

## EVALUASI AKTIVITAS ANTIOKSIDATIF EKSTRAK DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica*) BERDASARKAN PERBEDAAN RUAS DAUN

(EVALUATION OF ANTIOXIDATIVE ACTIVITY FROM BELUNTAS LEAVES EXTRACT  
(*Pluchea indica* Less) BASED ON DIFFERENCE OF LEAF SEGMENT)

Paini Sri Widyawati<sup>1)</sup>, C. Hanny Wijaya<sup>2)</sup>, Peni Suprapti Hardjosworo<sup>3)</sup>,  
Dondin Sajuthi<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Fakultas Teknologi Pertanian - Unika Widya Mandala Surabaya  
Alamat : Jl Dinoyo 42-44 Surabaya, Email : wiwiedt@gmail.com

<sup>2)</sup> Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian IPB  
<sup>3)</sup> Fakultas Peternakan IPB

<sup>4)</sup> Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB

### Abstract

*Beluntas (Pluchea indica Less) is a herb that commonly used as traditional medicine and food. Its leaves have many biological activities, because they contain various phenolic compounds. The phenol concentration of beluntas leaves depends on leaf segment, earth condition, fertilizer and environmental stress. This research is focused to determine antioxidant activity of three groups of beluntas leaf segments that includes 1-3, 4-6 and > 6. They were ground, dried at ambient temperature for 7 days, maserated by petroleum eter (1:4 b/v) at ambient temperature for 24 hours and soxhlet extracted by methanol (1:15 b/v) at 65°C for 3 hours. The result shows that the extract contains phytochemical compounds such as tannin, sterol, phenol hydroquinone and flavonoid. This extract has antioxidant activity to scavenging free radical DPPH (2,2-phenyl-1-picrylhydrazyl). The extract of 1-3 beluntas leaf segment was more potential antioxidant source than 4-6 and > 6 beluntas leaf segments, because it had the least IC<sub>50</sub> (inhibitor concentration) and the highest total phenol and total flavonoid. The IC<sub>50</sub>, total phenol and flavonoid total of it were 3.71 mg/L, 234.65 mg GAE/100 g samples and 2163.59 mg QE/ 100 g samples, respectively.*

**Key words :** *antioxidant activity, beluntas (Pluchea indica Less), phytochemical, total phenol, total flavonoid*

### Abstrak

Beluntas (*Pluchea indica Less*) adalah tanaman herba yang umumnya digunakan sebagai obat tradisional dan pangan (lalapan). Daun beluntas mempunyai beberapa aktivitas biologi karena mengandung berbagai senyawa fenolik. Konsentrasi fenol dalam daun beluntas sangat bergantung pada ruas daun, kondisi tanah, tingkat kesuburan dan stress lingkungan. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas antioksidan dari ketiga kelompok dari ruas daun beluntas yang meliputi : 1-3, 4-6 dan >6. Daun beluntas yang sudah dipetik dari pekarangan, dikeringkan pada suhu 27 °C selama 7 hari, dimaserasi dengan petroleum eter (1:4 b/v) pada suhu kamar selama 24 jam dan diekstraksi soxhlet dengan metanol (1:15 b/v) pada suhu 65°C selama 3 jam. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa fitokimia seperti : tanin, sterol, fenol hidrokuinon dan flavonoid. Ekstrak ini mempunyai aktivitas antioksidan menangkap radikal bebas DPPH (2,2-phenyl-1-picrylhydrazyl). Ekstrak dari ruas daun beluntas 1-3 yang paling berpotensi sebagai sumber antioksidan dari ruas daun 4-6 dan >6, sebab ekstrak tersebut mempunyai nilai IC<sub>50</sub> (konsentrasi penghambatan) paling kecil dan kadar fenol total dan flavonoid total tertinggi. Nilai IC<sub>50</sub>, total fenol dan

total flavonoid dari ekstrak ruas daun beluntas 1-3 masing-masing sebesar 3.71 mg/L, 234.65 mg GAE (gallic acid equivalent)/100 g berat sampel kering dan 2163.59 mg QE (Quercetin equivalent)/100 g berat sampel kering.

Kata Kunci: aktivitas antioksidan, beluntas (*Pluchea indica Less*), fitokimia, fenol total, flavonoid total dan DPPH (2,2-fenil-1-pikrilhidrazil).

## PENDAHULUAN

Radikal bebas, seperti anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), radikal hidroksil ( $\bullet OH$ ) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dapat memicu kerusakan biomolekul potensial dalam makhluk hidup, seperti : lemak, protein dan asam nukleat, yang berakibat munculnya berbagai macam penyakit degeneratif. Keberadaan radikal bebas ini pada proses pengolahan pangan dapat mempengaruhi kualitas, stabilitas dan keamanan pangan (Chludil dkk. 2008)

Antioksidan adalah senyawa yang berada pada konsentrasi lebih rendah dari substratnya secara signifikan dapat menunda atau mencegah oksidasi (Moein dkk. 2007). Senyawa ini dapat menghentikan reaksi radikal bebas. Usaha pencarian antioksidan alami terus dilakukan untuk menggantikan antioksidan sintetis yang masih diragukan akan tingkat keamanannya (Orhan dkk. 2009).

Beluntas (*Pluchea indica Less*) merupakan tanaman perdu kelompok Asteraceae yang telah dikenal masyarakat sebagai lalapan dan obat tradisional (Ardiansyah dkk. 2003). Berbagai penelitian telah menyebutkan bahwa beluntas mengandung senyawa lignan, seskuiterpen, fenilpropanoid, benzoid, monoterpen, triterpen, sterol dan alkana (Luger dkk. 2000), akar mengandung stigmasterol (+ $\beta$ -sitosterol), stigmasterol glikosida (+ $\beta$ -sitosterol-glikosida), 2-(prop-1-unil)-5-(5,6-dihidroksi heksa-1,3-diunil)-thiofena dan (-)-katekin (Biswas dkk. 2005), sedangkan daun mengandung hidrokuinon, tanin, alkaloid dan sterol (Ardiansyah dkk. 2003), flavonol,

seperti : mirisetin, kuersetin dan kaemferol (Andarwulan dkk. 2008).

Senyawa fenolik, terutama flavonoid berfungsi melindungi tanaman dari herbivora dan penyakit (Hagerman 2002). Senyawa ini dapat menangkap radikal bebas, mereduksi, mendonorkan atom hidrogen dan meredam oksigen singlet (Kumaran dan Karunakaran 2007). Potensial antioksidan flavonoid tergantung pada karakteristik struktur seperti: jumlah dan pola substitusi gugus hidroksil dan jumlah gugus hidroksil yang tersubstitusi glikosida (Amic dkk. 2003). Kadar fenolik pada daun sangat dipengaruhi oleh tingkat umur daun, kondisi tanah, pemberian pupuk serta stress lingkungan baik secara fisik, biologi maupun kimiawi (Kahkonen dkk. 2001).

Metode analisa DPPH secara luas digunakan untuk menentukan potensi ekstrak tanaman berdasarkan kemampuan menangkap radikal bebas. DPPH merupakan radikal bebas sintetis yang stabil yang dapat mewakili radikal bebas sesungguhnya. Senyawa ini berwarna ungu jika dilarutkan dalam pelarut metanol (Huang dkk. 2005). Penggunaan metanol dapat menstabilkan radikal DPPH dibandingkan pelarut lain, seperti: etanol dan n-butanol (Sharma dan Bhat 2009). Selain itu radikal DPPH dapat larut hanya dalam media pelarut organik (Kim dkk. 2002).

Kemampuan menangkap radikal bebas DPPH sampel didasarkan pada kemampuan mereduksi radikal bebas yang ditandai dengan penurunan intensitas warna larutan ungu, karena DPPH menangkap atom hidrogen dari senyawa fenolik sehingga terbentuk senyawa difenil pikrilhidrasin berwarna

kuning yang stabil (Chang dkk. 2007; Kim dkk. 2002). Dekolorisasi radikal DPPH dapat terdeteksi pada  $\lambda$  515-517 nm (Hasan dkk. 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aktivitas antioksidatif ekstrak daun beluntas dari 3 kelompok ruas daun beluntas, yaitu ruas daun 1-3, 4-6 dan >6, melalui pengujian fitokimia, total fenol total flavonoid dan kemampuan menangkap radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).

## **METODOLOGI**

### **Bahan Penelitian**

Bahan baku yang digunakan adalah daun beluntas yang diperoleh dari daerah Dramaga, Bogor. Bahan kimia untuk analisis terdiri atas : petroleum eter metanol akuades pereaksi Dragendoff Mayer dan Wagner klorofor, asam gallat (Riedel-de Haen), kuersetin dan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, dll

### **Metode Penelitian**

#### **Proses Penyiapan Ekstrak Daun Beluntas**

Daun beluntas pada penelitian ini dikelompokkan menjadi 3, yaitu : ruas daun 1-3, 4-6 dan >6 (Gambar 1). Pengelompokan didasarkan pada perbedaan warna dan tekstur daun. Masing-masing ruas diekstraksi menurut modifikasi metode Biswas dkk. (2005)

Daun beluntas yang telah dikeringkan pada suhu kamar selama 7 hari ditepungkan dengan ukuran 40 mesh, lalu dianalisis kadar air dan fitokimianya. Kemudian tepung daun kering tersebut dimaserasi dengan petroleum eter (1:4 b/v) pada suhu kamar selama 24 jam. Residu yang sudah dipisahkan dari pelarutnya dengan cara disaring dikeringkan pada suhu kamar ( $\pm$  15 menit). Selanjutnya residu yang sudah kering diekstrak dengan metanol (1:15b/v) menggunakan ekstraksi soxhlet pada suhu 65°C selama 3 jam. Pelarut metanol diuapkan dengan rotary evaporator. Ekstrak yang

diperoleh disimpan pada suhu 4°C dan gelap sampai analisa berikutnya.

Analisis meliputi kadar air ditentukan berdasarkan metode AOAC 925.45 (1999), analisa fitokimia dilakukan berdasarkan metode Harborne (1996) yang meliputi: alkaloid, flavonoid, fenolik, triterpenoid, sterol, saponin dan tanin.

### **Analisa Alkaloid**

1 gram sampel digiling dengan pasir sambil dibasahi dengan 5 ml kloroform yang berisi 3 tetes ammonia. Tambahkan lagi 5 ml kloroform yang berisi 5 tetes ammonia, kemudian saring ke dalam tabung reaksi. Ekstrak kloroform ditambahkan 10 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M dan divorteks, kemudian dipisahkan lapisan asamnya ke dalam tabung reaksi lain. Lapisan tersebut diteteskan pada *spot plate* dan ditambahkan 3 pereaksi Dragendoff, Mayer dan Wagner, uji keberadaan alkaloid positif jika timbul endapan dengan warna berturut-turut sebagai berikut : merah jingga, putih dan coklat.

### **Deteksi Senyawa Flavonoid dan Fenolik**

Sebanyak 0.1 gram sampel ditambahkan metanol sampai semua sampel terendam, kemudian dipanaskan. Larutan dipipet dan diteteskan pada 2 *spot plate* masing-masing 5 tetes. Pada *spot plate* pertama ditambahkan NaOH 10% (b/v), timbulnya warna merah menandakan positif senyawa fenol hidrokuinon. Pada *spot plate* kedua ditambahkan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, timbulnya warna merah menandakan positif senyawa flavonoid.

### **Deteksi Triterpenoid dan Sterol**

Sebanyak 0,1 gram sampel ditambahkan etanol dan dipanaskan lalu disaring. Filtrat diuapkan dan ditambahkan eter. Lapisan eter yang terbentuk dipipet dan diteteskan pada *spot plate* lalu ditambahkan pereaksi LB

(3 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Adanya triterpenoid ditandai dengan timbulnya warna merah atau ungu, sedangkan adanya sterol ditandai dengan adanya warna hijau.

#### **Deteksi Flavonoid, Saponin dan Tanin**

Sebanyak 0,1 gram sampel dimasukkan dalam gelas piala lalu ditambahkan 10 ml air panas dan didihkan selama 5 menit. Kemudian masing-masing 3 ml larutan dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi. Tabung pertama dimasukkan serbuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat dan amil alkohol. Campuran dikocok dan dibiarkan memisah, adanya flavonoid ditunjukkan adanya warna merah coklat pada lapisan amil alkohol. Pada tabung reaksi kedua dilakukan pengocokan secara vertikal selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit. Adanya busa yang stabil menunjukkan adanya saponin, sedangkan sisa campuran didihkan lagi selama 10 menit lalu disaring. Filtrat ditambahkan dengan beberapa ml larutan FeCl<sub>3</sub> 1 % (b/v). Timbulnya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

#### **Penentuan Rendemen**

Ekstrak daun beluntas yang diperoleh ditentukan rendemennya dengan tujuan untuk mengetahui tingkat keefektifan metode ekstraksi. Rendemen yang diperoleh ditentukan berdasarkan metode gravimetri berdasarkan metode Ljubuncic *et al.* (2005), dengan cara membandingkan berat ekstrak daun beluntas terhadap berat sampel yang digunakan, sehingga diperoleh persen ekstrak (b/b).

#### **Kadar Total Fenol**

Kadar total fenol ditentukan berdasarkan metode Kumar dkk. (2008) dan Jayasri dkk. (2009). 1 ml sampel ditambahkan 4 ml larutan natrium karbonat (75g/L) kemudian divorteks dan ditambahkan 0,2 ml reagen Folin-ciocalteus fenol. Selanjutnya campuran

ditambahkan akuades hingga volume 10 ml dan divorteks kembali. Setelah sampel dibiarkan selama 1 jam diukur pada  $\lambda$  760 nm. Kadar fenol total dinyatakan ekuivalen asam gallat (GAE).

#### **Kadar Total Flavonoid**

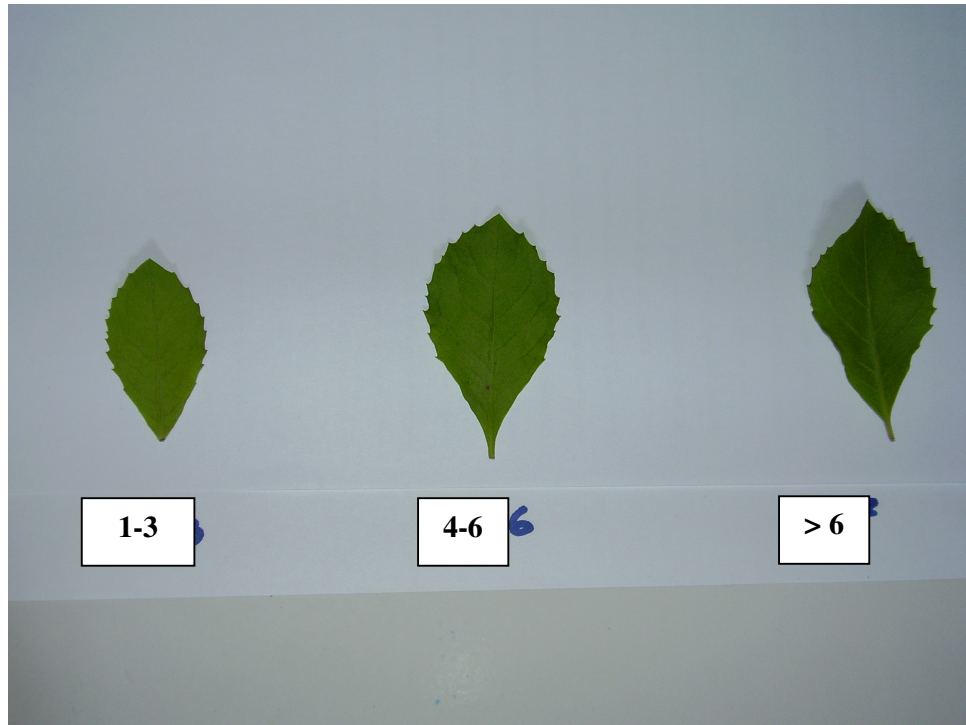
Kadar total flavonoid ditentukan berdasarkan metode Kumar dkk. (2008). 1 ml sampel dimasukkan dalam labu takar 10 ml yang berisi 4 ml akuades dan ditambahkan 0,3 ml larutan NaNO<sub>2</sub> 5% (b/v). Sesudah 5 menit ditambahkan 0,3 ml larutan AlCl<sub>3</sub> 10% (b/v), lalu sesudah 6 menit ditambahkan 2 ml larutan 1 mol/L NaOH dan diencerkan hingga volume 10 ml dengan akuades. Absorbansi larutan diukur pada  $\lambda$  510 nm. Kadar flavonoid total dinyatakan ekuivalen kuersetin (QE).

#### **Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH**

Aktivitas antioksidan sampel diukur berdasarkan modifikasi metode Aicha dkk. (2006). 1 ml sampel pada berbagai variasi konsentrasi dalam pelarut metanol ditambahkan 3 ml larutan DPPH (60 $\mu$ M) dan metanol hingga volume 10 ml. Absorbansi larutan diukur pada  $\lambda$  517 nm setelah 30 menit menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kemampuan menghambat radikal bebas DPPH dinyatakan dengan rumus : % penghambatan = (A<sub>0</sub>-A<sub>t</sub>)/A<sub>0</sub> x 100%, Keterangan : A<sub>0</sub> adalah absorbansi kontrol pada saat t = 0 detik dan A<sub>t</sub> adalah absorbansi antioksidan pada saat t = 30 detik.

#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Tingkat ketuaan daun beluntas menentukan kadar fitokimia, oleh karena itu dilakukan pengelompokan daun menjadi 3, yaitu : ruas daun 1-3, 4-6 dan >6. Pembagian didasarkan pada perbedaan kenampakan daun (warna dan tekstur). Semakin tua daun warnanya semakin hijau tua dan teksturnya semakin keras karena jaringan /selulosanya semakin banyak.



**Gambar 1. Pengelompokan daun beluntas yang diteliti (1-3 ruas, 4-6 ruas dan lebih dari 6 ruas)**

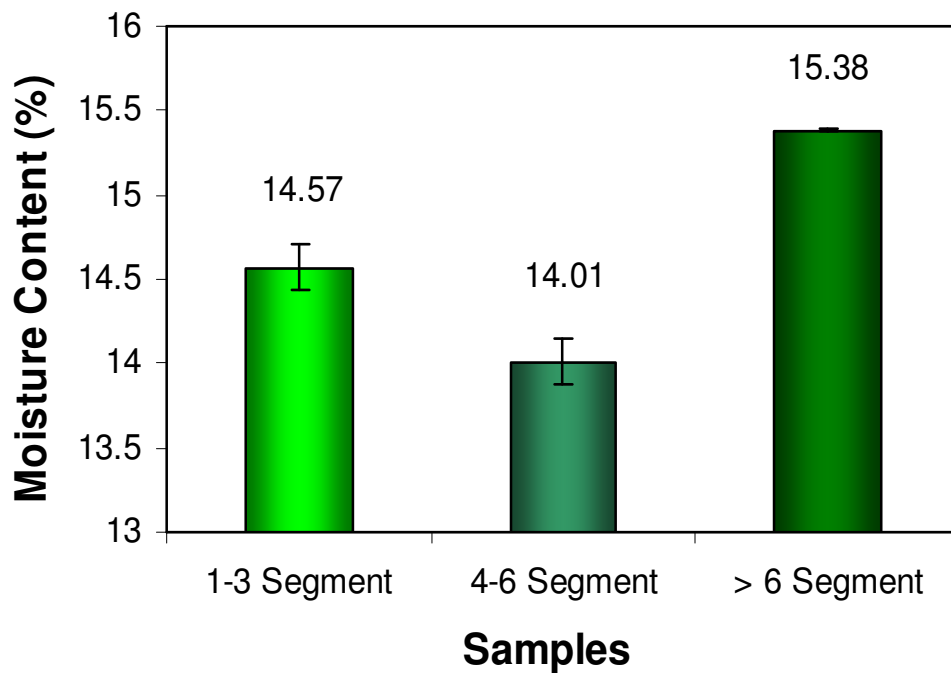
#### **Kadar Air**

Ketiga kelompok sampel yang sudah dikeringkan pada suhu kamar ditepungkan untuk mendapatkan partikel 40 mesh. Perlakuan ini dimaksudkan untuk memperluas permukaan kontak antara partikel daun dengan pelarut sehingga hasil ekstraksi yang diperoleh maksimal.

Berdasarkan Matricardi dkk. (2009) bahwa reduksi ukuran partikel pada biji kacang tanah menunjukkan efek yang positif terhadap ekstraksi. Ukuran partikel semakin kecil akan menyebabkan peningkatan luas permukaan dan jumlah sel yang rusak yang berakibat peningkatan konsentrasi minyak yang dihasilkan. Selama ekstraksi difusi yang terjadi pada

partikel relatif kecil, sehingga jumlah minyak yang terekstrak sebanding dengan luas permukaan partikel. Penurunan ukuran partikel dari 3,35-4,75 mm menjadi 0,86-1,19 mm, total minyak yang dihasilkan meningkat sebesar 36%- 82%.

Menurut Pileo dkk. (2007) bahwa reduksi ukuran partikel pada biji kopi secara signifikan berpengaruh positif terhadap fenol yang terekstrak. Reduksi ukuran partikel yang berlebihan menyebabkan terbentuknya fenomena pelapisan dan cara yang disukai oleh pelarut sehingga membatasi efisiensi pembasahan pelarut terhadap sampel dan menurunkan efisiensi ekstraksi.



**Gambar 2. Kadar kelembaban dari tiap jenis daun**

Penentuan kadar air tepung daun beluntas ditentukan dengan oven vakum suhu 70°C, hal ini dilakukan dengan pertimbangan untuk meminimalkan kesalahan kadar air yang terukur karena hilangnya sejumlah senyawa volatil (kelompok terpen), seperti : boehmeril asetat, HOP-17 (21)-en 3 $\beta$ -asetat, linaloil glukosida, linaloil apiosil glukosida, linaloil hidroksi glukosida, plusheosida C, cuauhthermone, 3-(2'-3'-diasetoksi-2'metil-butiril), plucheol A, plucheol B, plucheosida A, plucheosida B, plucheosida E dan pterocarptriol (Traithip 2005), seskuisterpen, monoterpen dan triterpen (Luger dkk. 2000).

