatik terkonjugasi. Piperin diketahui memiliki 4 isomer geometris, yaitu (1) isomer trans-trans (*piperine*), (2) isomer cis-trans (*isopiperine*), (3) isomer cis-cis (*chavicine*), dan (4) isomer trans-cis (*isochavicine*) (Meghwal et al., 2021). Piperin merupakan alkaloid golongan piperidin dengan pKa 12,22 sehingga piperin termasuk senyawa basa lemah (Octavia et al., 2024).



Gambar 1. Senyawa utama yang diidentifikasi dari *P. nigrum*: (1) *piperine*, (2) *isopiperine*, (3) *chavicine*, dan (4) *isochavicine* (Tiwari et al., 2020)

Piperin telah sering diekstraksi dengan metode konvensional menggunakan pelarut organik atau asam anorganik, namun penggunaan pengeksrak semacam ini diketahui memiliki toksisitas, daya ledak, dan menyebabkan kerusakan lingkungan. Oleh karena itu, penggunaan pelarut yang ramah lingkungan namun tetap menghasilkan hasil yang optimal diperlukan untuk mengatasi masalah ini (Chemat et al., 2012).

Berdasarkan studi oleh Kanaki et al., (2008), piperin dapat diisolasi secara cepat menggunakan asam asetat karena kelarutannya yang baik dalam pelarut tersebut. Penggunaan pelarut asam asetat glasial dilaporkan menghasilkan piperin dengan tingkat kemurnian sekitar 90% berdasarkan analisis dengan menggunakan *High Performance Thin Layer Chromatography* (HPTLC). Setelah diuji menggunakan *melting point tester* didapati titik leburnya adalah 131-132°C yang dapat dikatakan mendekati titik lebur piperin murni yang dilaporkan yakni 130°C.

Berdasarkan persamaan Henderson-Hasselbach, basa lemah seperti piperin akan lebih banyak terionisasi dalam kondisi asam sehingga lebih mudah larut. Berdasarkan teori tersebut, diasumsikan bahwa asam organik lain juga dapat digunakan untuk mengekstraksi piperin dari buah lada hitam (*P. nigrum* L.) (Lukum et al., 2022). Asam-asam organik seperti asam sitrat, asam tartrat, dan asam laktat berpotensi digunakan untuk mengekstraksi piperin karena pH-nya yang asam sehingga dapat mengionisasi piperin yang merupakan basa lemah (Airouyuwa et al., 2023).

Jika dilihat dari sifat fisikokimianya, asam asetat memiliki pKa 4,76, dengan bobot molekul (BM) 60,05 g/mol, 1 *hydrogen bond donor* (HBD), 2 *hydrogen bond acceptor* (HBA), dan *topological polar surface area* (TPSA) 37,3 Å² (PubChem, 2025). Asam sitrat memiliki pKa 2,79, BM 192,12 g/mol, 4 HBD, 7 HBA, dan TPSA 132 Å² (PubChem, 2025). Asam tartrat memiliki pKa 2,72, BM 150,09 g/mol, 4 HBD, 6 HBA, dan TPSA 115,06 Å² (DrugBank, 2025). Asam laktat memiliki pKa 3,86, BM 90,08 g/mol, 2 HBD, 3 HBA, dan TPSA 57,5 Å² (PubChem, 2025).

Jika dibandingkan, asam asetat dan asam laktat memiliki sifat fisikokimia yang mirip, begitupun dengan asam tartrat dan asam sitrat. Pengaruh BM dan TPSA yang kecil dapat meningkatkan permeasi asam organik ke dalam sel untuk memaksimalkan penarikan senyawa (Simmons, 2012). Pada penelitian ini juga dibandingkan penggunaan asam organik yang memiliki HBA dan HBD rendah, serta asam organik yang memiliki HBA dan HBD tinggi dalam ekstraksi piperin, dikarenakan ikatan hidrogen yang dipengaruhi oleh HBA dan HBD memainkan peranan penting dalam ekstraksi piperin (Hassan et al., 2024).

Meskipun beberapa penelitian telah melaporkan keefektifan berbagai jenis pelarut, termasuk asam asetat, dalam mengekstraksi piperin dari *P. nigrum* L, namun studi komprehensif yang membandingkan pengaruh spesifik beberapa jenis asam organik terhadap kualitas isolat piperin masih sangat terbatas. Penelitian Nguyen et al. (2025) menunjukkan bahwa asam tartrat, asam laktat, dan asam sitrat pada konsentrasi 50% berhasil mengekstraksi lebih dari 100 mg/g alkaloid total dari *Coptis chinensis*. Hal ini mengindikasikan bahwa penggunaan asam-asam organik tersebut memiliki potensi yang kuat untuk diaplikasikan dalam ekstraksi piperin. Setiap asam organik memiliki sifat fisikokimia yang berbeda, seperti kekuatan asam (pKa), berat molekul, dan gugus fungsi, yang diduga kuat akan mempengaruhi efisiensi ekstraksi dan kemurnian senyawa yang dihasilkan (He et al., 2023).

