

**PERBANDINGAN KADAR FLAVONOID SEBAGAI MARKER ANTI
RADIKAL BEBAS PADA EKSTRAK ETANOLIK DAUN BELUNTAS
(*Pluchea indica* L.) YANG TUMBUH DI DATARAN RENDAH
(MARGOYOSO) DAN TINGGI (COLO)**

Skripsi

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)



Oleh :

Nur Hariyati

33101800063

**PROGRAM STUDI FARMASI FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2023

Skripsi

**PERBANDINGAN KADAR FLAVONOID SEBAGAI MARKER ANTI RADIKAL
BEBAS PADA EKSTRAK ETANOLIK DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* L.) YANG
TUMBUH DI DATARAN RENDAH (MARGOYOSO) DAN TINGGI (COLO)**

Dipersiapkan dan disusun oleh :

Nur Hariyati

33101800063

Telah dipertahankan didepan Tim Penguji

Pada tanggal 28 Juli 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I

Anggota Tim Penguji 1

Dr. Apt. Naniek Widyaningrum, M.Sc

Apt. Ika Buana Januarti, M.Sc

Pembimbing II

Anggota Tim Penguji II

Apt. Hudan Taufiq, M.Sc

Dwi Endah Kusumawati, M.Si

Semarang, 28 Juli 2023

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,



Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF., S.H

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN

Yang Bertanda Tangan Di Bawah Ini :

Nama : Nur Hariyati

NIM : 33101800063

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul :

**“ PERBANDINGAN KADAR FLAVONOID SEBAGAI MARKER ANTI
RADIKAL BEBAS PADA EKSTRAK ETANOLIK DAUN BELUNTAS
(*Pluchea indica* L) YANG TUMBUH DI DATARAN RENDAH
(MARGOYOSO) DAN TINGGI (COLO) “**

Adalah benar karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil sebagian atau seluruh hasil karya tulis ilmiah orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Apabila dikemudian hari saya terbukti melakukan tindakan plagiat tersebut maka saya siap menerima sanksi apapun termasuk pencabutan gelar sarjana yang telah diberikan.

Semarang, 28 Juli 2023

Yang Menyatakan,


METERAI TEMPEL
Nur Hariyati
3D IC5AJX124534198

PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Nur Hariyati

NIM : 33101800063

Program Studi : Farmasi

Fakultas : Kedokteran

Alamat : Desa Purworejo Kedung, Jl. Tambak Buntu, Kec. Margoyoso,
Kab. Pati

No HP/ Email : 082323184564/ nurhariyati205@gmail.com

Dengan ini menyatakan karya tulis ilmiah berupa skripsi dengan judul:

**“PERBANDINGAN KADAR FLAVONOID SEBAGAI MARKER ANTI
RADIKAL BEBAS PADA EKSTRAK ETANOLIK DAUN BELUNTAS
(*Pluchea indica* L) YANG TUMBUH DI DATARAN RENDAH
(MARGOYOSO) DAN TINGGI (COLO)”**

Dan menyetujuinya menjadi milik Universitas Islam Sultan Agung Semarang serta memberikan Hak Bebas Royalti Non Eksklusif untuk disimpan, dialih mediakan, dikelola dalam pangkalan data dan dipublikasikan di internet atau media lain untuk kepentingan akademis selama tetap mencantumkan nama penulis sebagai pemilik hak cipta. Apabila dikemudian terbukti ada pelanggaran Hak Cipta/ Plagiarisme dalam karya ilmiah ini, maka segala bentuk tuntutan hukum yang timbul akan saya tanggung secara pribadi tanpa melibatkan Universitas Islam Sultan Agung.

Semarang, 28 Juli 2023

Yang Menyatakan,



Nur Hariyati

PRAKATA

Assalamu'alaikum Wr Wb.

Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan nikmat, rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan penyusunan skripsi ini dengan judul **“PERBANDINGAN KADAR FLAVONOID SEBAGAI MARKER ANTI RADIKAL BEBAS PADA EKSTRAK ETANOLIK DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* L) YANG TUMBUH DI DATARAN RENDAH (MARGOYOSO) DAN TINGGI (COLO)”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung.

Dalam proses penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapatkan bimbingan serta arahan dari berbagai pihak. Untuk itu ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis sampaikan terutama kepada :

1. Bapak Prof. Dr. H.Gunarto, SH., M. Hum., selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Bapak Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF., SH selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Ibu apt. Rina Wijayanti, M.Sc. selaku Ketua Prodi Farmasi Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
4. Ibu Apt. Dr. Naniek Widyaningrum, M.Sc selaku pembimbing I dan Bapak Apt. Hudan Taufiq, M.Sc selaku pembimbing II yang telah senantiasa

membimbing, mengarahkan dan memotivasi penulis dalam menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

5. Ibu Apt. Ika Buana Januarti., M.Sc selaku penguji I dan Ibu Dwi Endah Kusumawati, M.Si Selaku penguji II yang telah memberikan saran dan masukan kepada penulis.
6. Segenap civitas akademika Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang terutama seluruh dosen, terima kasih atas segala ilmu dan bimbingannya.
7. Bapak Harsono dan Ibu Siti Djuwaeriyah, S.Pd. I tercinta serta adek Anik Nurhidayah dan Muhammad Mi'raj Hambali, A.Md.T, yang senantiasa memberikan cinta kasih, berkat, doa dan dukungannya dari waktu ke waktu.
8. Sahabat terdekat Farmasi di kost jasmine, sahabat di Pati dan teman dekat saya serta semua pihak yang selalu mendoakan, memberi dukungan, motivasi dan semangat dalam penyusunan skripsi ini.

Dengan segala kerendahan hati penulis telah berusaha menyelesaikan skripsi ini, apabila masih terdapat kekurangan dan kelemahan yang terdapat pada skripsi ini maka saran dan kritik yang bersifat membangun dari pembaca akan diterima untuk penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat menjadi bahan informasi yang bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan di bidang farmasi.

Wassalamu'alaikum Wr Wb.