Kadar air sampel daun beluntas mengalami penurunan seiring dengan

bertambahnya usia/ketuaan daun, karena terjadi peningkatan jumlah komponen daun (jaringan/serat). Penyimpangan kadar air pada ruas >6 disebabkan adanya penyerapan air kembali oleh jaringan/serat pada tepung daun yang kering. Selama proses pengeringan kadar air daun beluntas mengalami penurunan sehingga terjadi pengkerutan ukuran pori dan distribusi ukuran pori saling mendekat (Haeggkvist dkk. 1998). Kemampuan adsorpsi air oleh selulosa atau serat disebabkan adanya interaksi antara gugus hidroksil dengan molekul air dari udara (Svedas 1998). Menurut Sembiring dan Sinaga (2003) bahwa kemampuan adsorpsi air oleh adsorben ditentukan adanya pori yang dapat meningkatkan luas permukaan adsorben.

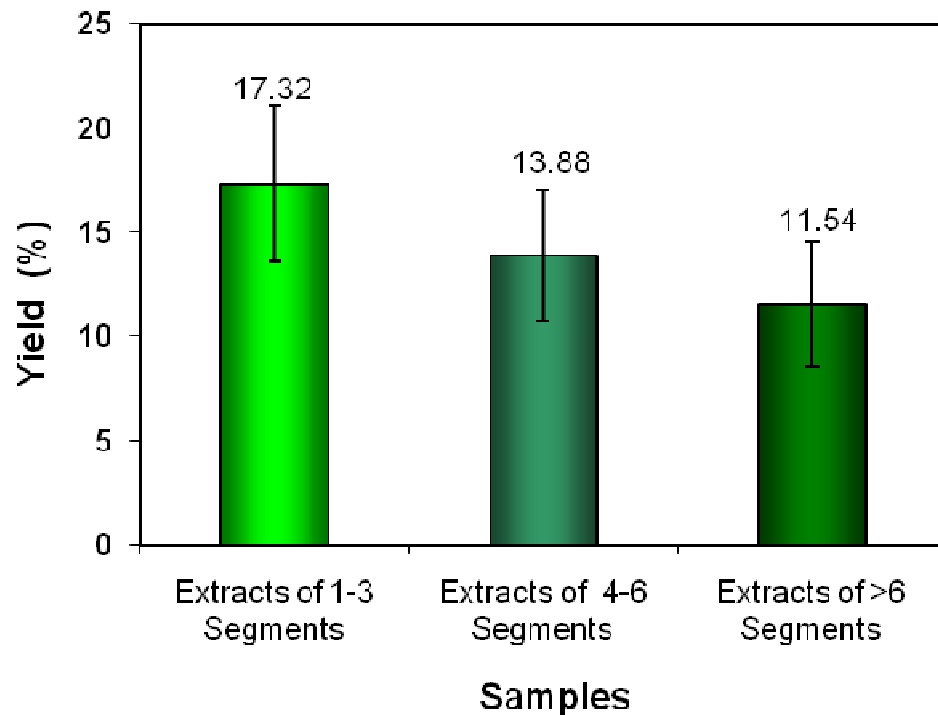
**Table 1 Total fitokimia dari tiap jenis daun beluntas**

Compounds	Jenis daun (ruas)		
	1-3	4-6	> 6
Saponin	-	-	-
Tannin	++++	+++	++
Triterpenoid	-	-	-
Sterol	++++	+++	++
Flavonoid	+++	++	+
Phenol hydroquinon	+	-	-
Alkaloid	-	-	-

Ket. : + menunjukkan intensitas warna, semakin banyak tanda positif menunjukkan semakin kuat warna

Fitokimia yang terdeteksi pada ekstrak daun beluntas meliputi: senyawa tanin, sterol, flavonoid dan fenol hidrokuinon, namun dengan intensitas yang berbeda (Tabel 1). Keberadaan senyawa tanin, sterol, flavonoid dan fenol hidrokuinon pada ekstrak daun beluntas masing-masing ditunjukkan oleh warna biru tua atau hijau kehitaman, hijau, merah dan merah (Harbone, 1996). Hal ini sesuai dengan pendapat Ardiansyah dkk. (2003) bahwa daun beluntas mengandung senyawa fitokimia, seperti: fenol hidrokuinon, sterol dan tanin. Menurut Traithip (2005) bahwa senyawa fitokimia yang terdapat pada ekstrak etanolik dan fraksi-fraksinya dari daun beluntas terdiri atas senyawa flavonoid dan polifenol.

Komposisi dan konsentrasi senyawa fitokimia mengalami perubahan selama pertumbuhan tanaman. Daun yang lebih muda mempunyai kandungan fitokimia paling tinggi (Bergquist dkk. 2005), hal ini terkait dengan fungsi dari senyawa metabolit sekunder tersebut, yaitu untuk pertahanan melawan herbivora, patogen, insekta, bakteri, jamur dan virus (Saffan dan El-Mousallamy 2008). Selain itu senyawa fitokimia dalam daun biasanya ditemukan dalam struktur bebas atau terikat secara glikosida, dengan bertambahnya tingkat ketuaan daun banyak ditemukan dalam struktur glikosida yang terdapat pada membran sel. Senyawa ini membentuk struktur yang kompleks dengan karbohidrat (glukosa, xilosa dan arabinosa) (Schaller, 2003; Boukes dkk., 2008).



**Gambar 3. Kadar rendemen dari tiap jenis daun beluntas**

### **Rendemen**

Gambar 3 menunjukkan bahwa rendemen terbesar diperoleh dari kelompok ruas daun 1-3 > 4-6 > >6. Data ini seiring dengan peningkatan intensitas warna pada uji fitokimia. Rendemen ditentukan setelah melewati ekstraksi pelarut dan soxhlet serta penghilangan residu pelarut. Rendemen yang diperoleh telah mengalami proses penghilangan lemak (*defatted*), karena pada ekstraksi pelarut digunakan petroleum eter. Rendemen yang diperoleh sangat ditentukan oleh tingkat kelarutan senyawa metabolit sekunder pada pelarut yang digunakan. Kelarutan senyawa sangat ditentukan oleh kepolaran, momen dipol, polarisabilitas dan ikatan hidrogen.

Pada ekstraksi soxhlet dipilih metanol daripada etanol, hal ini

dilakukan dengan pertimbangan metanol dapat mengekstrak senyawa fitokimia lebih banyak sehingga aktivitas antioksidan yang dihasilkan lebih tinggi (Akroum dkk. 2009). Menurut Yu Lin dkk. (2009) bahwa metanol dapat mengekstrak senyawa dengan berat molekul rendah, tingkat kepolaran sedang sebab sifat kelarutannya yang luas. Penggunaan pelarut yang berbeda pada ekstraksi daun beluntas dapat mengubah profil senyawa fenolik yang terdapat dalam sampel (Kahkonen dkk. 2001).

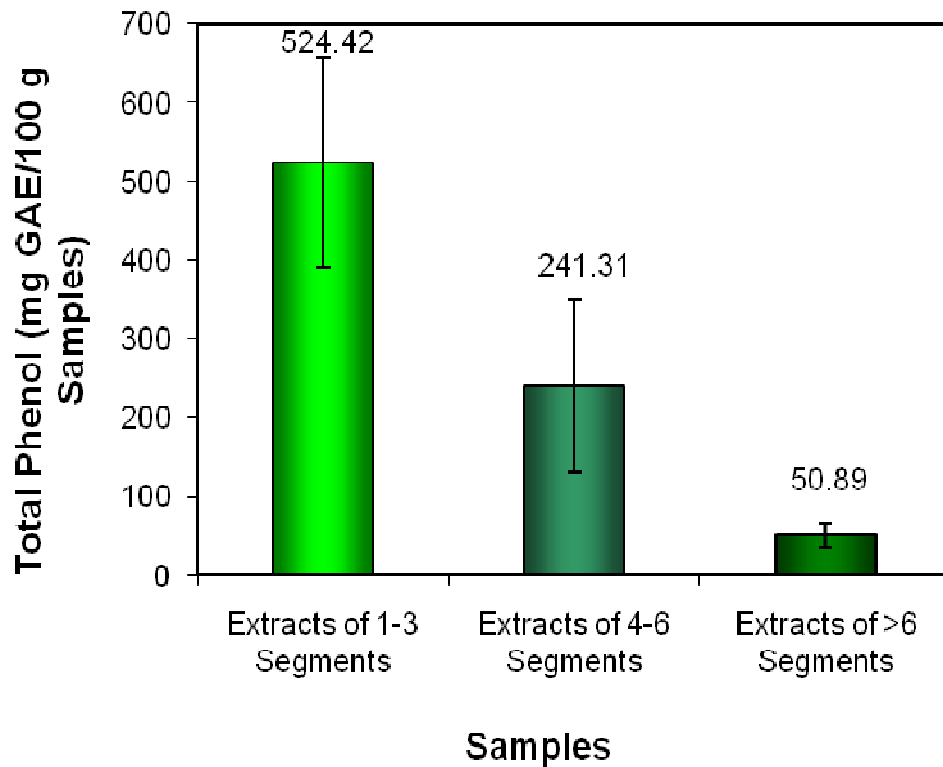
### **Total Fenol**

Hasil uji total fenol menyatakan bahwa semakin muda daun kadar total fenol semakin besar, hal ini terkait dengan fungsi fenol bagi tanaman sebagai pertahanan (Saffan dan El-Mousallamy 2008). Menurut Kahkonen



dkk. (2001) bahwa perbedaan tingkat kematangan buah berpengaruh pada profil fenolik, biasanya senyawa fenolik terkonsentrasi pada buah yang masih muda daripada buah yang tua, kecuali antosianin. Schaller (2003) dan Boukes dkk. (2008) berpendapat bahwa senyawa fenol yang ditemukan pada buah, bunga, daun dan biji mempunyai

struktur yang beragam dalam kondisi bebas atau terikat secara glikosida. Semakin tua umur daun struktur glikosida lebih banyak terkonsentrasi. Hampir 2-10 kali lipat senyawa metabolit sekunder (sterol) ada dalam struktur asil glikosida yang terdapat dalam membran sel.

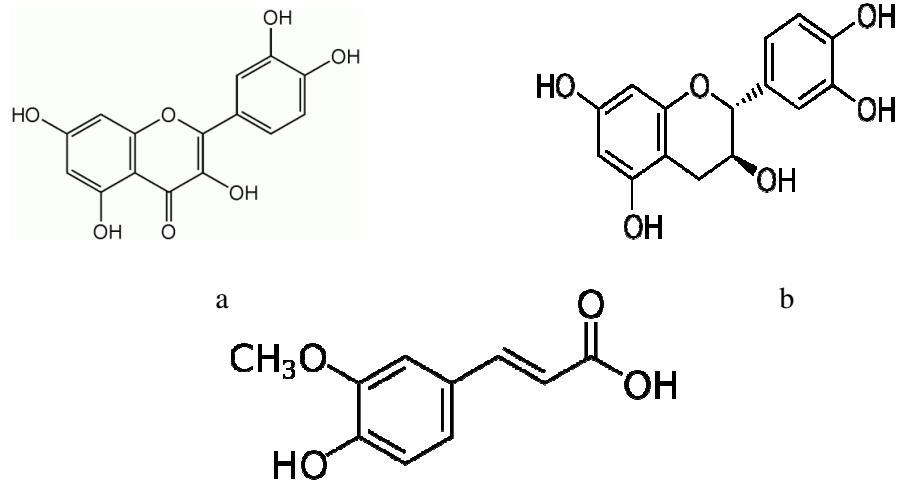


**Gambar 4. Total phenol tiap jenis daun beluntas**

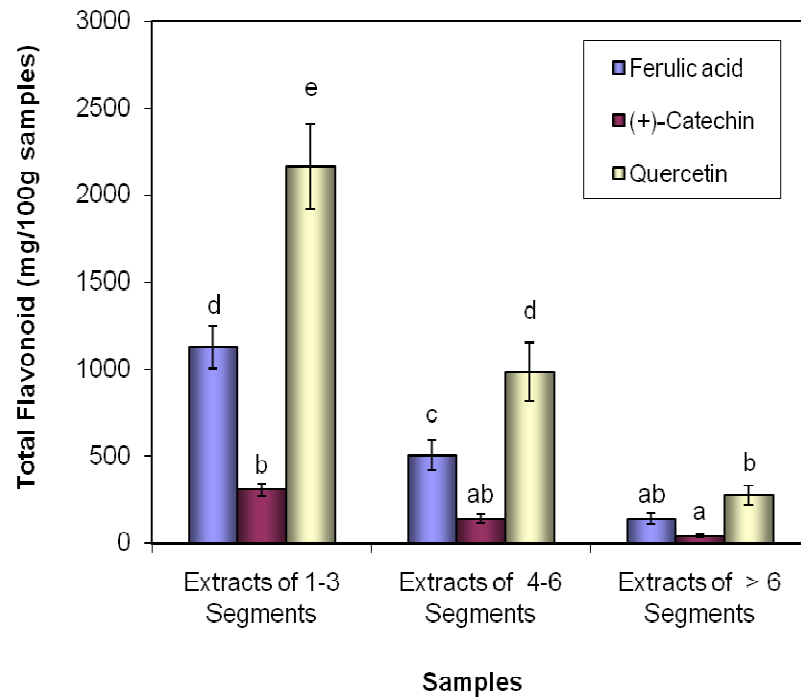
Pada pengujian dengan folin ciocalteus diperoleh hasil yang sangat dipengaruhi oleh struktur kimianya. Senyawa fenol yang mempunyai gugus fungsi hidroksil yang banyak atau dalam kondisi bebas akan dihasilkan kadar total fenol yang tinggi (Deore dkk. 2009). Hal ini disebabkan

kompleks warna ungu yang terdeteksi didasarkan pada reaksi transfer elektron dalam larutan alkali dari fenolik ke senyawa kompleks asam fosfotungstat /fosfomolibdat (Huang dkk. 2005).

**Total Flavonoid**



**Gambar 5. Structure of Standard compounds (a) quercetin (b) (+)-catechin (c) ferulic acid**



**Gambar 6. Total flavonoid dari tiap jenis daun beluntas**

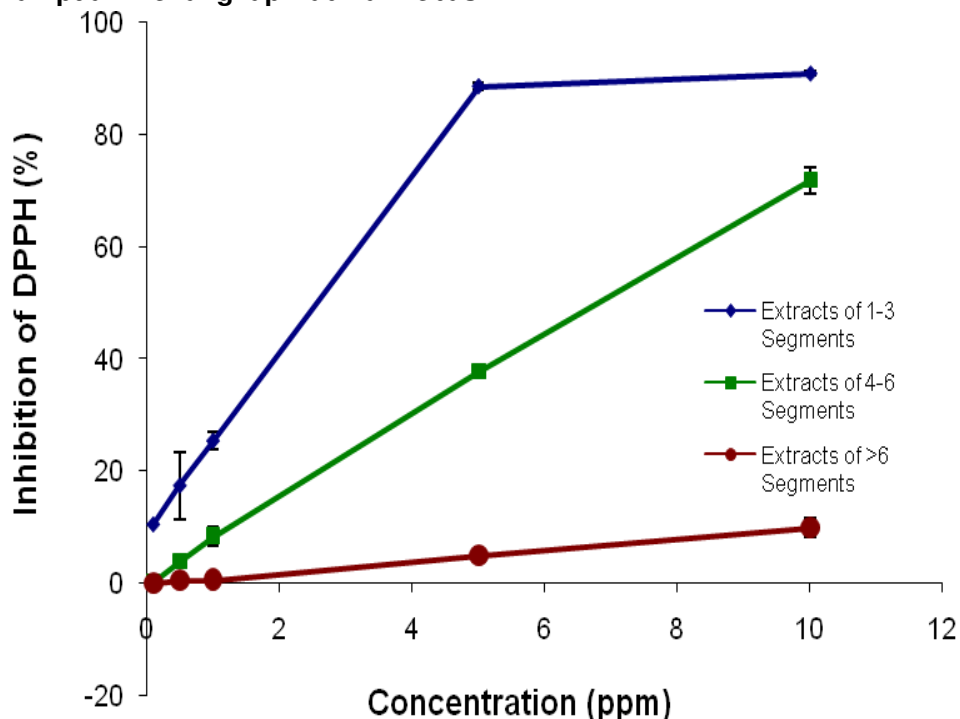
Pengujian total flavonoid pada berbagai tingkat ruas daun beluntas menunjukkan bahwa kadar total flavonoid ruas 1-3 > ruas 4-6 > ruas >6 pada berbagai senyawa standar (asam ferulat, (+)-katekin dan kuersetin) (Gambar 5). Total flavonoid ketiga sampel menunjukkan bahwa kadar total flavonoid daun beluntas dengan menggunakan standar kuersetin > asam ferulat > (+)-katekin (Gambar 6). Struktur senyawa standar menentukan reaktivitas terhadap reagen  $AlCl_3$  dan  $NaNO_2$  dalam kondisi basa kuat (NaOH), yang ditandai dengan terbentuknya kompleks warna antara orange hingga merah.

Kuersetin dipilih sebagai standar karena termasuk senyawa flavonol yaitu flavonoid yang paling efektif menangkap radikal bebas (radikal hidroksil, superoksida dan peroksil)

(Tapas dkk. 2008) serta menghambat berbagai reaksi oksidasi (Soeksmanto dkk. 2007), karena dapat menghasilkan radikal fenoksil yang terstabilkan oleh efek resonansi dari cincin aromatis (Yu Lin dkk. 2009).

Hal ini disebabkan senyawa flavonol mempunyai struktur (katekol) orthodihidroksi pada cincin B, ikatan rangkap pada atom C2-3 yang terkonjugasi dengan gugus fungsi C4-okso, gugus OH pada C3 di cincin C dan gugus OH pada C5 di cincin A (Lugasi dkk. 2003; Tapas dkk. 2008). Kombinasi gugus C3-OH dan C5-OH dengan C4-karbonil dan ikatan rangkap C2-C3 dapat meningkatkan aktivitas penangkap radikal bebas (Amic dkk. 2003).

#### Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH

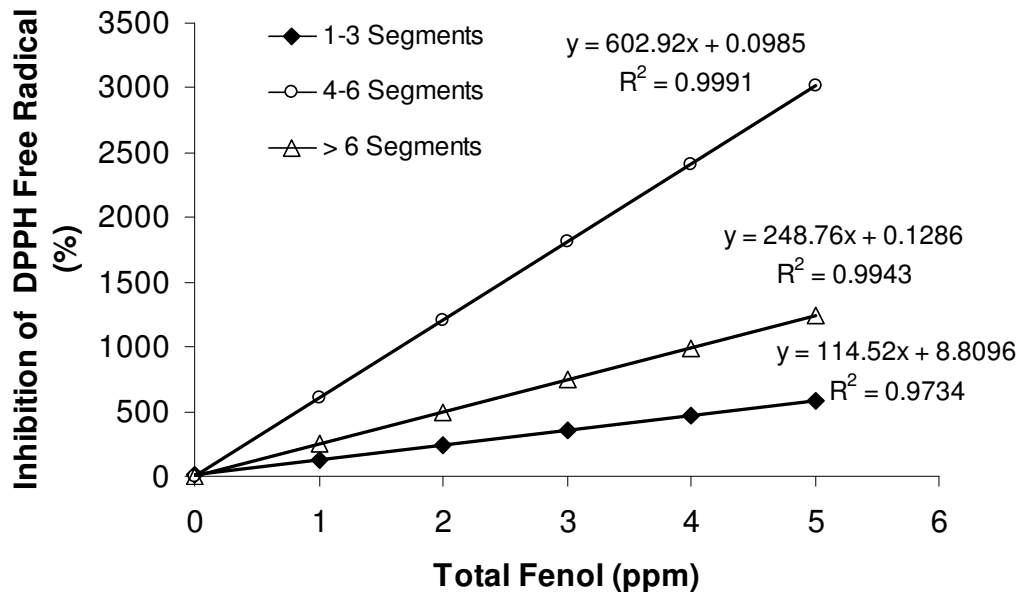


Gambar 7. Aktivitas menangkap radikal bebas DPPH dari tiap jenis daun beluntas

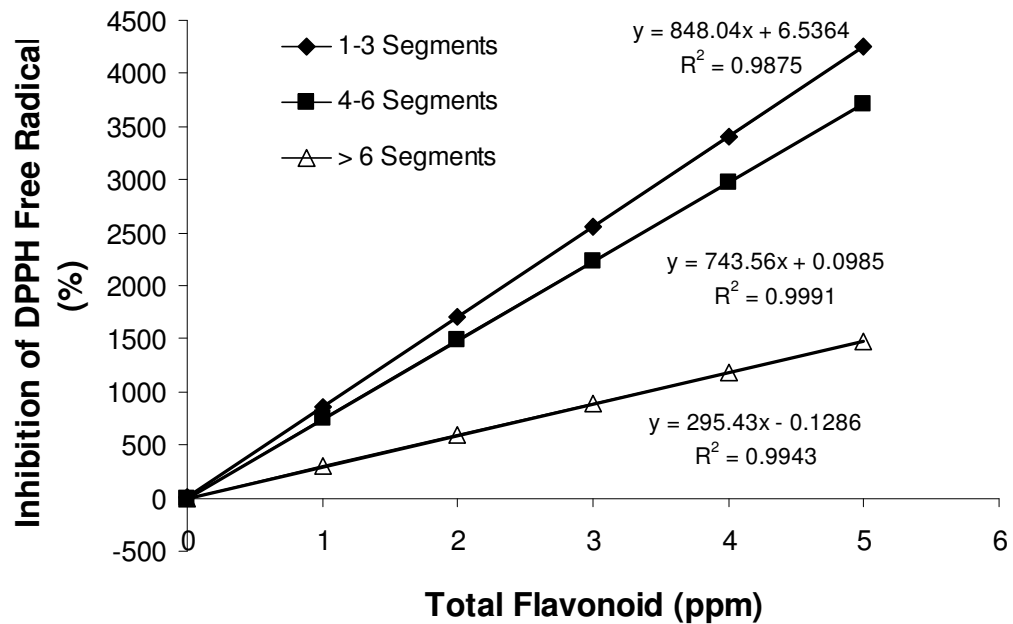
Hasil pengujian kemampuan menangkap radikal bebas DPPH dari ketiga kelompok ekstrak daun beluntas diperoleh bahwa ekstrak daun ruas 1-3> 4-6> >6 (Gambar 7). Hal ini ditunjukkan dari kemampuan masing-masing ekstrak dalam mereduksi warna ungu dari radikal bebas DPPH menjadi larutan yang berwarna kuning yang terdeteksi pada  $\lambda$  517 nm. Semakin besar potensi ekstrak daun beluntas menangkap radikal bebas DPPH semakin besar konsentrasi radikal DPPH yang tereduksi. Penurunan warna ungu disebabkan radikal DPPH menangkap atom hidrogen yang didonorkan oleh senyawa fenolik sehingga terbentuk senyawa difenil pikrilhidrasin berwarna kuning yang stabil (Chang dkk. 2007; Kim dkk. 2002).