Isolasi piperin dengan tingkat kemurnian tinggi sangat diperlukan mengingat penggunaan piperin yang sangat luas untuk tujuan pengobatan. Senyawa yang tidak murni akan menyebabkan kesalahan dosis dan mengganggu efektivitas pengobatan, bahkan pengotor yang terkandung bisa saja menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan (Pauli et al., 2014). Selain itu, piperin murni juga digunakan sebagai bahan

baku sintesis senyawa derivatnya untuk mendapatkan efek farmakologis yang lebih baik (Han et al., 2023). Kemurnian yang tinggi dalam sintesis kimia akan meningkatkan kualitas produk, menekan biaya produksi, dan meminimalkan terbentuknya produk sampingan dari reaksi kimia (Zolfigol et al., 2024).

Analisis kualitatif dan kuantitatif piperin secara akurat biasanya dilakukan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Profil kromatogram yang dihasilkan merupakan indikator langsung dari kemurnian dan komposisi isolat. Sebuah kromatogram dengan puncak yang tinggi, tajam, dan terpisah sempurna dari puncak senyawa pengotor lainnya menandakan suatu isolat yang memiliki kemurnian tinggi (Fanali et al., 2023). HPLC dipilih karena instrumen ini memiliki akurasi, presisi, resolusi, dan efisiensi yang tinggi sehingga efektif digunakan sebagai standar analisis di berbagai industri farmasi (Ahmed, 2024). Dibandingkan dengan instrumen lain, HPTLC memiliki sensitivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan HPLC dan perlu orang yang terampil untuk penanganannya, sedangkan Spektrofotometri UV-Vis, meskipun lebih murah dan mudah, namun sensitivitas dan kemampuan pemisahan senyawanya tidak sebaik HPLC (Somkuwar et al., 2024).

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai jenis asam organik terbaik yang tidak hanya menghasilkan rendemen ekstraksi yang tinggi, tetapi juga menghasilkan isolat piperin dengan kemurnian optimal yang ditunjukkan oleh profil kromatogram HPLC yang unggul. Temuan dari penelitian ini dapat menjadi dasar untuk pengembangan metode ekstraksi piperin yang lebih hijau (*green extraction*), selektif, dan aplikatif untuk skala industri.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh jenis asam organik yang berbeda (asam asetat, asam sitrat, asam tartrat, dan asam laktat) sebagai pelarut pengekstraksi terhadap profil kromatogram HPLC isolat piperin dari *P. nigrum*?

1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh jenis asam organik yang berbeda (asam asetat, asam sitrat, asam tartrat, dan asam laktat) sebagai pelarut pengekstraksi terhadap profil kromatogram HPLC isolat piperin dari *P. nigrum*.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Laboratorium Kimia Farmasi, dan Laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin pada bulan Oktober sampai Desember 2025.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah blender, corong Buchner, corong pisah, *HPLC instrument*, gelas *beaker*, labu Erlenmeyer, *magnetic stirrer*, *micropipette* 10-100 μL , *micropipette* 100-1000 μL , pompa vakum, spuit 1 mL, *syringe filter* 0,22 μm , wadah kaca, dan oven.

Adapun bahan yang digunakan adalah *aquadest*, asam asetat glasial, asam laktat, asam sitrat, asam tartrat, asam trifluoroasetat, asetonitril, buah lada hitam (*P. nigrum* L.) kering dari kota Makassar, isopropanol, kertas saring, kloroform, metanol, natrium bikarbonat, dan natrium sulfat anhidrat.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Pengambilan dan penyiapan sampel

Sampel *P. nigrum* yang telah kering dibeli di salah satu toko di Makassar. Sampel kemudian dihaluskan dengan cara ditumbuk menggunakan lumpang dan alu untuk menghasilkan ukuran yang tidak terlalu kasar dan tidak terlalu halus dengan rentang 1 sampai 4 mm yang diayak menggunakan ayakan mesh 4/18 (diameter 4,75 mm/1 mm). Sampel kemudian disimpan di dalam wadah tertutup rapat.

2.3.2 Pembuatan larutan pengestrak

Asam sitrat dan asam tartrat ditimbang masing-masing sebanyak 150 g, kemudian dilarutkan dalam air hingga volume 300 mL untuk memperoleh larutan dengan konsentrasi 50% (b/v). Asam laktat 90% diukur sebanyak 200 mL kemudian diencerkan dengan *aquadest* hingga volume 360 mL untuk memperoleh konsentrasi 50% (b/v), dan untuk asam asetat digunakan asam asetat glasial.

2.3.3 Ekstraksi

Sebanyak 100 g serbuk *P. nigrum* dibagi menjadi empat bagian, masing-masing ditimbang 25 g. Masing-masing bagian diekstraksi secara maserasi menggunakan 50 mL pelarut yang berbeda (asam asetat glasial, asam tartrat 50%, asam sitrat 50%, dan asam laktat 50%). Ekstraksi dilakukan sebanyak 6 kali selama 5 menit untuk setiap tahap. Masing-masing ekstrak disaring dan ditampung dalam wadah tertutup rapat.