Semarang, 28 Juli 2023



Nur Hariyati



DAFTAR ISI

PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR SINGKATAN/ISTILAH.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
INTISARI.....	xvi
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.3.1 Tujuan Umum.....	2
1.3.2 Tujuan Khusus.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	3
1.4.2 Manfaat praktis.....	3
BAB II.....	4
TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tanaman Beluntas (<i>Pluchea indica</i> L).....	4

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Beluntas.....	4
2.1.2 Morfologi Tanaman Beluntas.....	5
2.1.3 Kandungan Kimia.....	5
2.1.4 Khasiat.....	6
2.2 Kriteria daun dan waktu pengambilan.....	6
2.3 Ekstraksi.....	7
2.3.1 Ekstraksi.....	7
2.3.2 Maserasi.....	8
2.4 Flavonoid.....	8
2.4.1 Kuersetin.....	9
2.5 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Kadar Metabolit Sekunder.....	11
2.6 Radikal Bebas.....	15
2.7 Flavonoid Sebagai Anti Radikal Bebas.....	16
2.8 Metode Pengujian Aktivitas Anti Radikal Bebas.....	17
2.9 Spektrofotometer UV-Vis.....	19
2.10 Hubungan Antara Ketinggian Tempat Tumbuh Dengan Konsentrasi Flavonoid Sebagai Marker Anti Radikal Bebas Pada Beluntas.....	19
2.11 Kerangka Teori.....	21
2.12 Kerangka Kosep.....	21
2.13 Hipotesis.....	21
BAB III.....	22
METODE PENELITIAN.....	22

3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	22
3.2 Variabel dan Definisi Operasional.....	22
3.2.1 Variabel.....	22
3.2.2 Definisi Operasional.....	22
3.3 Populasi dan sampel penelitian.....	23
3.3.1 Populasi penelitian.....	23
3.3.2 Sampel Penelitian.....	24
3.4 Instrumen dan Bahan Penelitian.....	24
3.4.1 Instrumen Penelitian.....	24
3.4.2 Bahan Penelitian.....	24
3.5 Prosedur Penelitian.....	25
3.5.1 Pengecekan Faktor Lingkungan.....	25
3.5.2 Determinasi Tanaman.....	25
3.5.3 Pembuatan Ekstrak Etanolik Daun Beluntas.....	25
3.5.4 Penentuan Kadar Flavonoid Pada Ekstrak Daun Beluntas.....	26
3.5.5 Uji Aktivitas Anti Radikal Bebas.....	31
3.6 Alur penelitian.....	35
3.7 Tempat dan Waktu Penelitian.....	36
3.7.1 Tempat.....	36
3.7.2 Waktu.....	36
3.8 Analisis Hasil.....	36
BAB IV.....	37

HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
4.1 Hasil Penelitian.....	37
4.1.1 Determinasi Tanaman dan Penentuan Profil Tempat Tumbuh.....	37
4.1.2 Ekstraksi.....	38
4.1.3 Hasil Uji Kualitatif Ekstrak daun beluntas (<i>Pluchea indica</i> L).....	39
4.1.4 Penetapan Kadar Kuersetin dan Rutin.....	39
4.1.5 Pengujian Aktivitas Anti Radikal Bebas EEDB Dengan Metode DPPH.....	40
4.1.6 Analisis Hasil.....	41
4.2 Pembahasan.....	43
4.2.1 Determinasi Tanaman Beluntas.....	43
4.2.2 Pengecekan Faktor Lingkungan.....	43
4.2.3 Ekstraksi.....	43
4.2.4 Uji Kuliatif Flavonoid.....	47
4.2.5 Penetapan Kadar Kuersetin.....	47
4.2.6 Penetapan Kadar Rutin.....	50
4.2.7 Pengujian Aktivitas Anti Radikal Bebas EEDB dengan Metode DPPH.....	51
4.2.8 Keterbatasan Penelitian.....	53
BAB V.....	54
KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
5.1 KESIMPULAN.....	54
5.2 SARAN.....	55
DAFTAR PUSTAKA.....	56

LAMPIRAN.....	64
---------------	----

DAFTAR SINGKATAN/ISTILAH

ANOVA	: <i>Analysis Of Variance</i>
DPPH	: <i>2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl</i>
C°	: <i>Celsius</i>
cm	: Centimeter
EEDB	: Ekstrak Etanolik Daun Beluntas
g	: Gram
HCl	: <i>Hydrogen Chloride</i> atau Hidrogen klorida
IC ₅₀	: <i>Inhibitory Concentration Of 50%</i>
Kg	: Kilogram
M	: Meter

mg : Miligram

mm : Milimeter

mL : Mili Liter

NaOH : Natrium Hidroksida

nm : nanometer

Ppm : *Parts Per Million*

µg : Mikrogram

ROS : *Reactive Oxygen Species*

UV-Vis : *Ultra Violet-Visible*



DAFTAR GAMBAR



DAFTAR TABEL



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Keterangan Selesai Penelitian.....	64
Lampiran 2 Hasil Determinasi Tanaman.....	65
Lampiran 3 Hasil uji Kadar Air simplisia dan Ekstrak EEDB Colo Margoyoso.....	67
Lampiran 4 Hasil Rendeman Ekstrak.....	69
Lampiran 5 Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanolik Daun Beluntas.....	70
Lampiran 6 Hasil Uji DPPH Kuersetin serta Ekstrak Etanolik Daun Beluntas Margoyoso Dan Colo.....	75
Lampiran 7 Hasil Uji SPSS.....	79
Lampiran 8 Dokumentasi Penelitian.....	83

INTISARI

Daun beluntas (*Pluchea indica* L) banyak digunakan sebagai obat herbal untuk mengobati berbagai penyakit. Kandungan senyawa terkandung dalam daun beluntas antara lain flavonoid, lignan dan tanin berkhasiat sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan substansi yang dapat memberikan perlindungan dari kerusakan akibat radikal bebas. Daun beluntas diketahui memiliki aktivitas anti radikal bebas tetapi tempat tumbuh optimal untuk menghasilkan aktivitas yang kuat belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan kadar flavonoid sebagai marker anti radikal bebas pada ekstrak etanolik daun beluntas (EEDB) yang tumbuh di dataran rendah Margoyoso dan tinggi Colo.

Penelitian ini bersifat analitik observasional menggunakan rancangan penelitian *cross sectional*. Daun diperoleh dari dataran rendah Margoyoso dan tinggi Colo diuji kadar kuersetin, kadar rutin dan aktivitas antiradikal bebas menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin*). Aktivitas antiradikal bebas dan kadar kuersetin dianalisis menggunakan uji *Mann Whitney* dan kadar rutin diuji menggunakan *independent T-Test*.

Hasil penelitian menunjukkan kadar kuersetin EEDB dari Margoyoso dan Colo berturut – turut 73,10 dan 82,40 ppm. Kadar rutin EEDB dari Margoyoso dan Colo adalah 36,37 dan 58,31 ppm. Adapun kadar aktivitas antiradikal bebas ekstrak etanolik daun beluntas (EEDB) Margoyoso dan Colo sebesar 127,811 dan 71,561 ppm perbedaan hasil dipengaruhi faktor ketinggian, pH tanah, paparan sinar matahari dan habitat.