Kapasitas menangkap radikal bebas DPPH sebagian besar terkait dengan gugus hidroksil dari senyawa fenol (Nakiboglu dkk. 2007). Aktivitas menangkap radikal bebas DPPH dipengaruhi oleh polaritas dari medium reaksi, struktur kimia dari penangkap radikal dan pH campuran reaksi (Sharma dan Bhat 2009).

Aktivitas antioksidan fenolik sangat ditentukan oleh struktur kimia, jumlah dan posisi gugus hidroksil dan metil pada cincin. Molekul tersubstitusi gugus hidroksil semakin banyak semakin kuat menangkap radikal bebas DPPH karena kemampuan mendonorkan atom hidrogen semakin besar (Yu Lin dkk. 2009). Struktur aglikon mempunyai aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan struktur glikosida (Li dkk. 2009).



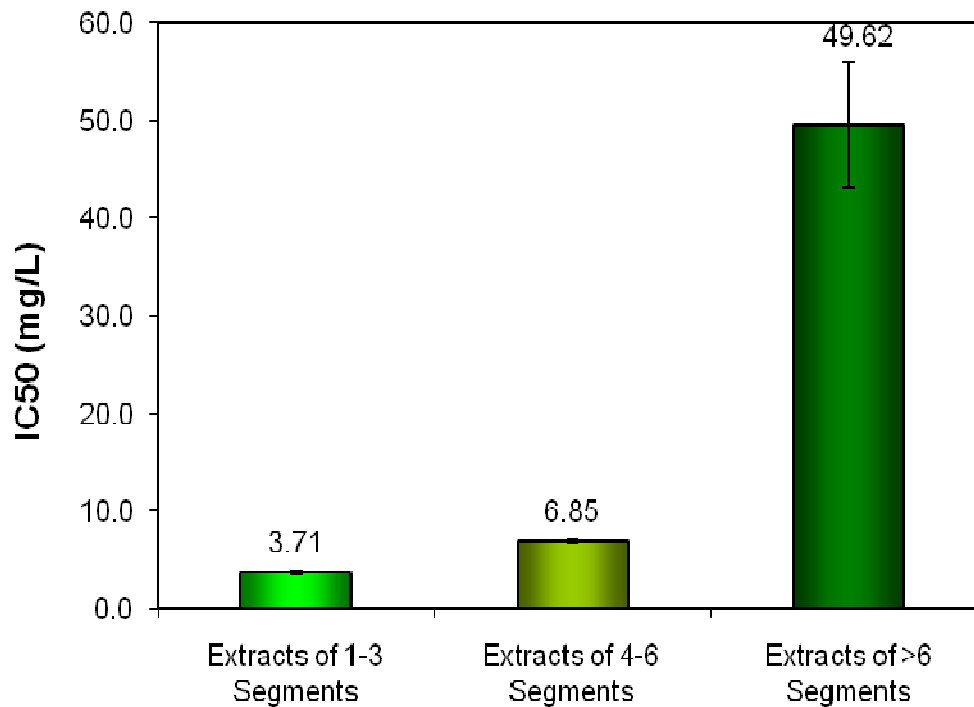
Gambar 8. Hubungan antara Total Phenol and Penghambatan radikal DPPH



**Gambar 9. Hubungan antara Total Flavonoid and penghambatan radikal DPPH**

Ada korelasi positif antara kadar total fenol dan total flavonoid dengan kemampuan menangkap radikal bebas DPPH ketiga sampel (Gambar 8 dan 9). Daun beluntas yang masih muda mempunyai aktivitas antiradikal lebih tinggi dibandingkan daun yang sudah tua. Kemampuan menangkap radikal

bebas merupakan salah satu mekanisme aksi utama antioksidan yang ditunjukkan oleh fitokimia fenolik. Oleh karena itu ekstrak sampel rempah-rempah yang mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi cenderung mempunyai kadar fenol total yang tinggi pula (Shan dkk. 2005).



### Samples

**Gambar 10. Nilai IC<sub>50</sub> tiap jenis daun beluntas**

Berdasarkan Gambar 10 dapat terlihat bahwa nilai IC<sub>50</sub> ketiga sampel tersebut sebagai berikut: ruas daun 1-3 sebesar 3,71 mg/L, ruas 4-6 sebesar 6,85 mg/L dan ruas >6 sebesar 49,62 mg/L. IC<sub>50</sub> adalah ukuran keefektifan suatu senyawa dalam menghambat fungsi biologis atau biokimia. Ukuran ini mengindikasikan banyaknya senyawa yang dibutuhkan untuk menghambat proses biologis menjadi setengahnya (50%). Semakin rendah nilai IC<sub>50</sub>nya maka semakin besar potensinya sebagai antioksidan (Kosuar dkk. 2004).

### KESIMPULAN

Ekstrak daun beluntas ketiga kelompok dari ruas daun beluntas yang meliputi : 1-3, 4-6 dan >6 mempunyai aktivitas menangkap radikal bebas DPPH. Ekstrak daun beluntas ini mengandung senyawa fitokimia seperti tanin, sterol, fenol hidrokuinon dan flavonoid.

Ekstrak daun beluntas dari ruas daun 1-3 yang paling berpotensi sebagai sumber antioksidan ditandai dengan nilai IC<sub>50</sub>nya paling kecil yaitu 3,71 mg/L dibandingkan ruas 4-6 dan >6 yang masing-masing sebesar 6,85 mg/L dan 49,62 mg/L. Kadar total fenol dan total flavonoid daun beluntas ruas daun 1-3 yaitu 234,65 mg GAE/100 g berat sampel kering dan 2163,59 mg QE/ 100 g berat sampel kering.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2-M Dirjen DIKTI atas biaya yang diberikan melalui dana Penelitian Hibah Bersaing 2008.

### DAFTAR PUSTAKA

Aicha, N. Ines, I. Ines, B. Mohamed, B.S. Jamila, H.S. Jemni, B.C. Mohamed, N. Daniel, B. Leila, G. dan Kamel, G. 2006. A Comparative Evaluation of Mutagenic, Antimutagenic and Scavenging Radicals Activity of

- Essential Oil from *Pituranthos Chloranthus*. *SIPAM* 362-371.
- Akroum, S. Satta, D. dan Lalaoui, K. 2009., Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Algerian Plants. *European Journal of Scientific Research* 31(2): 289-295.
- Amic, D. Davidovic-Amic, D. Bes'lo, D. dan Trinajstic, N. 2003., Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatia Chemical Acta* 76 : 55–61.
- Andarwulan, N. Batari, R. Sandrasari, D.A. dan Wijaya, H. 2008., Identifikasi senyawa flavonoid dan kapasitas antioksidannya pada ekstrak sayuran indigenous Jawa Barat. Di dalam : *Half Day Seminar on Natural Antioxidants: Chemistry, Biochemistry and Technology*, Bogor, 16 September 2008. Bogor: Biopharmaca Research Center-SEAFast Center IPB.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist 925.45. 1999. *Official methods of analysis of association of official analytical chemists*. Edition ke-15. USA : Kenneth Helrich. Chapter 44.1.03. p.2.
- Ardiansyah, Nuraida, L. Andarwulan, N. 2003., Aktivitas antimikroba daun beluntas (*Pluchea indica Less*) dan stabilitas aktivitasnya pada berbagai konsentrasi garam dan tingkat pH. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 14(2) : 90-97.
- Bergquist, S.A.M. Gertsson, U.E. Knuthsen, P. dan Olsson, M.E. 2005., Flavonoids in baby spinach (*spinacia oleracea l.*): changes during plant growth and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9459-9464.
- Biswas, R. Dasgupta, A. Mitra, A. Roy, S.K. Dutta, P.K. Achari, B. Dastidar, S.G. dan Chatterjee, T.K. 2005., Isolation, purification and characterization of four pure compounds from the root extract of *Pluchea indica Less* and the potentiality of the root extract and the pure compounds for antimicrobial activity. *European Bulletin of Drug Research* 13 : 63-70.
- Boukes, G.J. Venter, M.V.D. dan Oosthuizen, V. 2008. Quantitative and qualitative analysis of sterols/sterolins and hypoxoside contents of three *Hypoxis* (African potato) spp. *African Journal of Biotechnology* 7 (11): 1624-1629.
- Chang, H.Y. HO, Y.L. Sheu, M.J. Lin, Y.H. Tseng, M.C. Wu, S.H. Huang, G.J. dan Chang, Y.S. 2007., Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of *Phellinus merrillii* Extracts. *Botanical Studies* 48: 407-417.
- Chludil, H.D. Corbino, G.B. dan Leicarh, S.R. 2008., Soil Quality Effects on *Chenopodium album* Flavonoid Content and Antioxidant Potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 5050–5056.
- Deore, S.L. Khadabadi, S.S. Baviskar, B.A. Khadabadi, S.S. Khangenbam, R.A. Koli, U.S. Daga, N.P. Gadbail, P.A. dan Jain, P.A. 2009., In vitro Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Croton caudatum*. *International Journal of Chemical Technology Research* 1(2):174-176.
- Haeggkvist, M. dan Li, T.Q. 1998., Effects of Drying and Pressing on the Pore Structure in the Cellulose @bre Wall Studied By 1H and 2H NMR Relaxation. *Cellulose* 5: 33-49.
- Hagerman, A.E. Riedl, K.M. Jones, G.A. Sovik, K.N. Ritchard, N.T. Hartzfeld, P.W. dan Riechel, T.L. 2002., High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:1887-1892.

- Harbone, J.B. 1996., *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah, Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Hasan, S.M. R. Jamila, M. Majumder, M.M. Akter, R. Hossain, M.M. Mazumder, M.E.H. Alam, M.A. Jahangir, R. Rana, M.S. Arif, M. dan Rahman, S. 2009., Analgesic and Antioxidant Activity of the Hydromethanolic Extract of *Mikania scandens* (L.) Willd. Leaves. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 4 (1): 1-7.
- Huang, D. Ou, B. dan Prior, R.L. 2005., The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856.
- Jayasri, M.A. Mathew, L. dan Radha, A. 2009., A report on the antioxidant activity of leaves and rhizomes of *Costus pictus* D. Don. *International Journal Integrative Biology* 5(1) : 20-26.
- Kahkonen, M.P. Hopia, A.I. dan Heinonen. 2001., Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4076-4082.
- Kim, D.O. Lee, K.W. Lee, H.J. Lee, C.Y. 2002., Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3713-3717.
- Kosuar, M.B. Dorman, H.J.D. Basuer, K.H.C. dan Hiltunen R. 2004., Screening of Free Radical Scavenging Compounds in Water Extracts of *Mentha* Sampels Using a Postcolumn Derivatization Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5004-5010.
- Kumar, S. Kumar, D. Manjusha, Saroha, K. Singh, N. dan Vashishta, B. 2008., Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharmacology* 58 : 215–220.
- Kumaran, A. dan Karunakaran, R.J. 2007., In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT* 40 : 344–352.
- Li, C. Du, H. Wang, L.S.Shu, Q.Y. Zheng, Y. Xu, Y. Zhang, J.J. Zhang, J. Yang, R. dan Ge, Y. 2009., Flavonoid Composition and Antioxidant Activity of Tree Peony (*Paeonia* Section *Moutan*) Yellow Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 8496–8503.
- Luger, P. Weber, M. Dung, N.X.Ngoc, P.H., Tuong, D.T. dan Rang, D.D. 2000., The crystal structure of hop-17(21)-en-3 $\beta$ -yl asetat of *Pluchea pteropoda* Hemsl. from Vietnam. *Crystal Res Technology* 35(3) : 355-362.
- Magalhaes, L.M. Segundo, M.A. Reis, S. Lima, J.L.F.C. dan Rangel, A.O.S.S. 2006., Automatic method for the determination of folin-ciocalteu reducing capacity in food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5241-5246.
- Matricardi, M. Hesketh, R. dan Farrell, S. 2009., Effect of operating conditions on static/dynamic extraction of peanut oil using supercritical carbon dioxide. <http://www.Supercritical.com/publications/peanutoilextraction> by SF/ 1 November 2009
- Moein, S. Farzami, B. Khaghani, S. Moein, M.R. dan Larijani, B. 2007., Antioxidant properties and prevention of cell cytotoxicity of *Phlomis Persica* Boiss. *DARU* 15(2) : 83.
- Nakiboglu, M. Urek, R.O. Kayali, H.A. dan Tarhan, L. 2007., Antioxidant capacities of endemic *sideritis sipylea* and *origanum sipyleum* from turkey. *Food Chemistry* 104: 630–635.



- Orhan, I. Kartal, M. Asaker, M.A. Senol, F.S. Yilmaz, G. Sener, B. 2009., Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants. *Food Chemistry* 114 : 276–281.
- Pinelo, M. Tress, A.G. Pedersen, M. Amous, A. dan Meyer, A.S. 2007., Effect of Cellulases, solvent type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds. *American Journal of Food Technology* 2(7):641-651.
- Tapas, A. Sakarkar, D.M. dan Kakde, R.B. 2008., Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7(3) : 1089-1099.
- Traithip, A. 2005., *Phytochemistry and antioxidant activity of Pluchea indica*. [Thesis] Mahidol University. Thailand.
- Saffan, S.E.S. dan El-Mousallamy, A.M.D. 2008. Allelopathic effect of *Acacia raddiana* leaf extract on the phytochemical contents of germinated *Lupinus termis* Seeds. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(3): 270-277.
- Schaller, H. 2003. Review the role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research*, 42 (2003) 163–175.
- Sembiring, M.T. dan Sinaga, T.S. 2003. Arang aktif (Pengenalan dan Proses Pembuatannya), hal 1-9. USU digital library, Sumatera Utara.
- Shan, B. Cai, Y. Z. Sun, M. dan Corke, H. 2005., Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7749-7759.
- Sharma, O.P. dan Bhat, T.K. 2009., Analytical methods dpph antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113: 1202–1205.
- Soeksmanto, A. Hapsari, Y. dan Simanjuntak, P. 2007., Antioxidant content of parts of mahkota dewa, *Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl. (Thymelaceae). *Bioversitas* ISSN: 1412-033X. 8 (2): 92-95.
- Svedas, V. 1998., Cellulose-water vapour interaction investigated by spectrometric and ultra high frequency methods. *Journal of Physical D: Applied Physical* 31 : 1752-1756.
- Yu Lin, H. Kuo, Y.H. Lin, Y.L. dan Chiang, W. 2009., Antioxidative effect and active components from leaves of lotus (*Nelumbo nucifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6623–6629.

**EVALUASI AKTIVITAS ANTIOKSIDATIF EKSTRAK DAUN BELUNTAS  
(*Pluchea indica*) BERDASARKAN PERBEDAAN RUAS DAUN****(EVALUATION OF ANTIOXIDATIVE ACTIVITY FROM BELUNTAS LEAVES EXTRACT  
(*Pluchea indica* Less) BASED ON DIFFERENCE OF LEAF SEGMENT)****Paini Sri Widyawati<sup>1)</sup>, C. Hanny Wijaya<sup>2)</sup>, Peni Suprapti Hardjosworo<sup>3)</sup>,  
Dondin Sajuthi<sup>4)</sup>**

<sup>1)</sup> Fakultas Teknologi Pertanian - Unika Widya Mandala Surabaya  
Alamat : Jl Dinoyo 42-44 Surabaya, Email : wiewiedt@gmail.com

<sup>2)</sup> Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian IPB  
<sup>3)</sup> Fakultas Peternakan IPB

<sup>4)</sup> Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB

**Abstract**

*Beluntas (Pluchea indica Less) is a herb that commonly used as traditional medicine and food. Its leaves have many biological activities, because they contain various phenolic compounds. The phenol concentration of beluntas leaves depends on leaf segment, earth condition, fertilizer and environmental stress. This research is focused to determine antioxidant activity of three groups of beluntas leaf segments that includes 1-3, 4-6 and > 6. They were ground, dried at ambient temperature for 7 days, maserated by petroleum eter (1:4 b/v) at ambient temperature for 24 hours and soxhlet extracted by methanol (1:15 b/v) at 65°C for 3 hours. The result shows that the extract contains phytochemical compounds such as tannin, sterol, phenol hydroquinone and flavonoid. This extract has antioxidant activity to scavenging free radical DPPH (2,2-phenyl-1-picrylhydrazyl). The extract of 1-3 beluntas leaf segment was more potential antioxidant source than 4-6 and > 6 beluntas leaf segments, because it had the least IC<sub>50</sub> (inhibitor concentration) and the highest total phenol and total flavonoid. The IC<sub>50</sub>, total phenol and flavonoid total of it were 3.71 mg/L, 234.65 mg GAE/100 g samples and 2163.59 mg QE/ 100 g samples, respectively.*

**Key words :** *antioxidant activity, beluntas (Pluchea indica Less), phytochemical, total phenol, total flavonoid*

**Abstrak**

Beluntas (*Pluchea indica Less*) adalah tanaman herba yang umumnya digunakan sebagai obat tradisional dan pangan (lalapan). Daun beluntas mempunyai beberapa aktivitas biologi karena mengandung berbagai senyawa fenolik. Konsentrasi fenol dalam daun beluntas sangat bergantung pada ruas daun, kondisi tanah, tingkat kesuburan dan stress lingkungan. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas antioksidan dari ketiga kelompok dari ruas daun beluntas yang meliputi : 1-3, 4-6 dan >6. Daun beluntas yang sudah dipetik dari pekarangan, dikeringkan pada suhu 27 °C selama 7 hari, dimaserasi dengan petroleum eter (1:4 b/v) pada suhu kamar selama 24 jam dan diekstraksi soxhlet dengan metanol (1:15 b/v) pada suhu 65°C selama 3 jam. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa fitokimia seperti : tanin, sterol, fenol hidrokuinon dan flavonoid. Ekstrak ini mempunyai aktivitas antioksidan menangkap radikal bebas DPPH (2,2-phenyl-1-picrylhydrazyl). Ekstrak dari ruas daun beluntas 1-3 yang paling berpotensi sebagai sumber antioksidan dari ruas daun 4-6 dan >6, sebab ekstrak tersebut mempunyai nilai IC<sub>50</sub> (konsentrasi penghambatan) paling kecil dan kadar fenol total dan flavonoid total tertinggi. Nilai IC<sub>50</sub>, total fenol dan

total flavonoid dari ekstrak ruas daun beluntas 1-3 masing-masing sebesar 3.71 mg/L, 234.65 mg GAE (gallic acid equivalent)/100 g berat sampel kering dan 2163.59 mg QE (Quercetin equivalent)/100 g berat sampel kering.

Kata Kunci: aktivitas antioksidan, beluntas (*Pluchea indica Less*), fitokimia, fenol total, flavonoid total dan DPPH (2,2-fenil-1-pikrilhidrazil).

## PENDAHULUAN

Radikal bebas, seperti anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), radikal hidroksil ( $\bullet OH$ ) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dapat memicu kerusakan biomolekul potensial dalam makhluk hidup, seperti : lemak, protein dan asam nukleat, yang berakibat munculnya berbagai macam penyakit degeneratif. Keberadaan radikal bebas ini pada proses pengolahan pangan dapat mempengaruhi kualitas, stabilitas dan keamanan pangan (Chludil dkk. 2008)

Antioksidan adalah senyawa yang berada pada konsentrasi lebih rendah dari substratnya secara signifikan dapat menunda atau mencegah oksidasi (Moein dkk. 2007). Senyawa ini dapat menghentikan reaksi radikal bebas. Usaha pencarian antioksidan alami terus dilakukan untuk menggantikan antioksidan sintetis yang masih diragukan akan tingkat keamanannya (Orhan dkk. 2009).

Beluntas (*Pluchea indica Less*) merupakan tanaman perdu kelompok Asteraceae yang telah dikenal masyarakat sebagai lalapan dan obat tradisional (Ardiansyah dkk. 2003). Berbagai penelitian telah menyebutkan bahwa beluntas mengandung senyawa lignan, seskuiterpen, fenilpropanoid, benzoid, monoterpen, triterpen, sterol dan alkana (Luger dkk. 2000), akar mengandung stigmasterol (+ $\beta$ -sitosterol), stigmasterol glikosida (+ $\beta$ -sitosterol-glikosida), 2-(prop-1-unil)-5-(5,6-dihidroksi heksa-1,3-diunil)-thiofena dan (-)-katekin (Biswas dkk. 2005), sedangkan daun mengandung hidrokuinon, tanin, alkaloid dan sterol (Ardiansyah dkk. 2003), flavonol,

seperti : mirisetin, kuersetin dan kaemferol (Andarwulan dkk. 2008).

Senyawa fenolik, terutama flavonoid berfungsi melindungi tanaman dari herbivora dan penyakit (Hagerman 2002). Senyawa ini dapat menangkap radikal bebas, mereduksi, mendonorkan atom hidrogen dan meredam oksigen singlet (Kumaran dan Karunakaran 2007). Potensial antioksidan flavonoid tergantung pada karakteristik struktur seperti: jumlah dan pola substitusi gugus hidroksil dan jumlah gugus hidroksil yang tersubstitusi glikosida (Amic dkk. 2003). Kadar fenolik pada daun sangat dipengaruhi oleh tingkat umur daun, kondisi tanah, pemberian pupuk serta stress lingkungan baik secara fisik, biologi maupun kimiawi (Kahkonen dkk. 2001).

Metode analisa DPPH secara luas digunakan untuk menentukan potensi ekstrak tanaman berdasarkan kemampuan menangkap radikal bebas. DPPH merupakan radikal bebas sintetis yang stabil yang dapat mewakili radikal bebas sesungguhnya. Senyawa ini berwarna ungu jika dilarutkan dalam pelarut metanol (Huang dkk. 2005). Penggunaan metanol dapat menstabilkan radikal DPPH dibandingkan pelarut lain, seperti: etanol dan n-butanol (Sharma dan Bhat 2009). Selain itu radikal DPPH dapat larut hanya dalam media pelarut organik (Kim dkk. 2002).