2.3.4 Partisi cair-cair ekstrak dan pemurnian piperin

Masing-masing ekstrak yang telah ditampung diencerkan dengan *aquadest* dengan volume yang sama dengan volume ekstrak. Ekstrak yang telah diencerkan kemudian dipartisi dengan 100 mL kloroform sebanyak tiga kali. Fraksi kloroform yang diperoleh ditampung dan dicuci bersih dengan larutan natrium bikarbonat 10% untuk menetralkan sisa asam, kemudian dicuci kembali dengan *aquadest*. Masing-masing ekstrak kloroform kemudian dikeringkan menggunakan natrium sulfat anhidrat dan diuapkan hingga kering pada suhu 60°C di oven. Residu yang didapatkan dilarutkan menggunakan isopropanol dalam jumlah minimum lalu didiamkan hingga mengkristal. Kristal yang terbentuk kemudian dienap tuang lalu dicuci dengan isopropanol dingin dan dihitung rendemennya dengan persamaan berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{B_{\text{akhir}}}{B_{\text{awal}}} \times 100\% \quad (1)$$

Ket.

Rendemen (%) = Persentase rendemen kristal (%)

B_{awal} = Bobot awal simplisia sebelum diekstraksi (g)

B_{akhir} = Bobot akhir kristal setelah dimurnikan (g)

2.3.5 Profiling senyawa piperin pada tiap pelarut dengan HPLC

Pembuatan larutan baku. Larutan stok baku piperin (1000 µg/mL) dibuat dengan menimbang 5 mg piperin baku, lalu dilarutkan dalam metanol hingga volumenya 5 mL. Sebanyak 100 µL larutan tersebut diencerkan dengan metanol hingga volume 1 mL untuk mendapatkan konsentrasi 100 µg/mL. Larutan 100 µg/mL tersebut kemudian dicuplik 50 µL lalu diencerkan dengan metanol hingga volume 1 mL sehingga diperoleh konsentrasi uji 5 µL.

Pembuatan larutan uji. Larutan uji dibuat dengan menimbang masing-masing 5 mg dari tiap isolat piperin yang didapatkan dari masing-masing pelarut, lalu dicukupkan dengan metanol hingga volumenya 5 mL (1000 µg/mL). Sebanyak 100 µL dari masing-masing larutan tersebut diencerkan dengan metanol hingga volume 1 mL untuk mendapatkan konsentrasi 100 µg/mL, masing-masing larutan 100 µg/mL tersebut kemudian dicuplik 50 µL lalu diencerkan dengan metanol hingga volume 1 mL sehingga diperoleh konsentrasi uji 5 µL.

Analisis dengan HPLC. Analisis kromatografi dilakukan menggunakan instrumen HPLC dengan kondisi sebagai berikut: kolom C18 (150 × 4,6 mm; 5 µm), suhu kolom 33°C, fase gerak asetronitril:TFA 0,5% dalam air (45:55 v/v), laju alir 1 mL/menit, volume injeksi 20 µL, dan detektor PDA pada panjang gelombang 340 nm. Analisis profil kromatogram dilakukan pada hasil yang didapatkan, serta dihitung waktu retensi relatif tiap isomer dengan persamaan berikut:

$$WRR = \frac{t_{R1}}{t_{R2}} \quad (2)$$

Ket.

WRR = Waktu retensi relatif

t_{R1} = Waktu retensi isomer (menit)

t_{R2} = Waktu retensi senyawa utama/piperin (menit)

2.3.6 Uji kesesuaian sistem

Resolusi. Resolusi dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$Rs = 1,18 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{0,5,1} + W_{0,5,2})} \quad (3)$$

Ket.

Rs = Resolusi

t_{R1}, t_{R2} = Waktu retensi puncak pertama dan puncak kedua (menit)

$W_{0,5,1}, W_{0,5,2}$ = Lebar setengah puncak pertama dan puncak kedua (menit)

Tailing factor. Faktor asimetri atau *tailing factor* dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$As = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (4)$$

Ket.

As = Faktor asimetri/*tailing factor*

$W_{0,05}$ = lebar puncak pada 5% ketinggiannya dari dasar (menit)

f = jarak dari titik tinggi maksimum puncak ke tepi puncak pada 5% ketinggian dari dasar (menit)

Jumlah lempeng teoritis. Jumlah lempeng teoritis dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad (5)$$

Ket.

N = Jumlah lempeng teoritis

t_R = Waktu retensi puncak (menit)

W = lebar puncak (menit)

2.3.7 Perhitungan konsentrasi relatif

Tiap puncak utama pada tiap kromatogram akan dihitung konsentrasi relatif atau kemurnian relatifnya dengan persamaan berikut:

$$\% A = \frac{A}{\Sigma A} \times 100\% \quad (6)$$

Ket.

$\% A$ = kemurnian relatif (%)

A = Luas area puncak utama (mAUs)

ΣA = Total luas seluruh puncak (mAUs)