Kesimpulan penelitian ini adalah terdapat perbedaan antara kadar kuersetin, kadar rutin, dan aktivitas anti radikal bebas ekstrak etanolik daun beluntas (EEDB) dari dataran rendah Margoyoso dan tinggi Colo. Aktivitas antiradikal bebas (EEDB) dari Margoyoso masuk kategori sedang dan dari Colo berkategori kuat.

Kata kunci : Daun beluntas (*Pluchea indica* L), antiradikal bebas, DPPH, IC₅₀

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lebih dari 30.000 spesies tumbuhan tingkat tinggi, Indonesia adalah tempat yang memiliki banyak sekali jenis tumbuhan dan hewan (Riskiyani *et al.*, 2020). Pemanfaatan tanaman sebagai obat perlu memperhatikan kandungan senyawa dan kadar marker dari tanaman yang akan dipakai sehingga dapat dijamin khasiat efek dan keamanannya. Salah satu contoh tanaman yang dapat kita temui di pekarangan rumah dan bermanfaat sebagai obat adalah tanaman beluntas (Sibarani *et al.*, 2013).

Beluntas sendiri merupakan salah satu tanaman dari famili Asteraceae, biasanya tumbuh di daerah kering pada tanah yang keras dan berbatu, pada daerah dataran rendah hingga dataran tinggi (Widyawati *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Wanita (2019), ekstrak etanol dari daun beluntas mengandung fenolik seperti flavonoid, lignan, dan tanin, yang mempunyai kerja antioksidan kuat sebab IC_{50} kurang dari 50 ppm. Namun demikian tempat tumbuh beluntas yang optimal belum diketahui.

Penelitian yang dilakukan oleh Rubani (2022), menunjukkan bahwa tempat tumbuh pada altitude tinggi ($26,57 \pm 0,24$) ketinggian (1000–1400) mdpl memiliki total flavonoid terbesar dibandingkan dengan altitude rendah ($5,63 \pm 0,26$) ketinggian (200–600) mdpl dan sedang ($10,28 \pm 0,28$) ketinggian (600–1000) mdpl yaitu signifikan dalam produksi dan akumulasi

metabolit primer dan sekunder, terutama metabolit sekunder yang dapat menjadi senyawa penanda (marker) (Rachmadiarti *et al.*, 2019). Faktor yang dapat mempengaruhi kandungan senyawa metabolit dan kadar marker selain ketinggian tempat tumbuh adalah suhu, cahaya, kelembaban, nilai pH atau kualitas tanah di tempat tumbuh (Safrina & Priyambodo, 2018 ; Hadiyanti & Pardono, 2018).

Penelitian yang dilakukan oleh Koirewoa *et al.* (2013), menyatakan bahwa hasil isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid daun beluntas adalah golongan flavonol yaitu kuersetin dan rutin. Penelitian lain oleh Widyawati *et al.* (2018) menunjukkan bahwa senyawa flavonoid memberikan kontribusi sebesar 63,1 persen dari kemampuan melawan radikal bebas secara keseluruhan dalam penelitiannya. Berdasarkan uraian yang telah dipaparkan diketahui ekstrak daun beluntas memiliki aktivitas anti radikal bebas dikarenakan memiliki kandungan senyawa marker flavonoid, tetapi tempat tumbuh optimal dari tumbuhan beluntas untuk menghasilkan aktivitas yang kuat tersebut belum diketahui.

Daun beluntas yang tumbuh di daerah Margoyoso dan Colo juga banyak tumbuh dipekarangan warga dan dikonsumsi oleh masyarakat sekitar tanpa mengetahui kandungan dan khasiatnya yang ada didalam daun beluntas tersebut. Jadi, peneliti ini tertarik melakukan penelitian mengenai perbandingan profil flavonoid sebagai marker anti radikal bebas pada ekstrak etanolik daun beluntas (*Pluchea indica* L) tumbuh di dataran rendah Margoyoso dan dataran tinggi Colo.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, pertanyaan penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut:

Bagaimana perbandingan kadar flavonoid sebagai marker anti radikal bebas pada ekstrak etanolik daun beluntas (*Pluchea indica* L) yang tumbuh di dataran rendah Margoyoso dan tinggi Colo?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui perbandingan kadar flavonoid sebagai marker anti radikal bebas pada ekstrak etanolik daun beluntas (*Pluchea indica* L) yang tumbuh di dataran rendah Margoyoso dan tinggi Colo.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui kadar flavonoid berdasarkan kadar kuersetin dan kadar rutin pada ekstrak etanolik daun beluntas (*Pluchea indica* L) antara dataran rendah Margoyoso dan tinggi Colo.
2. Mengetahui aktivitas anti radikal bebas pada ekstrak etanolik daun beluntas (*Pluchea indica* L) antara dataran rendah Margoyoso dan tinggi Colo dengan menggunakan metode DPPH.
3. Mengetahui perbedaan profil tempat tumbuh berdasarkan faktor ketinggian, pH tanah, paparan sinar matahari dan habitat di sekitarnya pada ekstrak etanolik daun beluntas (*Pluchea indica* L) antara dataran rendah Margoyoso dan tinggi Colo.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Diharapkan penelitian ini akan memberikan informasi tentang kadar marker flavonoid dan aktivitas anti radikal bebas daun beluntas (*Pluchea indica* L) di daerah Margoyoso dan Colo.

1.4.2 Manfaat praktis

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber acuan dalam melakukan standarisasi tanaman obat daun beluntas (*Pluchea indica* L).



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Beluntas (*Pluchea indica* L)

Gambar daun tanaman beluntas dapat dilihat pada gambar 2.1



Gambar 2. 1 Daun Tanaman Beluntas (*Pluchea indica* L)
(Dokumentasi Pribadi, 2022)

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Beluntas

Klasifikasi tanaman (*Pluchea indica* L) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Super Divisi : Spermatophyta

Divisio : Magnoliophyta

Classis : Magnoliopsida

SubClassis : Asteridae

Ordo : Asterales

Familia : Asteraceae

Genus : *Pluchea*

Species : *Pluchea indica* (L.)

(Fitriansyah & Raden, 2017).