Kemampuan menangkap radikal bebas DPPH sampel didasarkan pada kemampuan mereduksi radikal bebas yang ditandai dengan penurunan intensitas warna larutan ungu, karena DPPH menangkap atom hidrogen dari senyawa fenolik sehingga terbentuk senyawa difenil pikrilhidrasin berwarna

kuning yang stabil (Chang dkk. 2007; Kim dkk. 2002). Dekolorisasi radikal DPPH dapat terdeteksi pada  $\lambda$  515-517 nm (Hasan dkk. 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aktivitas antioksidatif ekstrak daun beluntas dari 3 kelompok ruas daun beluntas, yaitu ruas daun 1-3, 4-6 dan >6, melalui pengujian fitokimia, total fenol total flavonoid dan kemampuan menangkap radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).

## METODOLOGI

### Bahan Penelitian

Bahan baku yang digunakan adalah daun beluntas yang diperoleh dari daerah Dramaga, Bogor. Bahan kimia untuk analisis terdiri atas : petroleum eter metanol akuades pereaksi Dragendoff Mayer dan Wagner klorofor, asam gallat (Riedel-de Haen), kuersetin dan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, dll

### Metode Penelitian

#### Proses Penyiapan Ekstrak Daun Beluntas

Daun beluntas pada penelitian ini dikelompokkan menjadi 3, yaitu : ruas daun 1-3, 4-6 dan >6 (Gambar 1). Pengelompokan didasarkan pada perbedaan warna dan tekstur daun. Masing-masing ruas diekstraksi menurut modifikasi metode Biswas dkk. (2005)

Daun beluntas yang telah dikeringkan pada suhu kamar selama 7 hari ditepungkan dengan ukuran 40 mesh, lalu dianalisis kadar air dan fitokimianya. Kemudian tepung daun kering tersebut dimaserasi dengan petroleum eter (1:4 b/v) pada suhu kamar selama 24 jam. Residu yang sudah dipisahkan dari pelarutnya dengan cara disaring dikeringkan pada suhu kamar ( $\pm$  15 menit). Selanjutnya residu yang sudah kering diekstrak dengan metanol (1:15b/v) menggunakan ekstraksi soxhlet pada suhu 65°C selama 3 jam. Pelarut metanol diuapkan dengan rotary evaporator. Ekstrak yang

diperoleh disimpan pada suhu 4°C dan gelap sampai analisa berikutnya.

Analisis meliputi kadar air ditentukan berdasarkan metode AOAC 925.45 (1999), analisa fitokimia dilakukan berdasarkan metode Harborne (1996) yang meliputi: alkaloid, flavonoid, fenolik, triterpenoid, sterol, saponin dan tanin.

### Analisa Alkaloid

1 gram sampel digiling dengan pasir sambil dibasahi dengan 5 ml kloroform yang berisi 3 tetes ammonia. Tambahkan lagi 5 ml kloroform yang berisi 5 tetes ammonia, kemudian saring ke dalam tabung reaksi. Ekstrak kloroform ditambahkan 10 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M dan divorteks, kemudian dipisahkan lapisan asamnya ke dalam tabung reaksi lain. Lapisan tersebut diteteskan pada *spot plate* dan ditambahkan 3 pereaksi Dragendoff, Mayer dan Wagner, uji keberadaan alkaloid positif jika timbul endapan dengan warna berturut-turut sebagai berikut : merah jingga, putih dan coklat.

### Deteksi Senyawa Flavonoid dan Fenolik

Sebanyak 0.1 gram sampel ditambahkan metanol sampai semua sampel terendam, kemudian dipanaskan. Larutan dipipet dan diteteskan pada 2 *spot plate* masing-masing 5 tetes. Pada *spot plate* pertama ditambahkan NaOH 10% (b/v), timbulnya warna merah menandakan positif senyawa fenol hidrokuinon. Pada *spot plate* kedua ditambahkan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, timbulnya warna merah menandakan positif senyawa flavonoid.

### Deteksi Triterpenoid dan Sterol

Sebanyak 0,1 gram sampel ditambahkan etanol dan dipanaskan lalu disaring. Filtrat diuapkan dan ditambahkan eter. Lapisan eter yang terbentuk dipipet dan diteteskan pada *spot plate* lalu ditambahkan pereaksi LB

(3 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Adanya triterpenoid ditandai dengan timbulnya warna merah atau ungu, sedangkan adanya sterol ditandai dengan adanya warna hijau.

#### **Deteksi Flavonoid, Saponin dan Tanin**

Sebanyak 0,1 gram sampel dimasukkan dalam gelas piala lalu ditambahkan 10 ml air panas dan dididihkan selama 5 menit. Kemudian masing-masing 3 ml larutan dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi. Tabung pertama dimasukkan serbuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat dan amil alkohol. Campuran dikocok dan dibiarkan memisah, adanya flavonoid ditunjukkan adanya warna merah coklat pada lapisan amil alkohol. Pada tabung reaksi kedua dilakukan pengocokan secara vertikal selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit. Adanya busa yang stabil menunjukkan adanya saponin, sedangkan sisa campuran dididihkan lagi selama 10 menit lalu disaring. Filtrat ditambahkan dengan beberapa ml larutan FeCl<sub>3</sub> 1 % (b/v). Timbulnya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

#### **Penentuan Rendemen**

Ekstrak daun beluntas yang diperoleh ditentukan rendemennya dengan tujuan untuk mengetahui tingkat keefektifan metode ekstraksi. Rendemen yang diperoleh ditentukan berdasarkan metode gravimetri berdasarkan metode Ljubuncic *et al.* (2005), dengan cara membandingkan berat ekstrak daun beluntas terhadap berat sampel yang digunakan, sehingga diperoleh persen ekstrak (b/b).

#### **Kadar Total Fenol**

Kadar total fenol ditentukan berdasarkan metode Kumar dkk. (2008) dan Jayasri dkk. (2009). 1 ml sampel ditambahkan 4 ml larutan natrium karbonat (75g/L) kemudian divorteks dan ditambahkan 0,2 ml reagen Folin-ciocalteus fenol. Selanjutnya campuran

ditambahkan akuades hingga volume 10 ml dan divorteks kembali. Setelah sampel dibiarkan selama 1 jam diukur pada  $\lambda$  760 nm. Kadar fenol total dinyatakan ekuivalen asam gallat (GAE).

#### **Kadar Total Flavonoid**

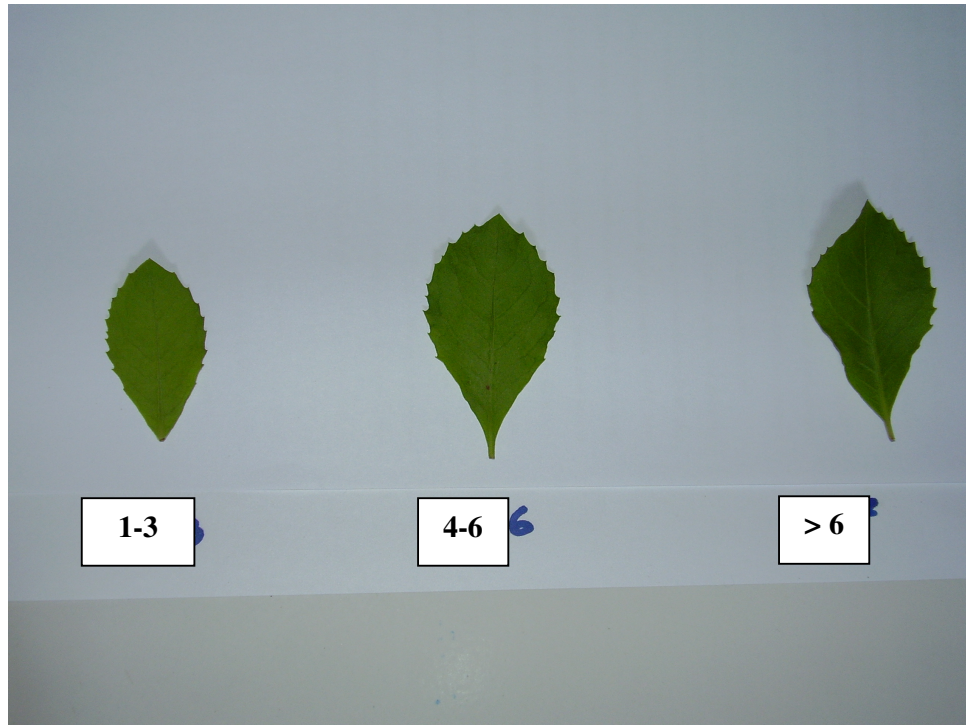
Kadar total flavonoid ditentukan berdasarkan metode Kumar dkk. (2008). 1 ml sampel dimasukkan dalam labu takar 10 ml yang berisi 4 ml akuades dan ditambahkan 0,3 ml larutan NaNO<sub>2</sub> 5% (b/v). Sesudah 5 menit ditambahkan 0,3 ml larutan AlCl<sub>3</sub> 10% (b/v), lalu sesudah 6 menit ditambahkan 2 ml larutan 1 mol/L NaOH dan diencerkan hingga volume 10 ml dengan akuades. Absorbansi larutan diukur pada  $\lambda$  510 nm. Kadar flavonoid total dinyatakan ekuivalen kuersetin (QE).

#### **Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH**

Aktivitas antioksidan sampel diukur berdasarkan modifikasi metode Aicha dkk. (2006). 1 ml sampel pada berbagai variasi konsentrasi dalam pelarut metanol ditambahkan 3 ml larutan DPPH (60 $\mu$ M) dan metanol hingga volume 10 ml. Absorbansi larutan diukur pada  $\lambda$  517 nm setelah 30 menit menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kemampuan menghambat radikal bebas DPPH dinyatakan dengan rumus : % penghambatan =  $(A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%$ , Keterangan : A<sub>0</sub> adalah absorbansi kontrol pada saat t = 0 detik dan A<sub>t</sub> adalah absorbansi antioksidan pada saat t = 30 detik.

#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Tingkat ketuaan daun beluntas menentukan kadar fitokimia, oleh karena itu dilakukan pengelompokan daun menjadi 3, yaitu : ruas daun 1-3, 4-6 dan >6. Pembagian didasarkan pada perbedaan kenampakan daun (warna dan tekstur). Semakin tua daun warnanya semakin hijau tua dan teksturnya semakin keras karena jaringan /selulosanya semakin banyak.



**Gambar 1. Pengelompokan daun beluntas yang diteliti (1-3 ruas, 4-6 ruas dan lebih dari 6 ruas)**

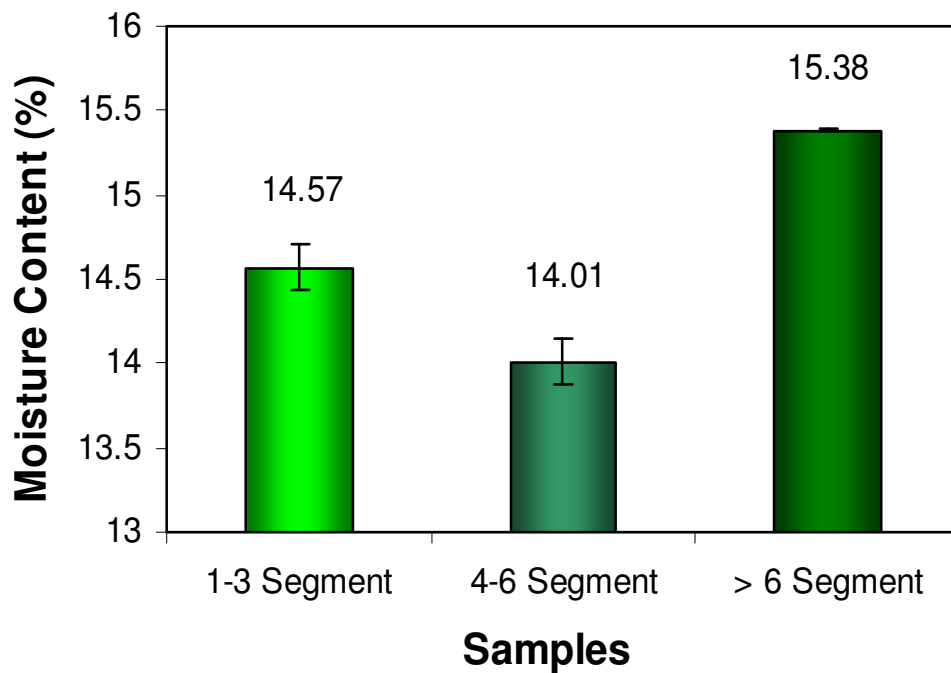
#### **Kadar Air**

Ketiga kelompok sampel yang sudah dikeringkan pada suhu kamar ditepungkan untuk mendapatkan partikel 40 mesh. Perlakuan ini dimaksudkan untuk memperluas permukaan kontak antara partikel daun dengan pelarut sehingga hasil ekstraksi yang diperoleh maksimal.

Berdasarkan Matricardi dkk. (2009) bahwa reduksi ukuran partikel pada biji kacang tanah menunjukkan efek yang positif terhadap ekstraksi. Ukuran partikel semakin kecil akan menyebabkan peningkatan luas permukaan dan jumlah sel yang rusak yang berakibat peningkatan konsentrasi minyak yang dihasilkan. Selama ekstraksi difusi yang terjadi pada

partikel relatif kecil, sehingga jumlah minyak yang terekstrak sebanding dengan luas permukaan partikel. Penurunan ukuran partikel dari 3,35-4,75 mm menjadi 0,86-1,19 mm, total minyak yang dihasilkan meningkat sebesar 36%- 82%.

Menurut Pileo dkk. (2007) bahwa reduksi ukuran partikel pada biji kopi secara signifikan berpengaruh positif terhadap fenol yang terekstrak. Reduksi ukuran partikel yang berlebihan menyebabkan terbentuknya fenomena pelapisan dan cara yang disukai oleh pelarut sehingga membatasi efisiensi pembasahan pelarut terhadap sampel dan menurunkan efisiensi ekstraksi.



**Gambar 2. Kadar kelembaban dari tiap jenis daun**

Penentuan kadar air tepung daun beluntas ditentukan dengan oven vakum suhu 70°C, hal ini dilakukan dengan pertimbangan untuk meminimalkan kesalahan kadar air yang terukur karena hilangnya sejumlah senyawa volatil (kelompok terpen), seperti : boehmeril asetat, HOP-17 (21)-en 3 $\beta$ -asetat, linaloil glukosida, linaloil apiosil glukosida, linaloil hidroksi glukosida, plusheosida C, cuauhthermone, 3-(2'-3'-diasetoksi-2'metil-butiril), plucheol A, plucheol B, plucheosida A, plucheosida B, plucheosida E dan pterocarptriol (Traithip 2005), seskuisterpen, monoterpen dan triterpen (Luger dkk. 2000).

Kadar air sampel daun beluntas mengalami penurunan seiring dengan

bertambahnya usia/ketuaan daun, karena terjadi peningkatan jumlah komponen daun (jaringan/serat). Penyimpangan kadar air pada ruas >6 disebabkan adanya penyerapan air kembali oleh jaringan/serat pada tepung daun yang kering. Selama proses pengeringan kadar air daun beluntas mengalami penurunan sehingga terjadi pengkerutan ukuran pori dan distribusi ukuran pori saling mendekat (Haeggkvist dkk. 1998). Kemampuan adsorpsi air oleh selulosa atau serat disebabkan adanya interaksi antara gugus hidroksil dengan molekul air dari udara (Svedas 1998). Menurut Sembiring dan Sinaga (2003) bahwa kemampuan adsorpsi air oleh adsorben ditentukan adanya pori yang dapat meningkatkan luas permukaan adsorben.

**Table 1 Total fitokimia dari tiap jenis daun beluntas**

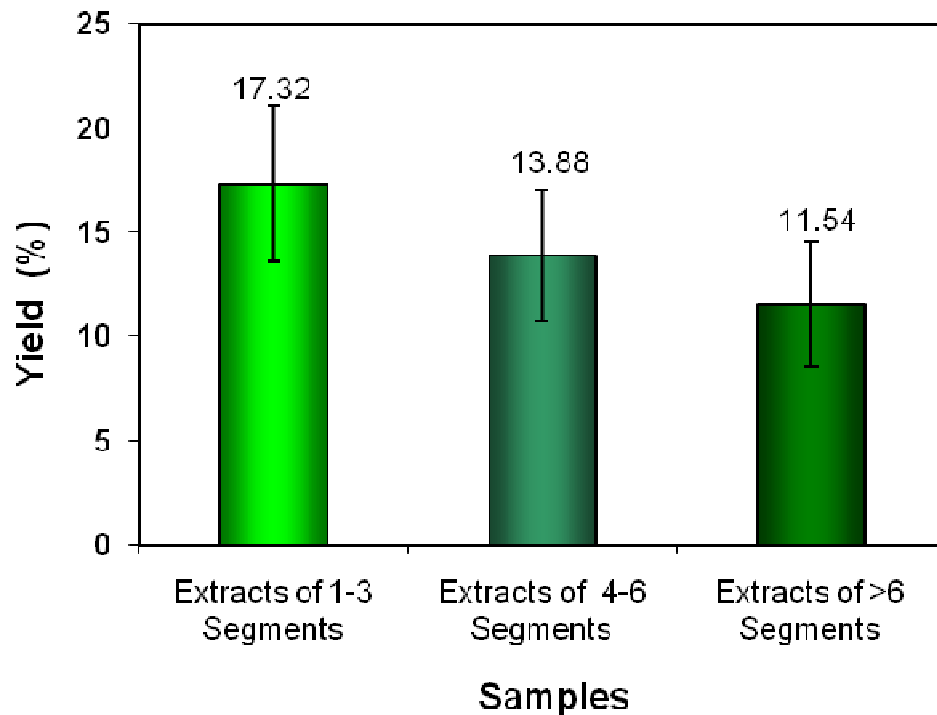
Compounds	Jenis daun (ruas)		
	1-3	4-6	> 6
Saponin	-	-	-
Tannin	++++	+++	++
Triterpenoid	-	-	-
Sterol	++++	+++	++
Flavonoid	+++	++	+
Phenol hydroquinon	+	-	-
Alkaloid	-	-	-

Ket. : + menunjukkan intensitas warna, semakin banyak tanda positif menunjukkan semakin kuat warna

Fitokimia yang terdeteksi pada ekstrak daun beluntas meliputi: senyawa tanin, sterol, flavonoid dan fenol hidrokuinon, namun dengan intensitas yang berbeda (Tabel 1). Keberadaan senyawa tanin, sterol, flavonoid dan fenol hidrokuinon pada ekstrak daun beluntas masing-masing ditunjukkan oleh warna biru tua atau hijau kehitaman, hijau, merah dan merah (Harbone, 1996). Hal ini sesuai dengan pendapat Ardiansyah dkk. (2003) bahwa daun beluntas mengandung senyawa fitokimia, seperti: fenol hidrokuinon, sterol dan tanin. Menurut Traithip (2005) bahwa senyawa fitokimia yang terdapat pada ekstrak etanolik dan fraksi-fraksinya dari daun beluntas terdiri atas senyawa flavonoid dan polifenol.

Komposisi dan konsentrasi senyawa fitokimia mengalami perubahan selama pertumbuhan tanaman. Daun yang lebih muda mempunyai kandungan fitokimia paling tinggi (Bergquist dkk. 2005), hal ini terkait dengan fungsi dari senyawa metabolit sekunder tersebut, yaitu untuk pertahanan melawan herbivora, patogen, insekta, bakteri, jamur dan virus (Saffan dan El-Mousallamy 2008). Selain itu senyawa fitokimia dalam daun biasanya ditemukan dalam struktur bebas atau terikat secara glikosida, dengan bertambahnya tingkat ketuaan daun banyak ditemukan dalam struktur glikosida yang terdapat pada membran sel. Senyawa ini membentuk struktur yang kompleks dengan karbohidrat (glukosa, xilosa dan arabinosa) (Schaller, 2003; Boukes dkk., 2008).





**Gambar 3. Kadar rendemen dari tiap jenis daun beluntas**

### Rendemen

Gambar 3 menunjukkan bahwa rendemen terbesar diperoleh dari kelompok ruas daun 1-3 > 4-6 > >6. Data ini seiring dengan peningkatan intensitas warna pada uji fitokimia. Rendemen ditentukan setelah melewati ekstraksi pelarut dan soxhlet serta penghilangan residu pelarut. Rendemen yang diperoleh telah mengalami proses penghilangan lemak (*defatted*), karena pada ekstraksi pelarut digunakan petroleum eter. Rendemen yang diperoleh sangat ditentukan oleh tingkat kelarutan senyawa metabolit sekunder pada pelarut yang digunakan. Kelarutan senyawa sangat ditentukan oleh kepolaran, momen dipol, polarisabilitas dan ikatan hidrogen.