2.1.2 Morfologi Tanaman Beluntas

Beluntas adalah tanaman perdu tegak, bercabang banyak dan memiliki ketinggian 0,5 - 2 m. Daun beluntas berambut dan berwarna hijau muda. Helaian daun beluntas berbentuk oval elips atau bulat telur terbalik dengan pangkal daun runcing dan tepi daunnya bergigi. Letak daun beluntas berseling, bertangkai pendek dengan panjang daun sebesar 2,5 - 9 cm dan lebar 1 cm. Bunga beluntas adalah bunga majemuk dengan bentuk kepala kecil yang terkumpul pada sambungan terminal pada umbi pipih, kepala sarinya berwarna ungu, dan putiknya memiliki dua cabang yang menonjol berwarna ungu. Buah dari tanaman beluntas berbentuk gasing, keras dan berwarna coklat. Buah beluntas berukuran sangat kecil, panjang 1 mm, berbiji tidak besar dan warnanya coklat bercampur putih (Khodaria, 2013).

2.1.3 Kandungan Kimia

Penelitian yang dilakukan oleh Ahemd (2013), tumbuhan beluntas juga mengandung fenol, saponin, sterol, dan minyak atsiri, lorgenik, alumunium, magnesium, dan fosfor, serta banyak senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, alkaloid, sesquiterpenoid, monoterpen, glikosida, lignan, dan triterpenoid (Widyawati et al., 2014). Daun beluntas memiliki banyak senyawa fitokimia, termasuk lignan, terpena, fenilpropanoid, bensoid, alkana, sterol, 2- (prop-1-unil)-5- (5,6-dihidroksi heksa-1,3-diunil) tiofena, (-) katekin, fenol

hidrokuinon, saponin, tanin, alkaloid, dan flavonol, seperti kuersetin, kaemferol, dan mirisetin (Wanita, 2019).

2.1.4 Khasiat

Beluntas adalah jenis tanaman khusus yang telah lama digunakan orang untuk membantu mereka merasa lebih baik dan bisa melakukan banyak hal baik untuk tubuh kita, seperti membuat nafas harum, membantu perut merasa lebih baik, dan bahkan membuat tulang dan punggung tidak terlalu sakit atau dapat membantu masalah lain seperti demam dan masalah tertentu yang mungkin dialami anak perempuan. Semua kebaikan tersebut berasal dari zat kimia khusus yang ada pada daun tanaman beluntas (Fitriansyah & Raden, 2017). Fitokimia yang terkandung dalam daun beluntas juga memiliki beberapa efek biologis, termasuk efek antioksidan (Wanita, 2019).

2.2 Kriteria daun dan waktu pengambilan

Pengambilan daun dilakukan pada daun yang memiliki kondisi yang baik antara lain berwarna hijau muda, tidak busuk dan tidak berlubang dimakan serangga. Pengambilan daun diambil dari urutan ke 1-6 (dari pucuk daun) karena pada bagian tersebut merupakan daun yang paling baik sehingga memiliki kandungan zat yang lebih banyak (Wicaksono *et al.*, 2019).

Pada pagi hari, daun mulai membuka stomata (lubang-lubang kecil) sedikit, tetapi lubangnya masih kecil. Sekitar jam 9-10 jumlah stomata bertambah dan lubang terbesar semakin lebar. Pada jam 11, stomata mulai

mengecil lagi. Pukul 12:00 siang. stomata menjadi jauh lebih kecil. Pada pukul 14:00. ada lonjakan lagi dan pada pukul 15.00-17.00. WIB turun lagi. Pengambilan sampel berlangsung antara pukul 09:00 dan 10:00. Ini berkaitan dengan pembukaan stomata; ini terkait dengan transpirasi dan fotosintesis, serta dengan cara stomata mengeluarkan cairan dari sel selama transpirasi (Fatonah *et al.*, 2013).

2.3 Ekstraksi

2.3.1 Ekstraksi

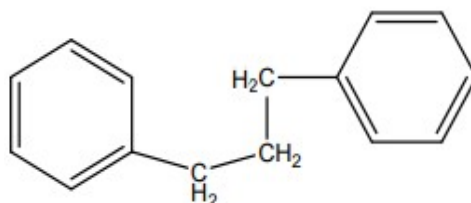
Proses pemisahan bahan campuran dengan pelarut yang sesuai dengan kandungan tumbuhan dikenal sebagai ekstraksi. Ekstraksi adalah tentang menghilangkan komponen kimia yang ditemukan pada tanaman. Bahan tanaman yang digunakan, pelarut yang dipilih, dan metode yang digunakan adalah beberapa komponen yang mempengaruhi efisiensi ekstraksi. Untuk mendapatkan hasil terbaik, metode dan pelarut yang dipilih harus dipilih dengan benar (Agustina, 2017). Sesuai dengan konsep pelarut yang sama, pelarut polar dapat larut dalam pelarut polar dan senyawa non-polar dapat larut dalam pelarut non-polar. Jenis pelarut pengestraksi juga dapat mempengaruhi jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak (Arifianti *et al.*, 2014).

2.3.2 Maserasi

Maserasi merupakan suatu cara untuk mengeluarkan zat-zat baik dari tumbuhan seperti memasukkan bubuk tanaman dan cairan khusus ke dalam wadah tertutup. Proses ekstraksi dihentikan ketika sudah tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, kemudian pelarut dipisahkan dari sampel dengan cara penyaringan. Kekurangan dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu yang cukup lama, pelarut yang digunakan cukup banyak dan kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi ini menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Ibrahim *et al.*, 2016).

2.4 Flavonoid

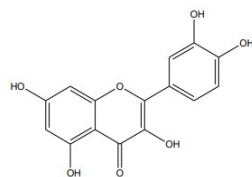
Flavonoid memiliki berbagai efek bioaktif, seperti antiinflamasi, antipenuaan, antioksidan, dan antivirus. Flavonoid adalah polifenol berkarbon 15 dengan konfigurasi C6–C3–C6, artinya kerangka karbonnya terdiri dari dua gugus C6 (cincin benzena tersubstitusi) yang terhubung oleh rantai alifatik tiga karbon. Jumlah flavonoid yang diperlukan untuk tumbuhan bervariasi dari 20 mg hingga 500 mg. Flavonoid meningkatkan warna buah, bunga, dan daun menjadi kuning, merah, oranye, biru, dan ungu. Flavonoid termasuk dalam famili polifenol yang larut dalam air (Arifin & Ibrahim, 2018). Gambar Struktur flavonoid dapat dilihat pada gambar 2.2



Gambar 2. 2 Struktur flavonoid
(Noer *et al.*, 2018)

2.4.1 Kuersetin

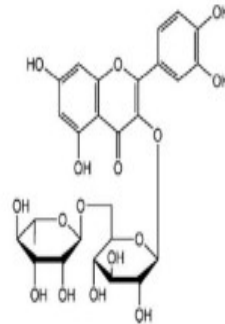
Kuersetin, yang termasuk dalam kelompok flavonol, adalah senyawa flavonoid utama yang ditemukan di banyak tumbuhan dan makanan, termasuk buah-buahan. Kuersetin juga bermanfaat bagi kesehatan manusia. Kuersetin memberikan protonnya ke senyawa radikal saat flavonol kuersetin bereaksi dengan radikal bebas. Akibatnya, bahan ini sangat efektif dalam menghambat radikal bebas DPPH (Maesaroh *et al.*, 2018). Kuersetin juga memiliki efek biologis lainnya, seperti antivirus, antibakteri, anti-inflamasi, dan anti-kanker yang membantu dalam mencegah beberapa jenis kanker. Selain itu, kuersetin dapat membentuk kompleks dengan logam (Widyasari *et al.*, 2019). Sifat fisik dan kimia kuercetin meliputi berat molekul 302,23 g/mol rumus molekul $C_{15}H_{10}O_7$ titik lebur 316,5 °C bentuk jarum kuning atau bubuk kuning larut dalam eter dan metanol larut dalam aseton-etanol larut dalam aseton-etanol, piridin dan asam asetat dan tidak larut dalam air (Pubchem, 2023^a). Gambar struktur kuersetin dapat dilihat pada gambar 2.3



Gambar 2. 3 Struktur kuersetin
(Ruswanto *et al.*, 2018)

2.4.2 Rutin

Rutin (Quercetin-3-O- β -rutoside) merupakan jenis glikosida yang paling terkenal berasal dari flavonol quercetin. Flavonol sendiri tersebar luas pada tanaman sebagai pigmen antosianin pada kelopak bunga dan dalam jumlah banyak pada daun tanaman. Flavonol umumnya ditemukan sebagai glikosida dalam bentuk umum termasuk kaempferol, quercetin, myricetin, succacetin, pachypodol, dan rhamnazine. Dimana sumber utamanya berasal dari buah – buhan dan tumbuhan seperti Apel, teh, tomat, anggur merah, cerry, bawang, brokoli, buah peel, letus, gandum, asam citrus, mangga (Arifin & Ibrahim, 2018). Sebagai komponen antioksidan, rutin merupakan penjaga (*protective*) kesehatan yang memiliki manfaat sebagai antiinflamasi, antikanker, antihipertensi, menurunkan kolesterol (Ruswanto *et al.*, 2018). Sifat – sifat fisika kimia rutin meliputi berat molekul 610,5 g/mol, rumus molekul $C_{27}H_{30}O_{16}$ dan titik lebur 125°C (Pubchem, 2023^b). Memiliki kelarutan tidak larut dalam kloroform, eter, benzene, dan petroleum eter, sukar larut dalam alkohol, aseton, dan etil asetat (Auha & Alauhdin, 2021). Gambar Struktur rutin dapat dilihat pada gambar 2.4



Gambar 2. 4 Struktur rutin
(Auha & Alauhdin, 2021)

2.5 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Kadar Metabolit Sekunder

2.5.1 Cahaya

Cahaya matahari merupakan salah satu faktor yang menjadi pembatas pada tumbuhan. Intensitas sinar matahari yang lebih rendah dapat mempengaruhi pertumbuhan, anatomi, dan morfologi, mempengaruhi fisiologi sel dan proses biokimia, dan mengurangi ukuran daun melalui pengaturan pembelahan sel (Saputri *et al.*, 2019). Daun dapat mengalami berbagai perubahan fisiologis dan morfologis sebagai hasil dari penyerapan cahaya. Penyerapan cahaya yang optimal secara langsung mempengaruhi proses fotosintesis, yang berdampak pada pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder (Yustiningsih, 2019).

2.5.2 Suhu

Suhu udara semakin rendah seiring dengan meningkatnya suatu tempat, karena suhu yang diterima oleh permukaan bumi semakin kecil. Peningkatan suhu udara menyebabkan peningkatan laju fotosintesis,

sedangkan penurunan suhu udara dapat memperlambat laju reaksi dan menurunkan hasil metabolit tanaman sehingga menghambat aktivitas fotosintesis. Ini secara langsung mempengaruhi produksi metabolit sekunder yang dihasilkan dari reaksi lebih lanjut dari metabolit primer tanaman (Hadiyanti & Pardono, 2018).

Suhu lingkungan rendah selama musim dingin, akan mempengaruhi metabolisme tanaman beriklim sedang yang mengarah pada sintesis molekul krioprotektan seperti alkohol gula, gula larut, dan senyawa nitrogen dengan berat molekul rendah. Produksi fenolik dan flavonoid dapat ditingkatkan oleh stres dingin, yang kemudian akan masuk ke dalam dinding sel sebagai lignin atau suberin (Rubani, 2022). Namun, suhu yang tinggi dapat menyebabkan tanaman menghasilkan metabolit sekunder, yaitu antioksidan, untuk melawan radikal bebas yang disebabkan oleh suhu. Untuk melindungi tanaman dari tekanan lingkungan, tanaman juga menghasilkan flavonoid total yang lebih tinggi (Utomo *et al.*, 2020).

2.5.3 pH tanah

Tanah dengan pH rendah memiliki saturasi kation basa yang rendah (saturasi kation basa rendah), sedangkan tanah dengan pH tinggi memiliki saturasi kation basa yang tinggi. Kation basa termasuk Mg^{+} , Ca^{+} , Na^{+} , dan K^{+} , dan mereka adalah nutrisi penting bagi tanaman. Namun, kation basa mudah larut. Oleh karena itu, tanah dengan

kejenuhan tanah yang tinggi subur dan tidak mengandung banyak larutan (Roni, 2015).

Tanah dengan kejenuhan alkali rendah memiliki lebih banyak kompleks serapan yang diisi dengan kation asam. Akibatnya, tanah akan menjadi lebih asam dalam situasi di mana ada jumlah kation asam yang terlalu tinggi, terutama Al^{3+} . Tanah dengan pH tinggi (pH lebih dari 7) adalah tanah basa atau berkapur dengan kandungan $CaCO_3$ tinggi yang dapat mencapai 95% dan sifat fisik tanah yang buruk, kekurangan air dan aerasi tanah, kandungan HCO_3^- tinggi, dan kekurangan Mn, P, Zn, dan Fe dengan toksisitas Na dan B. Kondisi tanah ini mengganggu asupan unsur hara dan proses metabolisme tanaman. Produksi metabolit tanaman dapat berubah karena hal ini (Wiraatmaja, 2017).