Pada ekstraksi soxhlet dipilih metanol daripada etanol, hal ini

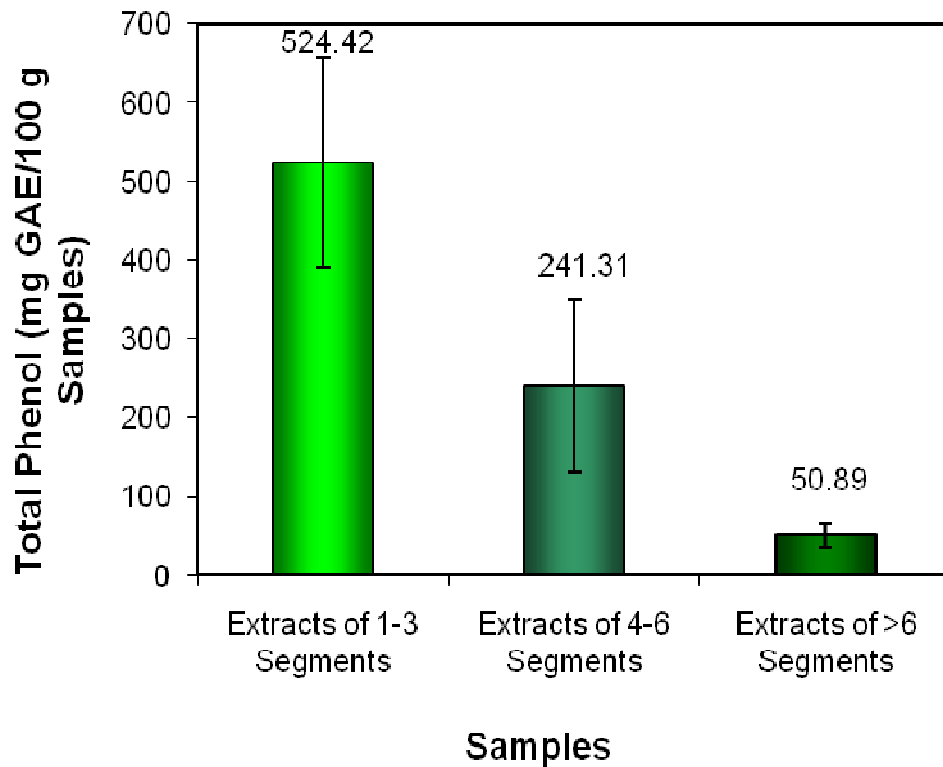
dilakukan dengan pertimbangan metanol dapat mengekstrak senyawa fitokimia lebih banyak sehingga aktivitas antioksidan yang dihasilkan lebih tinggi (Akroum dkk. 2009). Menurut Yu Lin dkk. (2009) bahwa metanol dapat mengekstrak senyawa dengan berat molekul rendah, tingkat kepolaran sedang sebab sifat kelarutannya yang luas. Penggunaan pelarut yang berbeda pada ekstraksi daun beluntas dapat mengubah profil senyawa fenolik yang terdapat dalam sampel (Kahkonen dkk. 2001).

### Total Fenol

Hasil uji total fenol menyatakan bahwa semakin muda daun kadar total fenol semakin besar, hal ini terkait dengan fungsi fenol bagi tanaman sebagai pertahanan (Saffan dan El-Mousallamy 2008). Menurut Kahkonen

dkk. (2001) bahwa perbedaan tingkat kematangan buah berpengaruh pada profil fenolik, biasanya senyawa fenolik terkonsentrasi pada buah yang masih muda daripada buah yang tua, kecuali antosianin. Schaller (2003) dan Boukes dkk. (2008) berpendapat bahwa senyawa fenol yang ditemukan pada buah, bunga, daun dan biji mempunyai

struktur yang beragam dalam kondisi bebas atau terikat secara glikosida. Semakin tua umur daun struktur glikosida lebih banyak terkonsentrasi. Hampir 2-10 kali lipat senyawa metabolit sekunder (sterol) ada dalam struktur asil glikosida yang terdapat dalam membran sel.

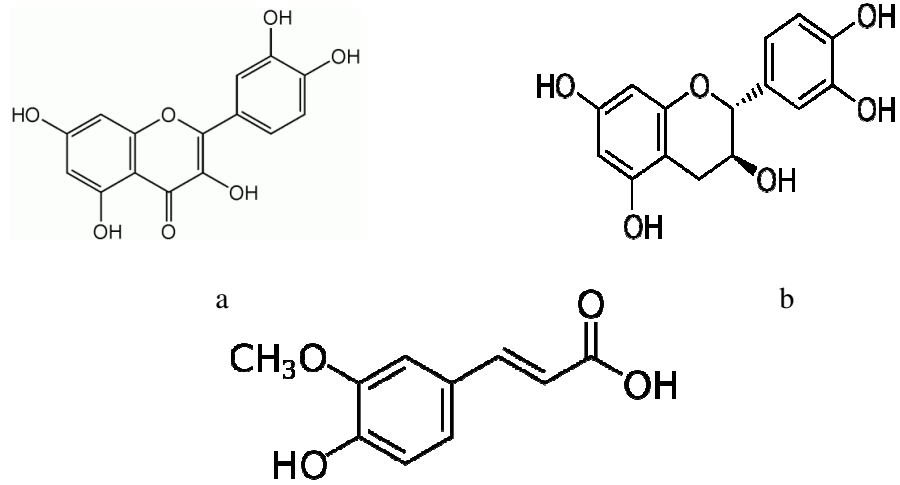


**Gambar 4. Total phenol tiap jenis daun beluntas**

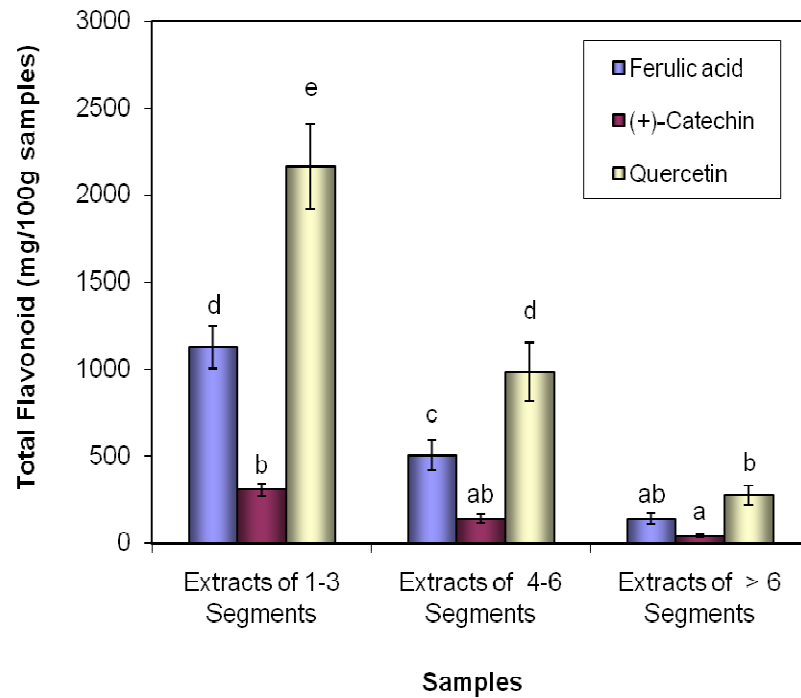
Pada pengujian dengan folin ciocalteus diperoleh hasil yang sangat dipengaruhi oleh struktur kimianya. Senyawa fenol yang mempunyai gugus fungsi hidroksil yang banyak atau dalam kondisi bebas akan dihasilkan kadar total fenol yang tinggi (Deore dkk. 2009). Hal ini disebabkan

kompleks warna ungu yang terdeteksi didasarkan pada reaksi transfer elektron dalam larutan alkali dari fenolik ke senyawa kompleks asam fosfotungstat /fosfomolibdat (Huang dkk. 2005).

**Total Flavonoid**



**Gambar 5. Structure of Standard compounds (a) quercetin (b) (+)-catechin (c) ferulic acid**



**Gambar 6. Total flavonoid dari tiap jenis daun beluntas**

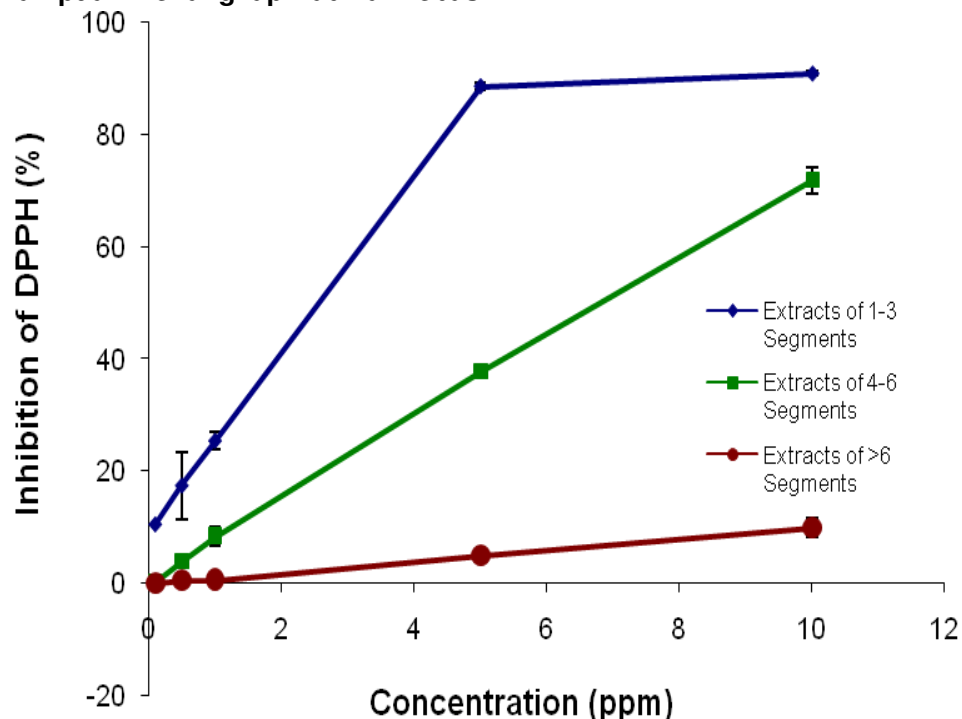
Pengujian total flavonoid pada berbagai tingkat ruas daun beluntas menunjukkan bahwa kadar total flavonoid ruas 1-3 > ruas 4-6 > ruas >6 pada berbagai senyawa standar (asam ferulat, (+)-katekin dan kuersetin) (Gambar 5). Total flavonoid ketiga sampel menunjukkan bahwa kadar total flavonoid daun beluntas dengan menggunakan standar kuersetin > asam ferulat > (+)-katekin (Gambar 6). Struktur senyawa standar menentukan reaktivitas terhadap reagen  $AlCl_3$  dan  $NaNO_2$  dalam kondisi basa kuat (NaOH), yang ditandai dengan terbentuknya kompleks warna antara orange hingga merah.

Kuersetin dipilih sebagai standar karena termasuk senyawa flavonol yaitu flavonoid yang paling efektif menangkap radikal bebas (radikal hidroksil, superoksida dan peroksil)

(Tapas dkk. 2008) serta menghambat berbagai reaksi oksidasi (Soeksmanto dkk. 2007), karena dapat menghasilkan radikal fenoksil yang terstabilkan oleh efek resonansi dari cincin aromatis (Yu Lin dkk. 2009).

Hal ini disebabkan senyawa flavonol mempunyai struktur (katekol) orthodihidroksi pada cincin B, ikatan rangkap pada atom C2-3 yang terkonjugasi dengan gugus fungsi C4-okso, gugus OH pada C3 di cincin C dan gugus OH pada C5 di cincin A (Lugasi dkk. 2003; Tapas dkk. 2008). Kombinasi gugus C3-OH dan C5-OH dengan C4-karbonil dan ikatan rangkap C2-C3 dapat meningkatkan aktivitas penangkap radikal bebas (Amic dkk. 2003).

#### Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH

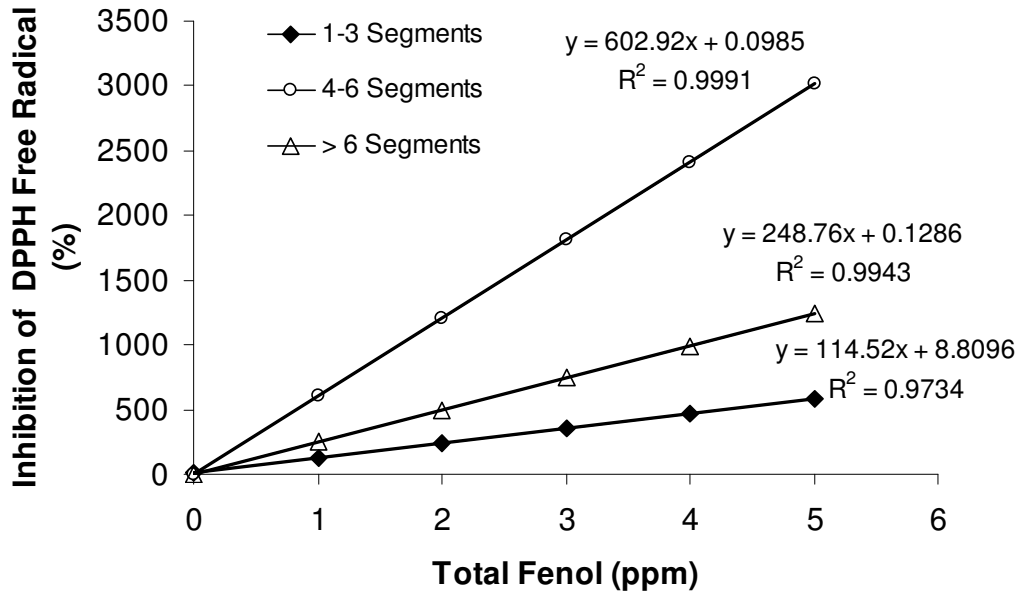


Gambar 7. Aktivitas menangkap radikal bebas DPPH dari tiap jenis daun beluntas

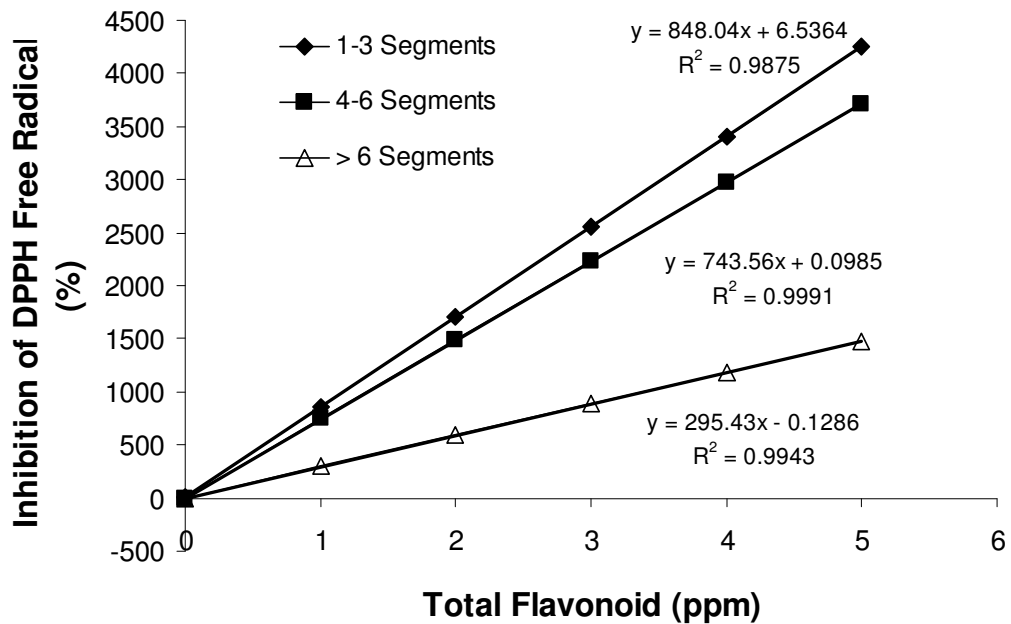
Hasil pengujian kemampuan menangkap radikal bebas DPPH dari ketiga kelompok ekstrak daun beluntas diperoleh bahwa ekstrak daun ruas 1-3> 4-6> >6 (Gambar 7). Hal ini ditunjukkan dari kemampuan masing-masing ekstrak dalam mereduksi warna ungu dari radikal bebas DPPH menjadi larutan yang berwarna kuning yang terdeteksi pada  $\lambda$  517 nm. Semakin besar potensi ekstrak daun beluntas menangkap radikal bebas DPPH semakin besar konsentrasi radikal DPPH yang tereduksi. Penurunan warna ungu disebabkan radikal DPPH menangkap atom hidrogen yang didonorkan oleh senyawa fenolik sehingga terbentuk senyawa difenil pikrilhidrasin berwarna kuning yang stabil (Chang dkk. 2007; Kim dkk. 2002).

Kapasitas menangkap radikal bebas DPPH sebagian besar terkait dengan gugus hidroksil dari senyawa fenol (Nakiboglu dkk. 2007). Aktivitas menangkap radikal bebas DPPH dipengaruhi oleh polaritas dari medium reaksi, struktur kimia dari penangkap radikal dan pH campuran reaksi (Sharma dan Bhat 2009).

Aktivitas antioksidan fenolik sangat ditentukan oleh struktur kimia, jumlah dan posisi gugus hidroksil dan metil pada cincin. Molekul tersubstitusi gugus hidroksil semakin banyak semakin kuat menangkap radikal bebas DPPH karena kemampuan mendonorkan atom hidrogen semakin besar (Yu Lin dkk. 2009). Struktur aglikon mempunyai aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan struktur glikosida (Li dkk. 2009).



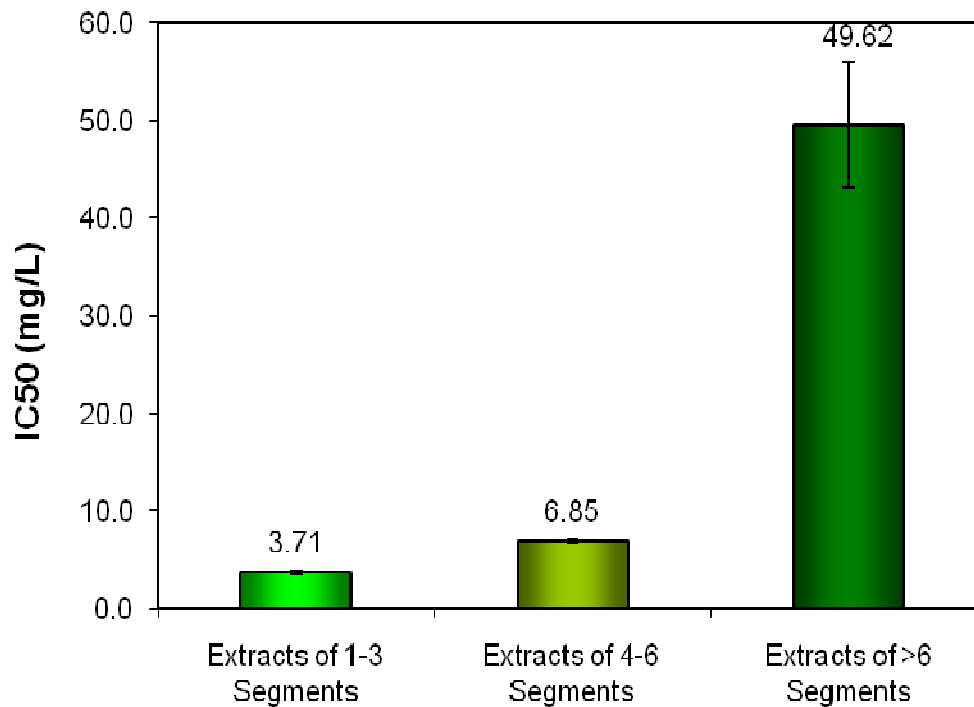
Gambar 8. Hubungan antara Total Phenol and Penghambatan radikal DPPH



**Gambar 9. Hubungan antara Total Flavonoid and penghambatan radikal DPPH**

Ada korelasi positif antara kadar total fenol dan total flavonoid dengan kemampuan menangkap radikal bebas DPPH ketiga sampel (Gambar 8 dan 9). Daun beluntas yang masih muda mempunyai aktivitas antiradikal lebih tinggi dibandingkan daun yang sudah tua. Kemampuan menangkap radikal

bebas merupakan salah satu mekanisme aksi utama antioksidan yang ditunjukkan oleh fitokimia fenolik. Oleh karena itu ekstrak sampel rempah-rempah yang mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi cenderung mempunyai kadar fenol total yang tinggi pula (Shan dkk. 2005).



### Samples

**Gambar 10. Nilai IC<sub>50</sub> tiap jenis daun beluntas**

Berdasarkan Gambar 10 dapat terlihat bahwa nilai IC<sub>50</sub> ketiga sampel tersebut sebagai berikut: ruas daun 1-3 sebesar 3,71 mg/L, ruas 4-6 sebesar 6,85 mg/L dan ruas >6 sebesar 49,62 mg/L. IC<sub>50</sub> adalah ukuran keefektifan suatu senyawa dalam menghambat fungsi biologis atau biokimia. Ukuran ini mengindikasikan banyaknya senyawa yang dibutuhkan untuk menghambat proses biologis menjadi setengahnya (50%). Semakin rendah nilai IC<sub>50</sub>nya maka semakin besar potensinya sebagai antioksidan (Kosuar dkk. 2004).

### KESIMPULAN

Ekstrak daun beluntas ketiga kelompok dari ruas daun beluntas yang meliputi : 1-3, 4-6 dan >6 mempunyai aktivitas menangkap radikal bebas DPPH. Ekstrak daun beluntas ini mengandung senyawa fitokimia seperti tanin, sterol, fenol hidrokuinon dan flavonoid.

Ekstrak daun beluntas dari ruas daun 1-3 yang paling berpotensi sebagai sumber antioksidan ditandai dengan nilai IC<sub>50</sub>nya paling kecil yaitu 3,71 mg/L dibandingkan ruas 4-6 dan >6 yang masing-masing sebesar 6,85 mg/L dan 49,62 mg/L. Kadar total fenol dan total flavonoid daun beluntas ruas daun 1-3 yaitu 234,65 mg GAE/100 g berat sampel kering dan 2163,59 mg QE/ 100 g berat sampel kering.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2-M Dirjen DIKTI atas biaya yang diberikan melalui dana Penelitian Hibah Bersaing 2008.