2.5.4 Kelembapan tanah

Kelembapan tanah tergantung pada kandungan air tanah. Tanah kering yang memiliki kelembapan rendah menunjukkan bahwa ada sedikit air di dalam tanah. Air adalah reagen penting dalam proses hidrolik dan fotosintesis. Air berfungsi sebagai pelarut dari hara, garam, gas, dan beberapa material yang bergerak di dalam tumbuhan, melalui dinding sel ataupun jaringan esensial untuk memastikan adanya turgiditas, pertumbuhan sel, pembukaan dan penutupan stomata, konsistensi bentuk daun, serta kelangsungan gerak struktur tumbuhan. Peranan air yang penting tersebut dapat mengakibatkan konsekuensi

secara langsung maupun tidak langsung. Tumbuhan yang kekurangan air akan mempengaruhi seluruh proses metabolisme (Wiraatmaja, 2017).

Setiap spesies tanaman memiliki respons metabolisme yang berbeda terhadap perubahan iklim, jadi kelembaban tanah dapat mempengaruhi proses pertumbuhan. Selain itu, ada elevasi yang terkait dengan kelembaban karena perbedaan curah hujan dan potensi evapotranspirasi. Kondisi-kondisi ini juga dapat secara tidak langsung mempengaruhi perkembangan dan proses pertumbuhan (Karyati *et al.*, 2018).

2.5.5 Tempat Tumbuh

Ketinggian suatu tempat tumbuh dapat mempengaruhi iklim meliputi intensitas cahaya, kualitas radiasi, suhu, kelembaban, curah hujan, konsentrasi CO₂, O₂, musim, panjang hari, dan kondisi tanah seperti kimia, fisik serta biologi tanah. Ketinggian suatu habitat tanaman akan mempengaruhi pertumbuhan tanaman baik metabolisme primer maupun metabolisme sekunder. Banyak spesies tumbuhan telah beradaptasi dengan baik pada lingkungan yang berbeda melalui strategi yang berbeda, salah satu strategi tersebut yaitu dengan meningkatkan produksi metabolit sekunder. Oleh karena itu ketinggian habitat pada tempat tumbuh dapat mempengaruhi kondisi lingkungan, keanekaragaman hayati dan metabolit sekunder yang dihasilkan (Yuliani *et al.*, 2015).

2.5.4 Genetik

Salah satu faktor internal yang dapat mempengaruhi keberadaan metabolit sekunder yaitu genetik, fase pertumbuhan dan perkembangan tanaman, atau organ dan bagian dari tanaman itu sendiri. Faktor internal juga dapat mengendalikan perbedaan kandungan dan penampilan antara jenis tanaman yang sama (Magfiroh, 2017). Metabolisme sekunder pada tanaman dapat terbentuk melalui jalur tertentu dari metabolisme primer dan keberadaannya sebagai respon terhadap stimulus, sehingga faktor-faktor yang mempengaruhi metabolisme primer dapat mempengaruhi keberadaan metabolit sekunder. Pengaruh faktor lingkungan perlu ditekankan karena interaksinya dengan faktor genetik dalam ekspresi fenotipik metabolit sekunder. Ini karena potensi metabolisme sekunder organisme sumber (produksi, persistensi, dan efektivitas) dan pengaruhnya terhadap organisme target memiliki keragaman (Yuliani *et al.*, 2015).

2.6 Radikal Bebas

Radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan molekul yang terbentuk ketika molekul oksigen bergabung dengan molekul lain sehingga menghasilkan elektron ganjil. Molekul oksigen memiliki elektron berpasangan yang bersifat stabil, bila terdapat elektron tidak berpasangan pada orbit luarnya maka oksigen akan bersifat reaktif dan tidak stabil. ROS terbentuk secara endogen atau fisiologis dan eksogen. ROS endogen terbentuk secara fisiologis berasal dari hasil metabolisme normal tubuh.

Faktor eksogen berasal dari sumber lingkungan seperti radiasi ultraviolet, obat, polusi udara dan asap rokok. Pembentukan ROS paling banyak disebabkan oleh UVA (Andarina & Djauhari, 2017).

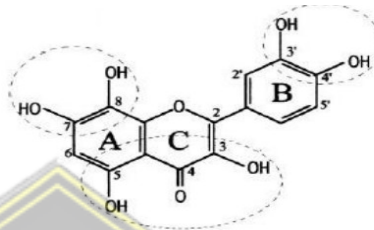
Radikal bebas dalam jumlah normal bermanfaat bagi kesehatan seperti memerangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengendalikan tonus otot polos pembuluh darah serta organ-organ dalam tubuh. Sebaliknya dalam jumlah yang berlebih dapat mengakibatkan stress oksidatif. Keadaan tersebut menyebabkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan, hingga ke organ tubuh yang mempercepat terjadinya proses penuaan dan munculnya penyakit. Oleh karena itu, antioksidan dibutuhkan untuk dapat menunda atau menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas (Kesuma, 2015).

2.7 Flavonoid Sebagai Anti Radikal Bebas

Salah satu metabolit sekunder yang memiliki aktivitas anti radikal bebas pada daun beluntas adalah senyawa flavonoid (Silalahi, 2019). Mekanisme kerja anti radikal bebas dalam flavonoid adalah mencegah pembentukan ROS, baik dengan menghambat enzim atau dengan mengikat elemen jejak yang terkait dengan pembentukan radikal bebas, sehingga mendeteksi ROS dan regulasi atau perlindungan pertahanan antioksidan ditingkatkan (Widiasari, 2018).

Efektivitas flavonoid sebagai antioksidan terutama ditunjukkan dengan adanya struktur orto-dihidroksi (katekol) pada cincin-B, adanya ikatan rangkap pada C2-3 yang terkonjugasi dengan gugus C4 okso-fungsional, dan gugus OH pada C3 pada cincin menentukan gugus C dan OH pada C5 pada

cincin A. C3 Kombinasi gugus -OH dan C5 OH dengan ikatan rangkap karbonil C4 dan C2-3 dapat meningkatkan penangkapan radikal bebas (Widyawati *et al.*, 2018). Gambar bagian struktur flavonoid yang memiliki aktivitas anti radikal bebas dapat dilihat pada gambar 2.5.



Gambar 2. 5 Bagian struktur flavonoid yang bertanggung jawab sebagai aktivitas anti radikal bebas (Widyawati *et al.*, 2018)

2.8 Metode Pengujian Aktivitas Anti Radikal Bebas

Berbagai metode, seperti ORAC (Kapasitas Absorbansi Radical Oksigen), TRAP (Kapasitas Antioksidan *Radical Trapping Total*), TEAC (Kapasitas Antioksidan Trolox Sebanding), PRSC (Kapasitas *Scavenging Radical Peroxyl*), DPPH (2,2-Diphenylpicrylhydrazyl), TOSC (Kapasitas Total Radical Oksigen), dan FRAP (Ferric Reducti (Hidayah *et al.*, 2015). Metode DPPH dapat digambarkan sebagai senyawa $C_{18}H_{12}N_5O_6$, yang merupakan radikal bebas stabil dan tidak membentuk dimer karena transfer elektron bebas ke seluruh molekul. Delokalisasi elektron bebas mengarah pada pembentukan warna ungu dalam larutan DPPH, yang memungkinkan absorbansi diukur pada panjang gelombang sekitar 520 nm (Maesaroh *et al.*, 2018).