### DAFTAR PUSTAKA

Aicha, N. Ines, I. Ines, B. Mohamed, B.S. Jamila, H.S. Jemni, B.C. Mohamed, N. Daniel, B. Leila, G. dan Kamel, G. 2006. A Comparative Evaluation of Mutagenic, Antimutagenic and Scavenging Radicals Activity of

- Essential Oil from *Pituranthos Chloranthus*. *SIPAM* 362-371.
- Akroum, S. Satta, D. dan Lalaoui, K. 2009., Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Algerian Plants. *European Journal of Scientific Research* 31(2): 289-295.
- Amic, D. Davidovic-Amic, D. Bes'lo, D. dan Trinajstic, N. 2003., Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatia Chemical Acta* 76 : 55–61.
- Andarwulan, N. Batari, R. Sandrasari, D.A. dan Wijaya, H. 2008., Identifikasi senyawa flavonoid dan kapasitas antioksidannya pada ekstrak sayuran indigenous Jawa Barat. Di dalam : *Half Day Seminar on Natural Antioxidants: Chemistry, Biochemistry and Technology*, Bogor, 16 September 2008. Bogor: Biopharmaca Research Center-SEAFast Center IPB.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist 925.45. 1999. *Official methods of analysis of association of official analytical chemists*. Edition ke-15. USA : Kenneth Helrich. Chapter 44.1.03. p.2.
- Ardiansyah, Nuraida, L. Andarwulan, N. 2003., Aktivitas antimikroba daun beluntas (*Pluchea indica Less*) dan stabilitas aktivitasnya pada berbagai konsentrasi garam dan tingkat pH. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 14(2) : 90-97.
- Bergquist, S.A.M. Gertsson, U.E. Knuthsen, P. dan Olsson, M.E. 2005., Flavonoids in baby spinach (*spinacia oleracea l.*): changes during plant growth and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9459-9464.
- Biswas, R. Dasgupta, A. Mitra, A. Roy, S.K. Dutta, P.K. Achari, B. Dastidar, S.G. dan Chatterjee, T.K. 2005., Isolation, purification and characterization of four pure compounds from the root extract of *Pluchea indica Less* and the potentiality of the root extract and the pure compounds for antimicrobial activity. *European Bulletin of Drug Research* 13 : 63-70.
- Boukes, G.J. Venter, M.V.D. dan Oosthuizen, V. 2008. Quantitative and qualitative analysis of sterols/sterolins and hypoxoside contents of three *Hypoxis* (African potato) spp. *African Journal of Biotechnology* 7 (11): 1624-1629.
- Chang, H.Y. HO, Y.L. Sheu, M.J. Lin, Y.H. Tseng, M.C. Wu, S.H. Huang, G.J. dan Chang, Y.S. 2007., Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of *Phellinus merrillii* Extracts. *Botanical Studies* 48: 407-417.
- Chludil, H.D. Corbino, G.B. dan Leicarh, S.R. 2008., Soil Quality Effects on *Chenopodium album* Flavonoid Content and Antioxidant Potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 5050–5056.
- Deore, S.L. Khadabadi, S.S. Baviskar, B.A. Khadabadi, S.S. Khangenbam, R.A. Koli, U.S. Daga, N.P. Gadbail, P.A. dan Jain, P.A. 2009., In vitro Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Croton caudatum*. *International Journal of Chemical Technology Research* 1(2):174-176.
- Haeggkvist, M. dan Li, T.Q. 1998., Effects of Drying and Pressing on the Pore Structure in the Cellulose @bre Wall Studied By 1H and 2H NMR Relaxation. *Cellulose* 5: 33-49.
- Hagerman, A.E. Riedl, K.M. Jones, G.A. Sovik, K.N. Ritchard, N.T. Hartzfeld, P.W. dan Riechel, T.L. 2002., High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:1887-1892.



- Harbone, J.B. 1996., *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah, Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Hasan, S.M. R. Jamila, M. Majumder, M.M. Akter, R. Hossain, M.M. Mazumder, M.E.H. Alam, M.A. Jahangir, R. Rana, M.S. Arif, M. dan Rahman, S. 2009., Analgesic and Antioxidant Activity of the Hydromethanolic Extract of *Mikania scandens* (L.) Willd. Leaves. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 4 (1): 1-7.
- Huang, D. Ou, B. dan Prior, R.L. 2005., The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856.
- Jayasri, M.A. Mathew, L. dan Radha, A. 2009., A report on the antioxidant activity of leaves and rhizomes of *Costus pictus* D. Don. *International Journal Integrative Biology* 5(1) : 20-26.
- Kahkonen, M.P. Hopia, A.I. dan Heinonen. 2001., Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4076-4082.
- Kim, D.O. Lee, K.W. Lee, H.J. Lee, C.Y. 2002., Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3713-3717.
- Kosuar, M.B. Dorman, H.J.D. Basuer, K.H.C. dan Hiltunen R. 2004., Screening of Free Radical Scavenging Compounds in Water Extracts of Mentha Sampels Using a Postcolumn Derivatization Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5004-5010.
- Kumar, S. Kumar, D. Manjusha, Saroha, K. Singh, N. dan Vashishta, B. 2008., Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharmacology* 58 : 215–220.
- Kumaran, A. dan Karunakaran, R.J. 2007., In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. *LWT* 40 : 344–352.
- Li, C. Du, H. Wang, L.S.Shu, Q.Y. Zheng, Y. Xu, Y. Zhang, J.J. Zhang, J. Yang, R. dan Ge, Y. 2009., Flavonoid Composition and Antioxidant Activity of Tree Peony (*Paeonia* Section Moutan) Yellow Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 8496–8503.
- Luger, P. Weber, M. Dung, N.X.Ngoc, P.H., Tuong, D.T. dan Rang, D.D. 2000., The crystal structure of hop-17(21)-en-3 $\beta$ -yl asetat of *Pluchea pteropoda* Hemsl. from Vietnam. *Crystal Res Technology* 35(3) : 355-362.
- Magalhaes, L.M. Segundo, M.A. Reis, S. Lima, J.L.F.C. dan Rangel, A.O.S.S. 2006., Automatic method for the determination of folin-ciocalteu reducing capacity in food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5241-5246.
- Matricardi, M. Hesketh, R. dan Farrell, S. 2009., Effect of operating conditions on static/dynamic extraction of peanut oil using supercritical carbon dioxide. <http://www.Supercritical.com/publications/peanutoilextraction> by SF/ 1 November 2009
- Moein, S. Farzami, B. Khaghani, S. Moein, M.R. dan Larijani, B. 2007., Antioxidant properties and prevention of cell cytotoxicity of *Phlomis Persica* Boiss. *DARU* 15(2) : 83.
- Nakiboglu, M. Urek, R.O. Kayali, H.A. dan Tarhan, L. 2007., Antioxidant capacities of endemic *sideritis sipylea* and *origanum sipyleum* from turkey. *Food Chemistry* 104: 630–635.

- Orhan, I. Kartal, M. Asaker, M.A. Senol, F.S. Yilmaz, G. Sener, B. 2009., Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants. *Food Chemistry* 114 : 276–281.
- Pinelo, M. Tress, A.G. Pedersen, M. Amous, A. dan Meyer, A.S. 2007., Effect of Cellulases, solvent type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds. *American Journal of Food Technology* 2(7):641-651.
- Tapas, A. Sakarkar, D.M. dan Kakde, R.B. 2008., Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7(3) : 1089-1099.
- Traithip, A. 2005., *Phytochemistry and antioxidant activity of Pluchea indica*. [Thesis] Mahidol University. Thailand.
- Saffan, S.E.S. dan El-Mousallamy, A.M.D. 2008. Allelopathic effect of *Acacia raddiana* leaf extract on the phytochemical contents of germinated *Lupinus termis* Seeds. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(3): 270-277.
- Schaller, H. 2003. Review the role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research*, 42 (2003) 163–175.
- Sembiring, M.T. dan Sinaga, T.S. 2003. Arang aktif (Pengenalan dan Proses Pembuatannya), hal 1-9. USU digital library, Sumatera Utara.
- Shan, B. Cai, Y. Z. Sun, M. dan Corke, H. 2005., Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7749-7759.
- Sharma, O.P. dan Bhat, T.K. 2009., Analytical methods dpph antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113: 1202–1205.
- Soeksmanto, A. Hapsari, Y. dan Simanjuntak, P. 2007., Antioxidant content of parts of mahkota dewa, *Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl. (*Thymelaceae*). *Bioversitas* ISSN: 1412-033X. 8 (2): 92-95.
- Svedas, V. 1998., Cellulose-water vapour interaction investigated by spectrometric and ultra high frequency methods. *Journal of Physical D: Applied Physical* 31 : 1752-1756.
- Yu Lin, H. Kuo, Y.H. Lin, Y.L. dan Chiang, W. 2009., Antioxidative effect and active components from leaves of lotus (*Nelumbo nucifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6623–6629.

## EVALUASI AKTIVITAS ANTIOKSIDATIF EKSTRAK DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica*) BERDASARKAN PERBEDAAN RUAS DAUN

(EVALUATION OF ANTIOXIDATIVE ACTIVITY FROM BELUNTAS LEAVES EXTRACT  
(*Pluchea indica* Less) BASED ON DIFFERENCE OF LEAF SEGMENT)

Paini Sri Widyawati<sup>1)</sup>, C. Hanny Wijaya<sup>2)</sup>, Peni Suprapti Hardjosworo<sup>3)</sup>,  
Dondin Sajuthi<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Fakultas Teknologi Pertanian - Unika Widya Mandala Surabaya  
Alamat : Jl Dinoyo 42-44 Surabaya, Email : wiwiedt@gmail.com

<sup>2)</sup> Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian IPB  
<sup>3)</sup> Fakultas Peternakan IPB

<sup>4)</sup> Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB

### Abstract

*Beluntas (Pluchea indica Less) is a herb that commonly used as traditional medicine and food. Its leaves have many biological activities, because they contain various phenolic compounds. The phenol concentration of beluntas leaves depends on leaf segment, earth condition, fertilizer and environmental stress. This research is focused to determine antioxidant activity of three groups of beluntas leaf segments that includes 1-3, 4-6 and > 6. They were ground, dried at ambient temperature for 7 days, maserated by petroleum eter (1:4 b/v) at ambient temperature for 24 hours and soxhlet extracted by methanol (1:15 b/v) at 65°C for 3 hours. The result shows that the extract contains phytochemical compounds such as tannin, sterol, phenol hydroquinone and flavonoid. This extract has antioxidant activity to scavenging free radical DPPH (2,2-phenyl-1-picrylhydrazyl). The extract of 1-3 beluntas leaf segment was more potential antioxidant source than 4-6 and > 6 beluntas leaf segments, because it had the least IC<sub>50</sub> (inhibitor concentration) and the highest total phenol and total flavonoid. The IC<sub>50</sub>, total phenol and flavonoid total of it were 3.71 mg/L, 234.65 mg GAE/100 g samples and 2163.59 mg QE/ 100 g samples, respectively.*

**Key words :** *antioxidant activity, beluntas (Pluchea indica Less), phytochemical, total phenol, total flavonoid*

### Abstrak

Beluntas (*Pluchea indica Less*) adalah tanaman herba yang umumnya digunakan sebagai obat tradisional dan pangan (lalapan). Daun beluntas mempunyai beberapa aktivitas biologi karena mengandung berbagai senyawa fenolik. Konsentrasi fenol dalam daun beluntas sangat bergantung pada ruas daun, kondisi tanah, tingkat kesuburan dan stress lingkungan. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas antioksidan dari ketiga kelompok dari ruas daun beluntas yang meliputi : 1-3, 4-6 dan >6. Daun beluntas yang sudah dipetik dari pekarangan, dikeringkan pada suhu 27 °C selama 7 hari, dimaserasi dengan petroleum eter (1:4 b/v) pada suhu kamar selama 24 jam dan diekstraksi soxhlet dengan metanol (1:15 b/v) pada suhu 65°C selama 3 jam. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa fitokimia seperti : tanin, sterol, fenol hidrokuinon dan flavonoid. Ekstrak ini mempunyai aktivitas antioksidan menangkap radikal bebas DPPH (2,2-phenyl-1-picrylhydrazyl). Ekstrak dari ruas daun beluntas 1-3 yang paling berpotensi sebagai sumber antioksidan dari ruas daun 4-6 dan >6, sebab ekstrak tersebut mempunyai nilai IC<sub>50</sub> (konsentrasi penghambatan) paling kecil dan kadar fenol total dan flavonoid total tertinggi. Nilai IC<sub>50</sub>, total fenol dan

total flavonoid dari ekstrak ruas daun beluntas 1-3 masing-masing sebesar 3.71 mg/L, 234.65 mg GAE (gallic acid equivalent)/100 g berat sampel kering dan 2163.59 mg QE (Quercetin equivalent)/100 g berat sampel kering.

Kata Kunci: aktivitas antioksidan, beluntas (*Pluchea indica Less*), fitokimia, fenol total, flavonoid total dan DPPH (2,2-fenil-1-pikrilhidrazil).

## PENDAHULUAN

Radikal bebas, seperti anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), radikal hidroksil ( $\bullet OH$ ) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dapat memicu kerusakan biomolekul potensial dalam makhluk hidup, seperti : lemak, protein dan asam nukleat, yang berakibat munculnya berbagai macam penyakit degeneratif. Keberadaan radikal bebas ini pada proses pengolahan pangan dapat mempengaruhi kualitas, stabilitas dan keamanan pangan (Chludil dkk. 2008)

Antioksidan adalah senyawa yang berada pada konsentrasi lebih rendah dari substratnya secara signifikan dapat menunda atau mencegah oksidasi (Moein dkk. 2007). Senyawa ini dapat menghentikan reaksi radikal bebas. Usaha pencarian antioksidan alami terus dilakukan untuk menggantikan antioksidan sintetis yang masih diragukan akan tingkat keamanannya (Orhan dkk. 2009).

Beluntas (*Pluchea indica Less*) merupakan tanaman perdu kelompok Asteraceae yang telah dikenal masyarakat sebagai lalapan dan obat tradisional (Ardiansyah dkk. 2003). Berbagai penelitian telah menyebutkan bahwa beluntas mengandung senyawa lignan, seskuiterpen, fenilpropanoid, benzoid, monoterpen, triterpen, sterol dan alkana (Luger dkk. 2000), akar mengandung stigmasterol (+ $\beta$ -sitosterol), stigmasterol glikosida (+ $\beta$ -sitosterol-glikosida), 2-(prop-1-unil)-5-(5,6-dihidroksi heksa-1,3-diunil)-thiofena dan (-)-katekin (Biswas dkk. 2005), sedangkan daun mengandung hidrokuinon, tanin, alkaloid dan sterol (Ardiansyah dkk. 2003), flavonol,

seperti : mirisetin, kuersetin dan kaemferol (Andarwulan dkk. 2008).

Senyawa fenolik, terutama flavonoid berfungsi melindungi tanaman dari herbivora dan penyakit (Hagerman 2002). Senyawa ini dapat menangkap radikal bebas, mereduksi, mendonorkan atom hidrogen dan meredam oksigen singlet (Kumaran dan Karunakaran 2007). Potensial antioksidan flavonoid tergantung pada karakteristik struktur seperti: jumlah dan pola substitusi gugus hidroksil dan jumlah gugus hidroksil yang tersubstitusi glikosida (Amic dkk. 2003). Kadar fenolik pada daun sangat dipengaruhi oleh tingkat umur daun, kondisi tanah, pemberian pupuk serta stress lingkungan baik secara fisik, biologi maupun kimiawi (Kahkonen dkk. 2001).

Metode analisa DPPH secara luas digunakan untuk menentukan potensi ekstrak tanaman berdasarkan kemampuan menangkap radikal bebas. DPPH merupakan radikal bebas sintetis yang stabil yang dapat mewakili radikal bebas sesungguhnya. Senyawa ini berwarna ungu jika dilarutkan dalam pelarut metanol (Huang dkk. 2005). Penggunaan metanol dapat menstabilkan radikal DPPH dibandingkan pelarut lain, seperti: etanol dan n-butanol (Sharma dan Bhat 2009). Selain itu radikal DPPH dapat larut hanya dalam media pelarut organik (Kim dkk. 2002).

Kemampuan menangkap radikal bebas DPPH sampel didasarkan pada kemampuan mereduksi radikal bebas yang ditandai dengan penurunan intensitas warna larutan ungu, karena DPPH menangkap atom hidrogen dari senyawa fenolik sehingga terbentuk senyawa difenil pikrilhidrasin berwarna

kuning yang stabil (Chang dkk. 2007; Kim dkk. 2002). Dekolorisasi radikal DPPH dapat terdeteksi pada  $\lambda$  515-517 nm (Hasan dkk. 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aktivitas antioksidatif ekstrak daun beluntas dari 3 kelompok ruas daun beluntas, yaitu ruas daun 1-3, 4-6 dan >6, melalui pengujian fitokimia, total fenol total flavonoid dan kemampuan menangkap radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).

## METODOLOGI

### Bahan Penelitian

Bahan baku yang digunakan adalah daun beluntas yang diperoleh dari daerah Dramaga, Bogor. Bahan kimia untuk analisis terdiri atas : petroleum eter metanol akuades pereaksi Dragendoff Mayer dan Wagner klorofor, asam gallat (Riedel-de Haen), kuersetin dan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil, dll

### Metode Penelitian

#### Proses Penyiapan Ekstrak Daun Beluntas

Daun beluntas pada penelitian ini dikelompokkan menjadi 3, yaitu : ruas daun 1-3, 4-6 dan >6 (Gambar 1). Pengelompokan didasarkan pada perbedaan warna dan tekstur daun. Masing-masing ruas diekstraksi menurut modifikasi metode Biswas dkk. (2005)

Daun beluntas yang telah dikeringkan pada suhu kamar selama 7 hari ditepungkan dengan ukuran 40 mesh, lalu dianalisis kadar air dan fitokimianya. Kemudian tepung daun kering tersebut dimaserasi dengan petroleum eter (1:4 b/v) pada suhu kamar selama 24 jam. Residu yang sudah dipisahkan dari pelarutnya dengan cara disaring dikeringkan pada suhu kamar ( $\pm$  15 menit). Selanjutnya residu yang sudah kering diekstrak dengan metanol (1:15b/v) menggunakan ekstraksi soxhlet pada suhu 65°C selama 3 jam. Pelarut metanol diuapkan dengan rotary evaporator. Ekstrak yang

diperoleh disimpan pada suhu 4°C dan gelap sampai analisa berikutnya.

Analisis meliputi kadar air ditentukan berdasarkan metode AOAC 925.45 (1999), analisa fitokimia dilakukan berdasarkan metode Harborne (1996) yang meliputi: alkaloid, flavonoid, fenolik, triterpenoid, sterol, saponin dan tanin.

### Analisa Alkaloid

1 gram sampel digiling dengan pasir sambil dibasahi dengan 5 ml kloroform yang berisi 3 tetes ammonia. Tambahkan lagi 5 ml kloroform yang berisi 5 tetes ammonia, kemudian saring ke dalam tabung reaksi. Ekstrak kloroform ditambahkan 10 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M dan divorteks, kemudian dipisahkan lapisan asamnya ke dalam tabung reaksi lain. Lapisan tersebut diteteskan pada *spot plate* dan ditambahkan 3 pereaksi Dragendoff, Mayer dan Wagner, uji keberadaan alkaloid positif jika timbul endapan dengan warna berturut-turut sebagai berikut : merah jingga, putih dan coklat.

### Deteksi Senyawa Flavonoid dan Fenolik

Sebanyak 0.1 gram sampel ditambahkan metanol sampai semua sampel terendam, kemudian dipanaskan. Larutan dipipet dan diteteskan pada 2 *spot plate* masing-masing 5 tetes. Pada *spot plate* pertama ditambahkan NaOH 10% (b/v), timbulnya warna merah menandakan positif senyawa fenol hidrokuinon. Pada *spot plate* kedua ditambahkan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, timbulnya warna merah menandakan positif senyawa flavonoid.

### Deteksi Triterpenoid dan Sterol

Sebanyak 0,1 gram sampel ditambahkan etanol dan dipanaskan lalu disaring. Filtrat diuapkan dan ditambahkan eter. Lapisan eter yang terbentuk dipipet dan diteteskan pada *spot plate* lalu ditambahkan pereaksi LB

(3 tetes asetat anhidrat dan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Adanya triterpenoid ditandai dengan timbulnya warna merah atau ungu, sedangkan adanya sterol ditandai dengan adanya warna hijau.

#### **Deteksi Flavonoid, Saponin dan Tanin**

Sebanyak 0,1 gram sampel dimasukkan dalam gelas piala lalu ditambahkan 10 ml air panas dan didihkan selama 5 menit. Kemudian masing-masing 3 ml larutan dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi. Tabung pertama dimasukkan serbuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat dan amil alkohol. Campuran dikocok dan dibiarkan memisah, adanya flavonoid ditunjukkan adanya warna merah coklat pada lapisan amil alkohol. Pada tabung reaksi kedua dilakukan pengocokan secara vertikal selama 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit. Adanya busa yang stabil menunjukkan adanya saponin, sedangkan sisa campuran didihkan lagi selama 10 menit lalu disaring. Filtrat ditambahkan dengan beberapa ml larutan FeCl<sub>3</sub> 1 % (b/v). Timbulnya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

#### **Penentuan Rendemen**

Ekstrak daun beluntas yang diperoleh ditentukan rendemennya dengan tujuan untuk mengetahui tingkat keefektifan metode ekstraksi. Rendemen yang diperoleh ditentukan berdasarkan metode gravimetri berdasarkan metode Ljubuncic *et al.* (2005), dengan cara membandingkan berat ekstrak daun beluntas terhadap berat sampel yang digunakan, sehingga diperoleh persen ekstrak (b/b).

#### **Kadar Total Fenol**

Kadar total fenol ditentukan berdasarkan metode Kumar dkk. (2008) dan Jayasri dkk. (2009). 1 ml sampel ditambahkan 4 ml larutan natrium karbonat (75g/L) kemudian divorteks dan ditambahkan 0,2 ml reagen Folin-ciocalteus fenol. Selanjutnya campuran

ditambahkan akuades hingga volume 10 ml dan divorteks kembali. Setelah sampel dibiarkan selama 1 jam diukur pada  $\lambda$  760 nm. Kadar fenol total dinyatakan ekuivalen asam gallat (GAE).

#### **Kadar Total Flavonoid**

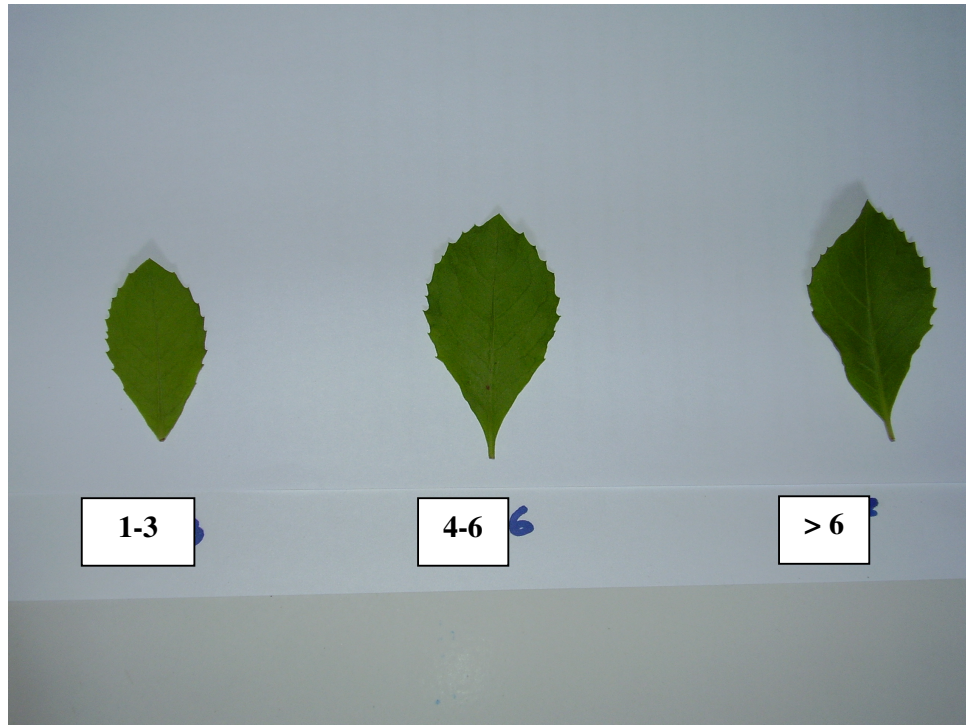
Kadar total flavonoid ditentukan berdasarkan metode Kumar dkk. (2008). 1 ml sampel dimasukkan dalam labu takar 10 ml yang berisi 4 ml akuades dan ditambahkan 0,3 ml larutan NaNO<sub>2</sub> 5% (b/v). Sesudah 5 menit ditambahkan 0,3 ml larutan AlCl<sub>3</sub> 10% (b/v), lalu sesudah 6 menit ditambahkan 2 ml larutan 1 mol/L NaOH dan diencerkan hingga volume 10 ml dengan akuades. Absorbansi larutan diukur pada  $\lambda$  510 nm. Kadar flavonoid total dinyatakan ekuivalen kuersetin (QE).

#### **Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH**

Aktivitas antioksidan sampel diukur berdasarkan modifikasi metode Aicha dkk. (2006). 1 ml sampel pada berbagai variasi konsentrasi dalam pelarut metanol ditambahkan 3 ml larutan DPPH (60 $\mu$ M) dan metanol hingga volume 10 ml. Absorbansi larutan diukur pada  $\lambda$  517 nm setelah 30 menit menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kemampuan menghambat radikal bebas DPPH dinyatakan dengan rumus : % penghambatan =  $(A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%$ , Keterangan : A<sub>0</sub> adalah absorbansi kontrol pada saat t = 0 detik dan A<sub>t</sub> adalah absorbansi antioksidan pada saat t = 30 detik.

#### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Tingkat ketuaan daun beluntas menentukan kadar fitokimia, oleh karena itu dilakukan pengelompokan daun menjadi 3, yaitu : ruas daun 1-3, 4-6 dan >6. Pembagian didasarkan pada perbedaan kenampakan daun (warna dan tekstur). Semakin tua daun warnanya semakin hijau tua dan teksturnya semakin keras karena jaringan /selulosanya semakin banyak.



**Gambar 1. Pengelompokan daun beluntas yang diteliti (1-3 ruas, 4-6 ruas dan lebih dari 6 ruas)**

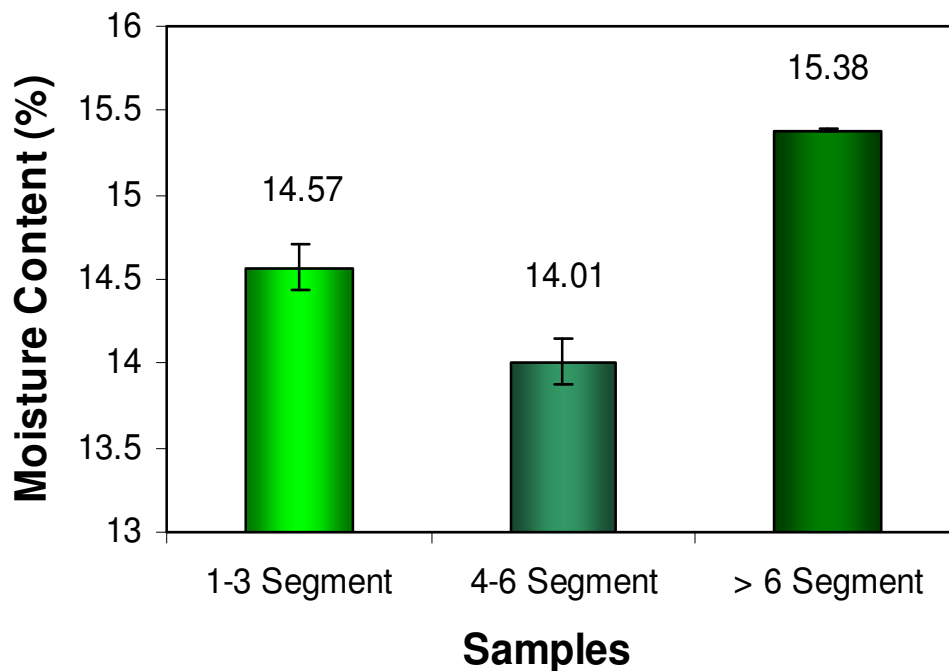
#### **Kadar Air**

Ketiga kelompok sampel yang sudah dikeringkan pada suhu kamar ditepungkan untuk mendapatkan partikel 40 mesh. Perlakuan ini dimaksudkan untuk memperluas permukaan kontak antara partikel daun dengan pelarut sehingga hasil ekstraksi yang diperoleh maksimal.

Berdasarkan Matricardi dkk. (2009) bahwa reduksi ukuran partikel pada biji kacang tanah menunjukkan efek yang positif terhadap ekstraksi. Ukuran partikel semakin kecil akan menyebabkan peningkatan luas permukaan dan jumlah sel yang rusak yang berakibat peningkatan konsentrasi minyak yang dihasilkan. Selama ekstraksi difusi yang terjadi pada

partikel relatif kecil, sehingga jumlah minyak yang terekstrak sebanding dengan luas permukaan partikel. Penurunan ukuran partikel dari 3,35-4,75 mm menjadi 0,86-1,19 mm, total minyak yang dihasilkan meningkat sebesar 36%- 82%.

Menurut Pileo dkk. (2007) bahwa reduksi ukuran partikel pada biji kopi secara signifikan berpengaruh positif terhadap fenol yang terekstrak. Reduksi ukuran partikel yang berlebihan menyebabkan terbentuknya fenomena pelapisan dan cara yang disukai oleh pelarut sehingga membatasi efisiensi pembasahan pelarut terhadap sampel dan menurunkan efisiensi ekstraksi.



**Gambar 2. Kadar kelembaban dari tiap jenis daun**

Penentuan kadar air tepung daun beluntas ditentukan dengan oven vakum suhu 70°C, hal ini dilakukan dengan pertimbangan untuk meminimalkan kesalahan kadar air yang terukur karena hilangnya sejumlah senyawa volatil (kelompok terpen), seperti : boehmeril asetat, HOP-17 (21)-en 3 $\beta$ -asetat, linaloil glukosida, linaloil apiosil glukosida, linaloil hidroksi glukosida, plusheosida C, cuauhthermone, 3-(2'-3'-diasetoksi-2'metil-butiril), plucheol A, plucheol B, plucheosida A, plucheosida B, plucheosida E dan pterocarptriol (Traithip 2005), seskuisterpen, monoterpen dan triterpen (Luger dkk. 2000).

Kadar air sampel daun beluntas mengalami penurunan seiring dengan

bertambahnya usia/ketuaan daun, karena terjadi peningkatan jumlah komponen daun (jaringan/serat). Penyimpangan kadar air pada ruas >6 disebabkan adanya penyerapan air kembali oleh jaringan/serat pada tepung daun yang kering. Selama proses pengeringan kadar air daun beluntas mengalami penurunan sehingga terjadi pengkerutan ukuran pori dan distribusi ukuran pori saling mendekat (Haeggkvist dkk. 1998). Kemampuan adsorpsi air oleh selulosa atau serat disebabkan adanya interaksi antara gugus hidroksil dengan molekul air dari udara (Svedas 1998). Menurut Sembiring dan Sinaga (2003) bahwa kemampuan adsorpsi air oleh adsorben ditentukan adanya pori yang dapat meningkatkan luas permukaan adsorben.



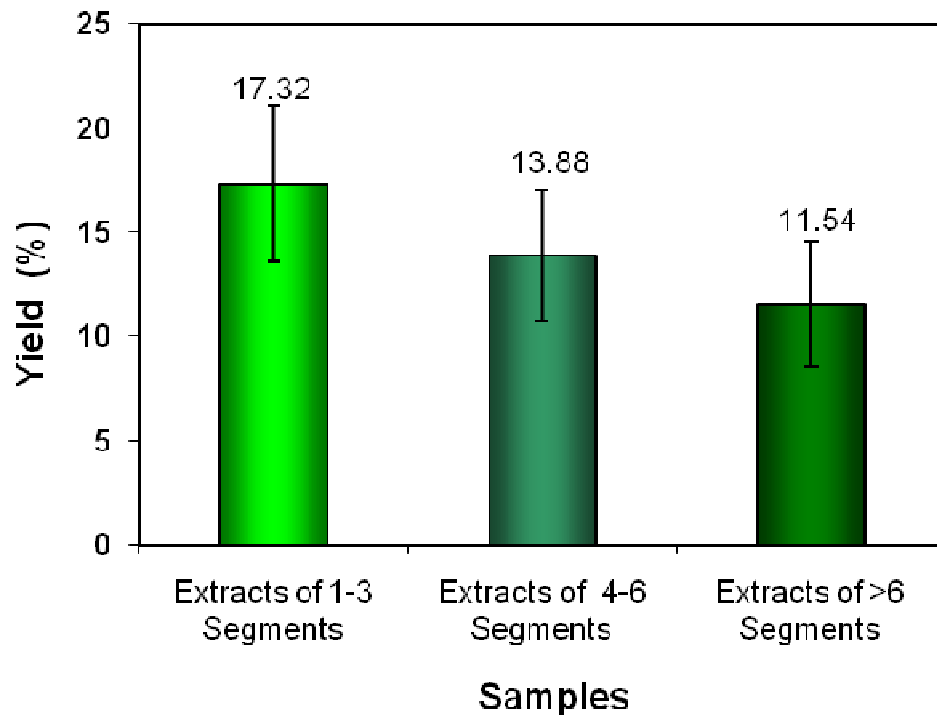
**Table 1 Total fitokimia dari tiap jenis daun beluntas**

Compounds	Jenis daun (ruas)		
	1-3	4-6	> 6
Saponin	-	-	-
Tannin	++++	+++	++
Triterpenoid	-	-	-
Sterol	++++	+++	++
Flavonoid	+++	++	+
Phenol hydroquinon	+	-	-
Alkaloid	-	-	-

Ket. : + menunjukkan intensitas warna, semakin banyak tanda positif menunjukkan semakin kuat warna

Fitokimia yang terdeteksi pada ekstrak daun beluntas meliputi: senyawa tanin, sterol, flavonoid dan fenol hidrokuinon, namun dengan intensitas yang berbeda (Tabel 1). Keberadaan senyawa tanin, sterol, flavonoid dan fenol hidrokuinon pada ekstrak daun beluntas masing-masing ditunjukkan oleh warna biru tua atau hijau kehitaman, hijau, merah dan merah (Harbone, 1996). Hal ini sesuai dengan pendapat Ardiansyah dkk. (2003) bahwa daun beluntas mengandung senyawa fitokimia, seperti: fenol hidrokuinon, sterol dan tanin. Menurut Traithip (2005) bahwa senyawa fitokimia yang terdapat pada ekstrak etanolik dan fraksi-fraksinya dari daun beluntas terdiri atas senyawa flavonoid dan polifenol.

Komposisi dan konsentrasi senyawa fitokimia mengalami perubahan selama pertumbuhan tanaman. Daun yang lebih muda mempunyai kandungan fitokimia paling tinggi (Bergquist dkk. 2005), hal ini terkait dengan fungsi dari senyawa metabolit sekunder tersebut, yaitu untuk pertahanan melawan herbivora, patogen, insekta, bakteri, jamur dan virus (Saffan dan El-Mousallamy 2008). Selain itu senyawa fitokimia dalam daun biasanya ditemukan dalam struktur bebas atau terikat secara glikosida, dengan bertambahnya tingkat ketuaan daun banyak ditemukan dalam struktur glikosida yang terdapat pada membran sel. Senyawa ini membentuk struktur yang kompleks dengan karbohidrat (glukosa, xilosa dan arabinosa) (Schaller, 2003; Boukes dkk., 2008).



**Gambar 3. Kadar rendemen dari tiap jenis daun beluntas**

### Rendemen

Gambar 3 menunjukkan bahwa rendemen terbesar diperoleh dari kelompok ruas daun 1-3 > 4-6 > >6. Data ini seiring dengan peningkatan intensitas warna pada uji fitokimia. Rendemen ditentukan setelah melewati ekstraksi pelarut dan soxhlet serta penghilangan residu pelarut. Rendemen yang diperoleh telah mengalami proses penghilangan lemak (*defatted*), karena pada ekstraksi pelarut digunakan petroleum eter. Rendemen yang diperoleh sangat ditentukan oleh tingkat kelarutan senyawa metabolit sekunder pada pelarut yang digunakan. Kelarutan senyawa sangat ditentukan oleh kepolaran, momen dipol, polarisabilitas dan ikatan hidrogen.

Pada ekstraksi soxhlet dipilih metanol daripada etanol, hal ini

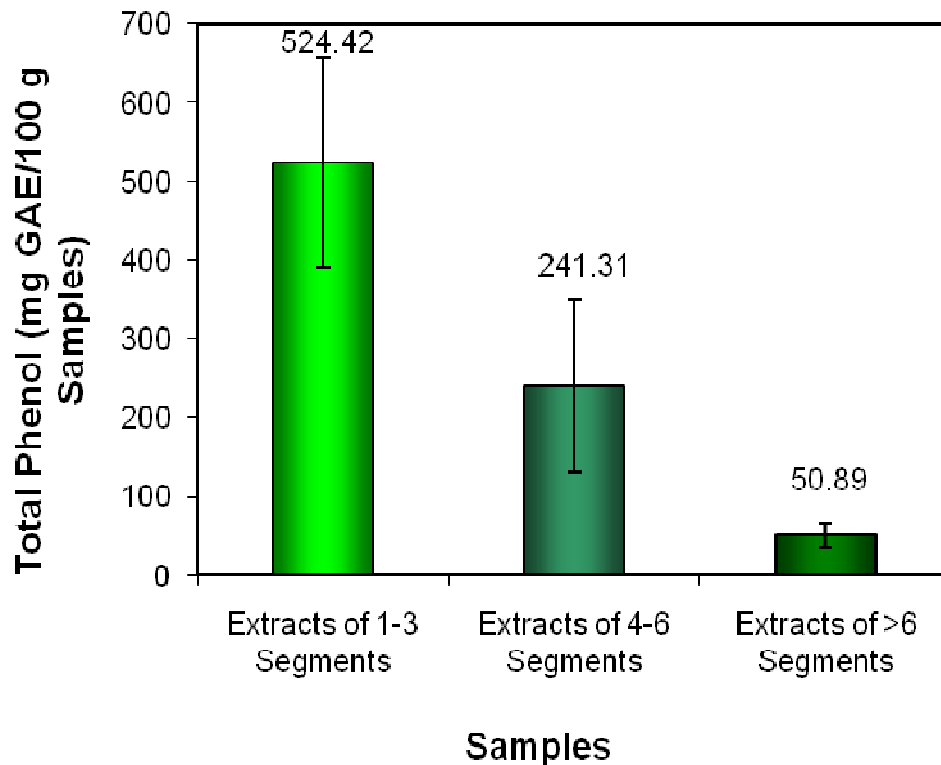
dilakukan dengan pertimbangan metanol dapat mengekstrak senyawa fitokimia lebih banyak sehingga aktivitas antioksidan yang dihasilkan lebih tinggi (Akroum dkk. 2009). Menurut Yu Lin dkk. (2009) bahwa metanol dapat mengekstrak senyawa dengan berat molekul rendah, tingkat kepolaran sedang sebab sifat kelarutannya yang luas. Penggunaan pelarut yang berbeda pada ekstraksi daun beluntas dapat mengubah profil senyawa fenolik yang terdapat dalam sampel (Kahkonen dkk. 2001).

### Total Fenol

Hasil uji total fenol menyatakan bahwa semakin muda daun kadar total fenol semakin besar, hal ini terkait dengan fungsi fenol bagi tanaman sebagai pertahanan (Saffan dan El-Mousallamy 2008). Menurut Kahkonen

dkk. (2001) bahwa perbedaan tingkat kematangan buah berpengaruh pada profil fenolik, biasanya senyawa fenolik terkonsentrasi pada buah yang masih muda daripada buah yang tua, kecuali antosianin. Schaller (2003) dan Boukes dkk. (2008) berpendapat bahwa senyawa fenol yang ditemukan pada buah, bunga, daun dan biji mempunyai

struktur yang beragam dalam kondisi bebas atau terikat secara glikosida. Semakin tua umur daun struktur glikosida lebih banyak terkonsentrasi. Hampir 2-10 kali lipat senyawa metabolit sekunder (sterol) ada dalam struktur asil glikosida yang terdapat dalam membran sel.

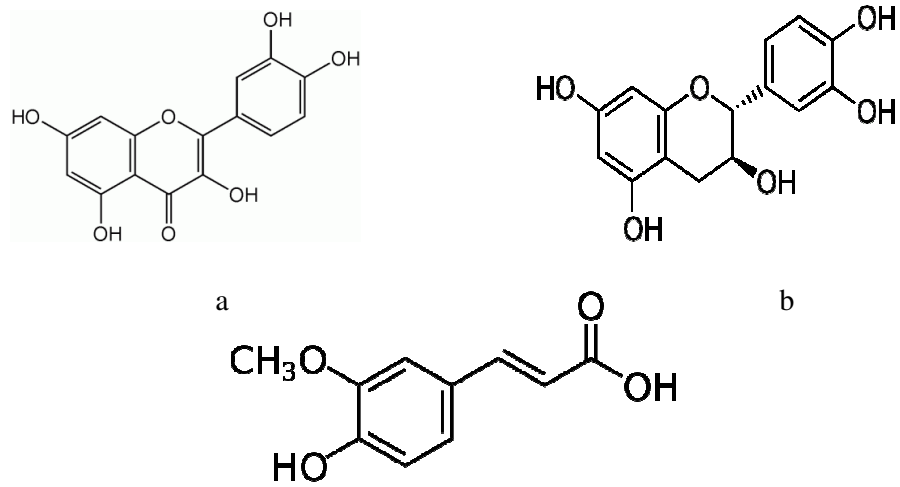


**Gambar 4. Total phenol tiap jenis daun beluntas**

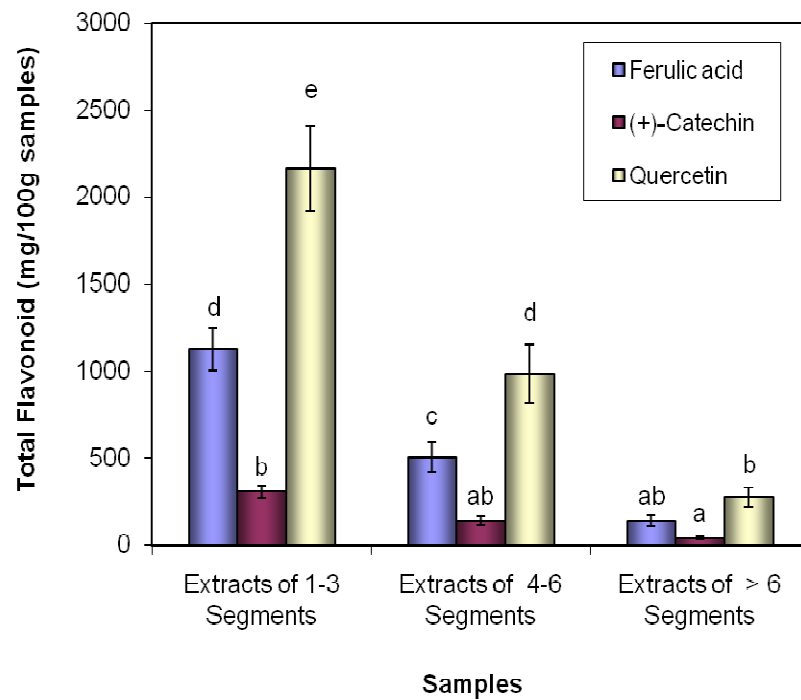
Pada pengujian dengan folin ciocalteus diperoleh hasil yang sangat dipengaruhi oleh struktur kimianya. Senyawa fenol yang mempunyai gugus fungsi hidroksil yang banyak atau dalam kondisi bebas akan dihasilkan kadar total fenol yang tinggi (Deore dkk. 2009). Hal ini disebabkan

kompleks warna ungu yang terdeteksi didasarkan pada reaksi transfer elektron dalam larutan alkali dari fenolik ke senyawa kompleks asam fosfotungstat /fosfomolibdat (Huang dkk. 2005).