Prinsip pengujian DPPH adalah bahwa intensitas warna ungu larutan DPPH berubah sebanding dengan konsentrasi larutan DPPH. Radikal bebas DPPH dengan elektron yang tidak berpasangan memiliki warna ungu, tetapi

ketika mereka berpasangan, warnanya menghilang dan berubah menjadi kuning. Perubahan intensitas warna ini terjadi karena reaksi molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan dari molekul senyawa sampel (Lukiyono *et al.*, 2020).

Perubahan warna menyebabkan perubahan absorbansi pada panjang gelombang maksimum DPPH, yang dapat diukur dengan spektrofotometer ultraviolet-tampak. Kemudian telah diketahui bahwa nilai konsentrasi hambat (IC_{50}) adalah ukuran aktivitas antioksidan. IC_{50} adalah nilai konsentrasi penghambat, yang berarti konsentrasi suatu senyawa uji yang memiliki kemampuan untuk mengurangi radikal bebas sebesar 50%. Semakin rendah nilai IC_{50} , semakin tinggi aktivitas penangkapan radikal bebas (Lukiyono *et al.*, 2020). Keunggulan DPPH adalah metode analitiknya sederhana, cepat, ringan dan sensitif terhadap sampel dengan konsentrasi rendah. DPPH juga memiliki kelemahan yaitu hanya dapat larut dalam pelarut organik, sehingga sulit untuk menganalisis senyawa hidrofilik (Wulansari, 2018). Tingkat Kekuatan Anti Radikal Bebas dengan Metode DPPH dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2. 1 Tingkat Kekuatan Anti Radikal Bebas Berdasarkan Konsentrasi Menggunakan Metode DPPH

Kekuatan ARB	Konsentrasi (ppm)
Sangat Kuat	<50
Kuat	51-100
Sedang	101-150
Lemah	>150

(Kurniasih *et al.*, 2015)

Ket : ARB : aktivitas antiradikal bebas

2.9 Spektrofotometer UV-Vis

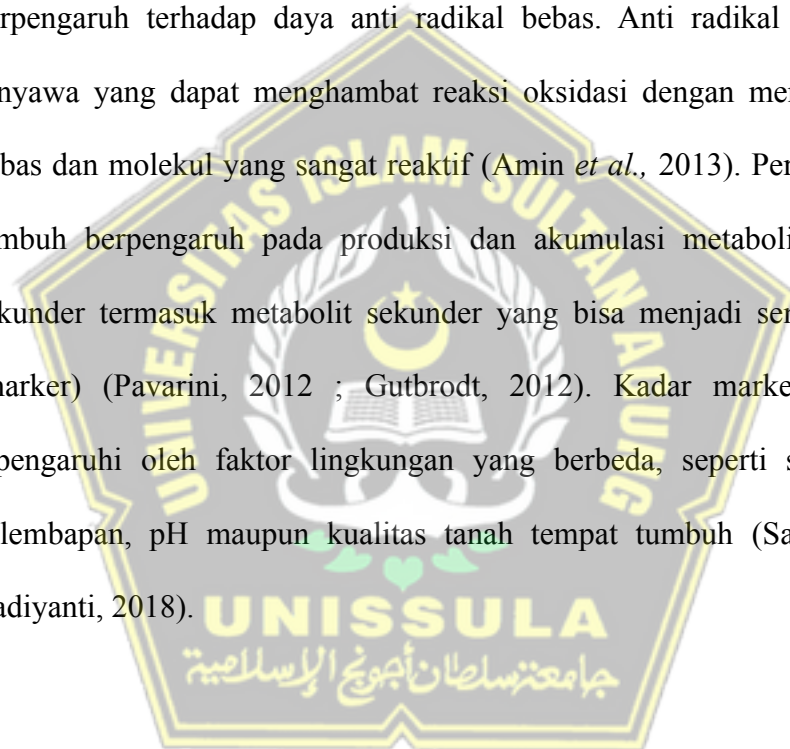
Spektrofotometer UV-Vis adalah alat yang menghubungkan panjang gelombang dan frekuensi dengan intensitas serapan (emisi atau serapan) suatu zat, yang dinyatakan sebagai spektrum dalam bentuk garis atau pita serapan. Pembentukan pita serapan disebabkan oleh eksitasi lebih dari satu elektron dalam kelompok molekul yang sangat kompleks (Hammado & Illing, 2013). Dalam penggunaan blanko, kesalahan fotometri juga dapat mencegah kesalahan dalam mengukur konsentrasi analit dengan adanya absorbansi pelarut. Kesalahan fotometrik dalam Pengukuran absorbansi yang sangat rendah atau sangat tinggi dapat dikompensasikan dengan pengenceran atau pemekatan dengan mengubah konsentrasi sesuai dengan rentang kepekaan instrumen yang digunakan. Kesalahan sistematis lainnya adalah kesalahan yang disebabkan oleh kerusakan atau bagian yang aus (masalah perangkat keras), serta keadaan alam yang mempengaruhi estimasi, dan instrumen estimasi. Misalnya, kesalahan penyesuaian, waktu dan masa pakai spektrofotometer adalah contoh kesalahan efisien. Retensi kuvet (kuvet kuarsa memiliki kualitas yang lebih baik), suhu, kelengketan, waktu pemahaman uji dan cahaya (cahaya ekstra yang masuk ke kuvet memperluas cahaya yang disengaja) (Misbahri et al ., 2014).

2.10 Hubungan Antara Ketinggian Tempat Tumbuh Dengan Konsentrasi Flavonoid Sebagai Marker Anti Radikal Bebas Pada Beluntas

Terdapat beberapa senyawa yang terkandung dalam daun beluntas diantaranya senyawa golongan flavonoid, lignan dan tanin yang berkhasiat

sebagai anti radikal bebas (Wanita, 2019). Senyawa flavonoid berfungsi sebagai anti radikal bebas dengan mendonasikan atom hidrogen dan menghambat oksidasi lipid (Ruma & Zipagang, 2015).