**Total Flavonoid**



**Gambar 5. Structure of Standard compounds (a) quercetin (b) (+)-catechin (c) ferulic acid**



**Gambar 6. Total flavonoid dari tiap jenis daun beluntas**

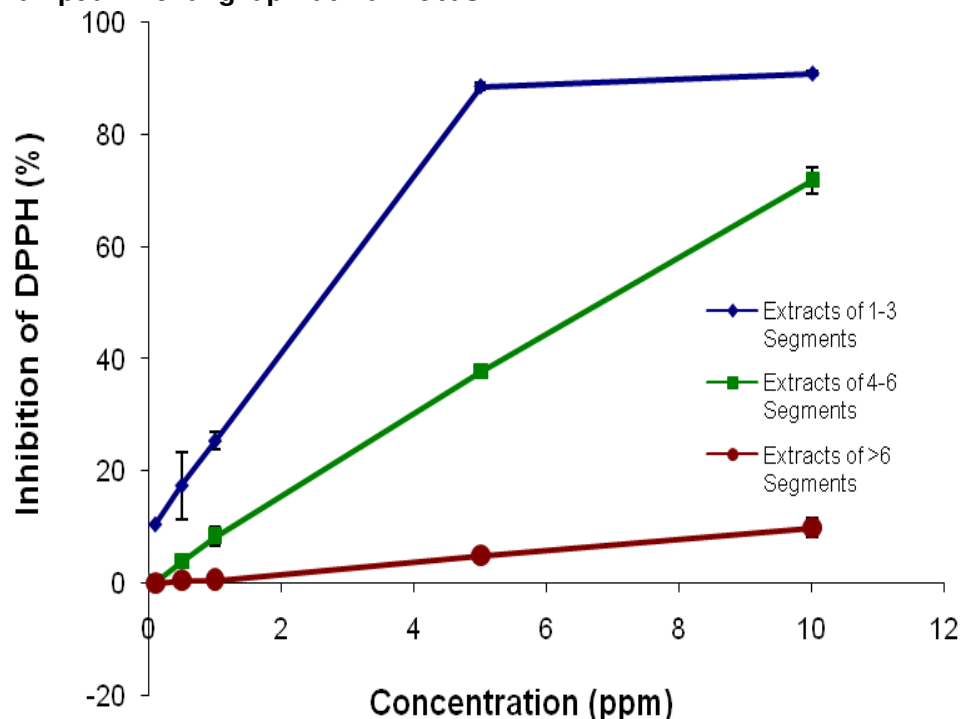
Pengujian total flavonoid pada berbagai tingkat ruas daun beluntas menunjukkan bahwa kadar total flavonoid ruas 1-3 > ruas 4-6 > ruas >6 pada berbagai senyawa standar (asam ferulat, (+)-katekin dan kuersetin) (Gambar 5). Total flavonoid ketiga sampel menunjukkan bahwa kadar total flavonoid daun beluntas dengan menggunakan standar kuersetin > asam ferulat > (+)-katekin (Gambar 6). Struktur senyawa standar menentukan reaktivitas terhadap reagen  $AlCl_3$  dan  $NaNO_2$  dalam kondisi basa kuat (NaOH), yang ditandai dengan terbentuknya kompleks warna antara orange hingga merah.

Kuersetin dipilih sebagai standar karena termasuk senyawa flavonol yaitu flavonoid yang paling efektif menangkap radikal bebas (radikal hidroksil, superoksida dan peroksil)

(Tapas dkk. 2008) serta menghambat berbagai reaksi oksidasi (Soeksmanto dkk. 2007), karena dapat menghasilkan radikal fenoksil yang terstabilkan oleh efek resonansi dari cincin aromatis (Yu Lin dkk. 2009).

Hal ini disebabkan senyawa flavonol mempunyai struktur (katekol) orthodihidroksi pada cincin B, ikatan rangkap pada atom C2-3 yang terkonjugasi dengan gugus fungsi C4-okso, gugus OH pada C3 di cincin C dan gugus OH pada C5 di cincin A (Lugasi dkk. 2003; Tapas dkk. 2008). Kombinasi gugus C3-OH dan C5-OH dengan C4-karbonil dan ikatan rangkap C2-C3 dapat meningkatkan aktivitas penangkap radikal bebas (Amic dkk. 2003).

#### Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH

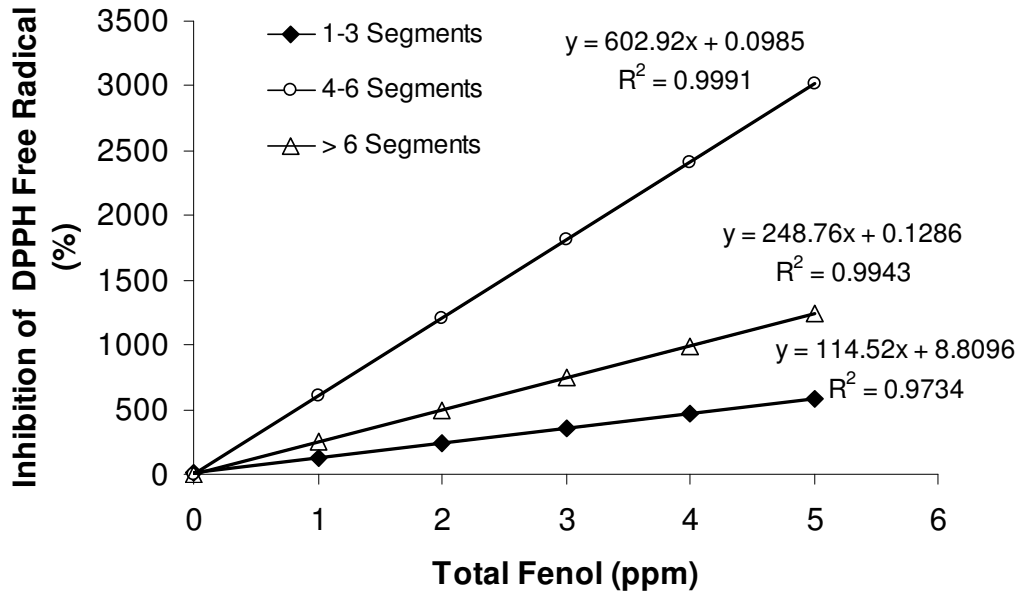


Gambar 7. Aktivitas menangkap radikal bebas DPPH dari tiap jenis daun beluntas

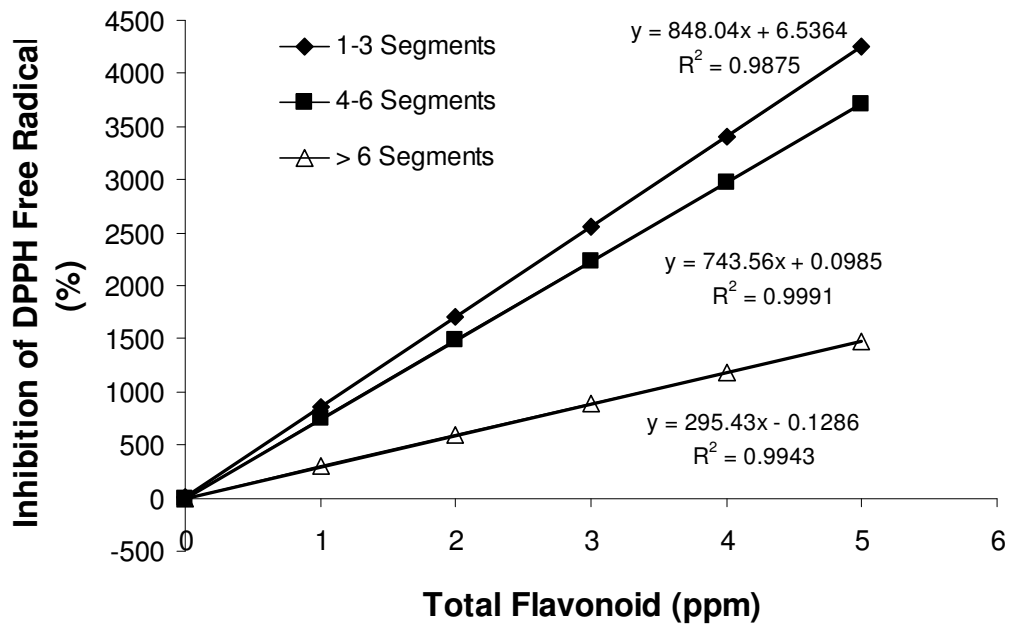
Hasil pengujian kemampuan menangkap radikal bebas DPPH dari ketiga kelompok ekstrak daun beluntas diperoleh bahwa ekstrak daun ruas 1-3> 4-6> >6 (Gambar 7). Hal ini ditunjukkan dari kemampuan masing-masing ekstrak dalam mereduksi warna ungu dari radikal bebas DPPH menjadi larutan yang berwarna kuning yang terdeteksi pada  $\lambda$  517 nm. Semakin besar potensi ekstrak daun beluntas menangkap radikal bebas DPPH semakin besar konsentrasi radikal DPPH yang tereduksi. Penurunan warna ungu disebabkan radikal DPPH menangkap atom hidrogen yang didonorkan oleh senyawa fenolik sehingga terbentuk senyawa difenil pikrilhidrasin berwarna kuning yang stabil (Chang dkk. 2007; Kim dkk. 2002).

Kapasitas menangkap radikal bebas DPPH sebagian besar terkait dengan gugus hidroksil dari senyawa fenol (Nakiboglu dkk. 2007). Aktivitas menangkap radikal bebas DPPH dipengaruhi oleh polaritas dari medium reaksi, struktur kimia dari penangkap radikal dan pH campuran reaksi (Sharma dan Bhat 2009).

Aktivitas antioksidan fenolik sangat ditentukan oleh struktur kimia, jumlah dan posisi gugus hidroksil dan metil pada cincin. Molekul tersubstitusi gugus hidroksil semakin banyak semakin kuat menangkap radikal bebas DPPH karena kemampuan mendonorkan atom hidrogen semakin besar (Yu Lin dkk. 2009). Struktur aglikon mempunyai aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan struktur glikosida (Li dkk. 2009).



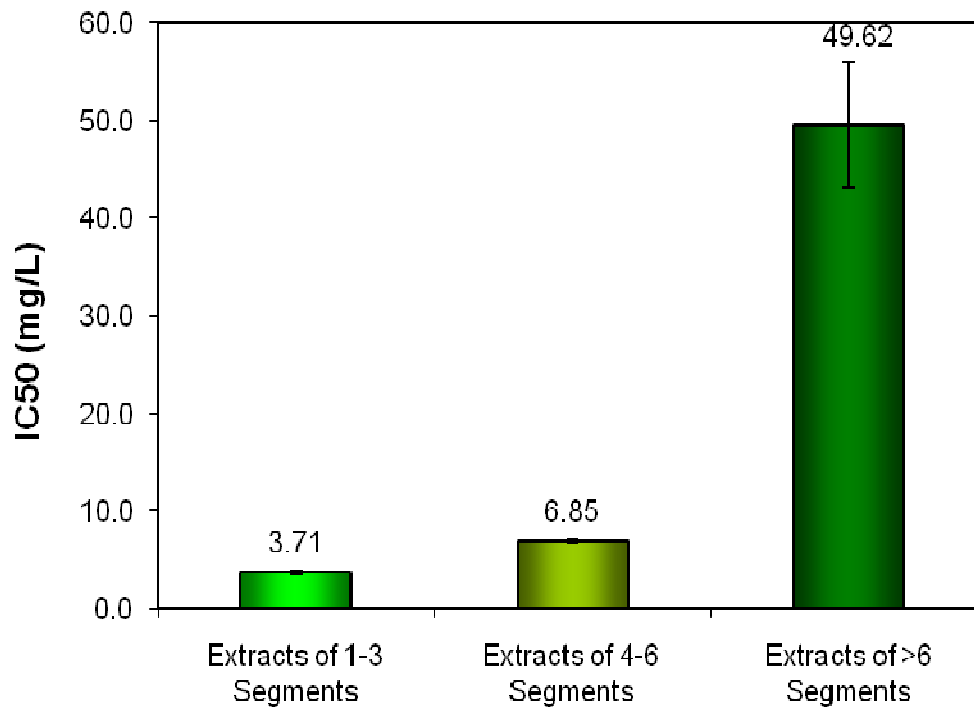
Gambar 8. Hubungan antara Total Phenol and Penghambatan radikal DPPH



**Gambar 9. Hubungan antara Total Flavonoid and penghambatan radikal DPPH**

Ada korelasi positif antara kadar total fenol dan total flavonoid dengan kemampuan menangkap radikal bebas DPPH ketiga sampel (Gambar 8 dan 9). Daun beluntas yang masih muda mempunyai aktivitas antiradikal lebih tinggi dibandingkan daun yang sudah tua. Kemampuan menangkap radikal

bebas merupakan salah satu mekanisme aksi utama antioksidan yang ditunjukkan oleh fitokimia fenolik. Oleh karena itu ekstrak sampel rempah-rempah yang mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi cenderung mempunyai kadar fenol total yang tinggi pula (Shan dkk. 2005).



### Samples

**Gambar 10. Nilai IC<sub>50</sub> tiap jenis daun beluntas**

Berdasarkan Gambar 10 dapat terlihat bahwa nilai IC<sub>50</sub> ketiga sampel tersebut sebagai berikut: ruas daun 1-3 sebesar 3,71 mg/L, ruas 4-6 sebesar 6,85 mg/L dan ruas >6 sebesar 49,62 mg/L. IC<sub>50</sub> adalah ukuran keefektifan suatu senyawa dalam menghambat fungsi biologis atau biokimia. Ukuran ini mengindikasikan banyaknya senyawa yang dibutuhkan untuk menghambat proses biologis menjadi setengahnya (50%). Semakin rendah nilai IC<sub>50</sub>nya maka semakin besar potensinya sebagai antioksidan (Kosuar dkk. 2004).

### KESIMPULAN

Ekstrak daun beluntas ketiga kelompok dari ruas daun beluntas yang meliputi : 1-3, 4-6 dan >6 mempunyai aktivitas menangkap radikal bebas DPPH. Ekstrak daun beluntas ini mengandung senyawa fitokimia seperti tanin, sterol, fenol hidrokuinon dan flavonoid.

Ekstrak daun beluntas dari ruas daun 1-3 yang paling berpotensi sebagai sumber antioksidan ditandai dengan nilai IC<sub>50</sub>nya paling kecil yaitu 3,71 mg/L dibandingkan ruas 4-6 dan >6 yang masing-masing sebesar 6,85 mg/L dan 49,62 mg/L. Kadar total fenol dan total flavonoid daun beluntas ruas daun 1-3 yaitu 234,65 mg GAE/100 g berat sampel kering dan 2163,59 mg QE/ 100 g berat sampel kering.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2-M Dirjen DIKTI atas biaya yang diberikan melalui dana Penelitian Hibah Bersaing 2008.

### DAFTAR PUSTAKA

Aicha, N. Ines, I. Ines, B. Mohamed, B.S. Jamila, H.S. Jemni, B.C. Mohamed, N. Daniel, B. Leila, G. dan Kamel, G. 2006. A Comparative Evaluation of Mutagenic, Antimutagenic and Scavenging Radicals Activity of



- Essential Oil from *Pituranthos Chloranthus*. *SIPAM* 362-371.
- Akroum, S. Satta, D. dan Lalaoui, K. 2009., Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Algerian Plants. *European Journal of Scientific Research* 31(2): 289-295.
- Amic, D. Davidovic-Amic, D. Bes'lo, D. dan Trinajstic, N. 2003., Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatia Chemical Acta* 76 : 55–61.
- Andarwulan, N. Batari, R. Sandrasari, D.A. dan Wijaya, H. 2008., Identifikasi senyawa flavonoid dan kapasitas antioksidannya pada ekstrak sayuran indigenous Jawa Barat. Di dalam : *Half Day Seminar on Natural Antioxidants: Chemistry, Biochemistry and Technology*, Bogor, 16 September 2008. Bogor: Biopharmaca Research Center-SEAFast Center IPB.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist 925.45. 1999. *Official methods of analysis of association of official analytical chemists*. Edition ke-15. USA : Kenneth Helrich. Chapter 44.1.03. p.2.
- Ardiansyah, Nuraida, L. Andarwulan, N. 2003., Aktivitas antimikroba daun beluntas (*Pluchea indica Less*) dan stabilitas aktivitasnya pada berbagai konsentrasi garam dan tingkat pH. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 14(2) : 90-97.
- Bergquist, S.A.M. Gertsson, U.E. Knuthsen, P. dan Olsson, M.E. 2005., Flavonoids in baby spinach (*spinacia oleracea l.*): changes during plant growth and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9459-9464.
- Biswas, R. Dasgupta, A. Mitra, A. Roy, S.K. Dutta, P.K. Achari, B. Dastidar, S.G. dan Chatterjee, T.K. 2005., Isolation, purification and characterization of four pure compounds from the root extract of *Pluchea indica Less* and the potentiality of the root extract and the pure compounds for antimicrobial activity. *European Bulletin of Drug Research* 13 : 63-70.
- Boukes, G.J. Venter, M.V.D. dan Oosthuizen, V. 2008. Quantitative and qualitative analysis of sterols/sterolins and hypoxoside contents of three *Hypoxis* (African potato) spp. *African Journal of Biotechnology* 7 (11): 1624-1629.
- Chang, H.Y. HO, Y.L. Sheu, M.J. Lin, Y.H. Tseng, M.C. Wu, S.H. Huang, G.J. dan Chang, Y.S. 2007., Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of *Phellinus merrillii* Extracts. *Botanical Studies* 48: 407-417.
- Chludil, H.D. Corbino, G.B. dan Leicarh, S.R. 2008., Soil Quality Effects on *Chenopodium album* Flavonoid Content and Antioxidant Potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 5050–5056.
- Deore, S.L. Khadabadi, S.S. Baviskar, B.A. Khadabadi, S.S. Khangenbam, R.A. Koli, U.S. Daga, N.P. Gadbail, P.A. dan Jain, P.A. 2009., In vitro Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Croton caudatum*. *International Journal of Chemical Technology Research* 1(2):174-176.
- Haeggkvist, M. dan Li, T.Q. 1998., Effects of Drying and Pressing on the Pore Structure in the Cellulose @bre Wall Studied By 1H and 2H NMR Relaxation. *Cellulose* 5: 33-49.
- Hagerman, A.E. Riedl, K.M. Jones, G.A. Sovik, K.N. Ritchard, N.T. Hartzfeld, P.W. dan Riechel, T.L. 2002., High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:1887-1892.

- Harbone, J.B. 1996., *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah, Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Hasan, S.M. R. Jamila, M. Majumder, M.M. Akter, R. Hossain, M.M. Mazumder, M.E.H. Alam, M.A. Jahangir, R. Rana, M.S. Arif, M. dan Rahman, S. 2009., Analgesic and Antioxidant Activity of the Hydromethanolic Extract of *Mikania scandens* (L.) Willd. Leaves. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 4 (1): 1-7.
- Huang, D. Ou, B. dan Prior, R.L. 2005., The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856.
- Jayasri, M.A. Mathew, L. dan Radha, A. 2009., A report on the antioxidant activity of leaves and rhizomes of *Costus pictus* D. Don. *International Journal Integrative Biology* 5(1) : 20-26.
- Kahkonen, M.P. Hopia, A.I. dan Heinonen. 2001., Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4076-4082.
- Kim, D.O. Lee, K.W. Lee, H.J. Lee, C.Y. 2002., Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3713-3717.
- Kosuar, M.B. Dorman, H.J.D. Basuer, K.H.C. dan Hiltunen R. 2004., Screening of Free Radical Scavenging Compounds in Water Extracts of Mentha Sampels Using a Postcolumn Derivatization Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5004-5010.
- Kumar, S. Kumar, D. Manjusha, Saroha, K. Singh, N. dan Vashishta, B. 2008., Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharmacology* 58 : 215–220.
- Kumaran, A. dan Karunakaran, R.J. 2007., In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT* 40 : 344–352.
- Li, C. Du, H. Wang, L.S.Shu, Q.Y. Zheng, Y. Xu, Y. Zhang, J.J. Zhang, J. Yang, R. dan Ge, Y. 2009., Flavonoid Composition and Antioxidant Activity of Tree Peony (*Paeonia* Section Moutan) Yellow Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 8496–8503.
- Luger, P. Weber, M. Dung, N.X.Ngoc, P.H., Tuong, D.T. dan Rang, D.D. 2000., The crystal structure of hop-17(21)-en-3 $\beta$ -yl asetat of *Pluchea pteropoda* Hemsl. from Vietnam. *Crystal Res Technology* 35(3) : 355-362.
- Magalhaes, L.M. Segundo, M.A. Reis, S. Lima, J.L.F.C. dan Rangel, A.O.S.S. 2006., Automatic method for the determination of folin-ciocalteu reducing capacity in food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5241-5246.
- Matricardi, M. Hesketh, R. dan Farrell, S. 2009., Effect of operating conditions on static/dynamic extraction of peanut oil using supercritical carbon dioxide. <http://www.Supercritical.com/publications/peanutoilextraction> by SF/ 1 November 2009
- Moein, S. Farzami, B. Khaghani, S. Moein, M.R. dan Larijani, B. 2007., Antioxidant properties and prevention of cell cytotoxicity of *Phlomis Persica* Boiss. *DARU* 15(2) : 83.
- Nakiboglu, M. Urek, R.O. Kayali, H.A. dan Tarhan, L. 2007., Antioxidant capacities of endemic *sideritis sipylea* and *origanum sipyleum* from turkey. *Food Chemistry* 104: 630–635.

- Orhan, I. Kartal, M. Asaker, M.A. Senol, F.S. Yilmaz, G. Sener, B. 2009., Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants. *Food Chemistry* 114 : 276–281.
- Pinelo, M. Tress, A.G. Pedersen, M. Amous, A. dan Meyer, A.S. 2007., Effect of Cellulases, solvent type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds. *American Journal of Food Technology* 2(7):641-651.
- Tapas, A. Sakarkar, D.M. dan Kakde, R.B. 2008., Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7(3) : 1089-1099.
- Traithip, A. 2005., *Phytochemistry and antioxidant activity of Pluchea indica*. [Thesis] Mahidol University. Thailand.
- Saffan, S.E.S. dan El-Mousallamy, A.M.D. 2008. Allelopathic effect of *Acacia raddiana* leaf extract on the phytochemical contents of germinated *Lupinus termis* Seeds. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(3): 270-277.
- Schaller, H. 2003. Review the role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research*, 42 (2003) 163–175.
- Sembiring, M.T. dan Sinaga, T.S. 2003. Arang aktif (Pengenalan dan Proses Pembuatannya), hal 1-9. USU digital library, Sumatera Utara.
- Shan, B. Cai, Y. Z. Sun, M. dan Corke, H. 2005., Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7749-7759.
- Sharma, O.P. dan Bhat, T.K. 2009., Analytical methods dpph antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113: 1202–1205.
- Soeksmanto, A. Hapsari, Y. dan Simanjuntak, P. 2007., Antioxidant content of parts of mahkota dewa, *Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl. (Thymelaceae). *Bioversitas* ISSN: 1412-033X. 8 (2): 92-95.
- Svedas, V. 1998., Cellulose-water vapour interaction investigated by spectrometric and ultra high frequency methods. *Journal of Physical D: Applied Physical* 31 : 1752-1756.
- Yu Lin, H. Kuo, Y.H. Lin, Y.L. dan Chiang, W. 2009., Antioxidative effect and active components from leaves of lotus (*Nelumbo nucifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6623–6629.