Hasil penelitian oleh Rubani (2022) menunjukkan bahwa perbedaan ketinggian lokasi tempat tumbuh menghasilkan kadar total flavonoid dimana konsentrasi terbesar dihasilkan pada altitud tinggi. Total flavonoid juga berpengaruh terhadap daya anti radikal bebas. Anti radikal bebas adalah senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Amin *et al.*, 2013). Perbedaan lokasi tumbuh berpengaruh pada produksi dan akumulasi metabolit primer dan sekunder termasuk metabolit sekunder yang bisa menjadi senyawa penciri (marker) (Pavarini, 2012 ; Gutbrodt, 2012). Kadar marker juga dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang berbeda, seperti suhu, cahaya, kelembapan, pH maupun kualitas tanah tempat tumbuh (Safrina, 2018 ; Hadiyanti, 2018).

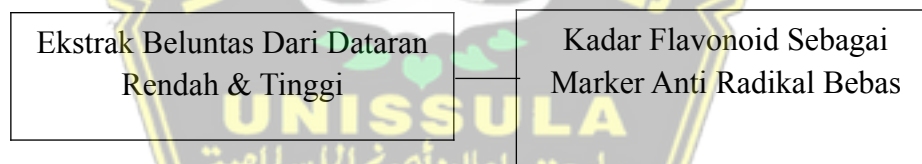


2.11 Kerangka Teori



Gambar 2. 6 Kerangka teori

2.12 Kerangka Kosep



Gambar 2. 7 Kerangka Konsep

2.13 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica L*) yang tumbuh di daerah Colo (dataran tinggi) lebih tinggi aktivitas anti radikal dan kadar flavonoidnya dibandingkan yang tumbuh di daerah Margoyoso (dataran rendah).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini termasuk penelitian analitik observasional menggunakan rancangan penelitian *cross-sectional*.

3.2 Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1 Variabel

- a. Variabel *Dependent* dalam penelitian ini adalah perbedaan lokasi tempat tumbuh tanaman beluntas (*Pluchea indica* L).
- b. Variabel *Independent* dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid sebagai marker anti radikal bebas.

3.2.2 Definisi Operasional

3.2.2.1 Perbedaan Lokasi Tempat Tumbuh

Perbedaan lokasi tempat tumbuh tanaman beluntas (*Pluchea indica* L) diambil pada dua daerah dengan ketinggian berbeda yaitu dataran rendah (113 mdpl; Margoyoso) dan tinggi (1600 mdpl; Colo). Pengecekan tanaman beluntas yang terdapat di daerah dataran tinggi dan dataran rendah meliputi pengecekan suhu, pH, kelembapan tanah, dan intensitas cahaya. Pengambilan daun beluntas dilakukan pada pukul 09.00 – 10.00 WIB dengan jumlah sebanyak 2 kg, baik pada

altitude tinggi atau rendah. Skala data yang digunakan adalah nominal.

3.2.2.2 Kadar Flavonoid sebagai Marker Anti Radikal Bebas

Kadar flavonoid sebagai marker anti radikal bebas dilihat berdasarkan kadar kuersetin, kadar rutin dan penentuan IC_{50} . Penentuan uji flavonoid yaitu dengan menggunakan uji kualitatif dan uji kuantitatif. Pengujian aktivitas anti radikal bebas (IC_{50} .) menggunakan metode DPPH dengan satuan ppm. Skala data: rasio. Hasil uji kualitatif dengan skrining fitokimia adalah berupa perubahan warna. Skala data : nominal. Hasil penentuan uji kuantitatif berupa penentuan kadar kuersetin dan rutin dengan satuan ppm. Skala data: rasio.

3.3 Populasi dan sampel penelitian

3.3.1 Populasi penelitian

Daun beluntas (*Pluchea indica* L) adalah spesies yang ditemukan di wilayah Margoyoso dan Colo sehingga menjadi populasi dalam penelitian kali ini. Pengambilan bulan November minggu ke 1 pukul 09.00-10.00 WIB. Diperoleh dari dua lokasi tumbuh berbeda yaitu dataran rendah (113 mdpl; Margoyoso) dan tinggi (1600 mdpl; Colo).

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah pengambilan daun beluntas diambil dari urutan ke 1-6 (dari pucuk daun) masing – masing sebanyak 2 kg di daerah Margoyoso (Desa Purworejo Kedung) dan Dawe (Desa Colo) yang tumbuh dipekarangan warga.

3.4 Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1 Instrumen Penelitian

Timbangan digital (*Mettler Toledo*) ketelitian 0,01 gram, lemari pengering (kapasitas 20 rak 1 X pengeringan), blender (*Krischef*), ayakan 40 mesh (40 lubang 1 in persegi), alat – alat gelas (*Pyrex*), mikropipet 100 – 1000 mL (*Socorex*) dan *Spectrophotometer Cary 60 UV- VIS* (Agilent, Amerika Serikat), *4 in Soil Survey Instrument* (Alhindo Elektronik, Indonesia).

3.4.2 Bahan Penelitian

Daun beluntas (*Pluchea indica* L) yang diperoleh dari daerah Margoyoso dan Colo, etanol p.a (Merck), etanol 70% (Teknis), larutan AlCl_3 p.a (Merck), NaOH p.a (Merck), HCl pekat p.a (Merck), serbuk Mg p.a (Merck), Natrium asetat p.a (Merck) dan Asam asetat p.a (Merck).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengecekan Faktor Lingkungan

Suhu, intensitas cahaya, pH tanah, dan kelembapan tanah diukur pada setiap lokasi ketinggian tempat pengambilan sampel daun beluntas. Pengukuran faktor lingkungan dilakukan menggunakan instrumen Survey Soil 4 in. Proses evaluasi faktor lingkungan dilakukan dari pukul 09.00 hingga 10.00.

3.5.2 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman Beluntas (*Pluchea indica* L) dilakukan berdasarkan ciri morfologi. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang (UNNES).

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Etanolik Daun Beluntas

Pembuatan ekstrak etanolik dari daun beluntas dimulai dengan ekstraksi menggunakan teknik maserasi. Pada tahap awal, 2 kilogram daun beluntas dipisahkan dari kotoran dan bahan asing. Perlu membersihkan benda-benda tersebut dengan mencucinya dengan air, lalu membiarkannya mengering di lemari khusus selama 24 jam atau sampai kering. Setelah kering, daun diblender dan diukur kadar airnya dengan ayakan mesh no. 40. Ekstraksi dilakukan melalui metode maserasi dengan pelarut etanol dalam proporsi 1:10 (Riskiyani *et al.*, 2020). Diambil 200 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 2 L etanol 70 % Campuran ini dimasukkan ke dalam wadah dan disimpan di tempat yang aman jauh dari sinar matahari selama 3×24 jam atau 3 hari,

sambil sesekali diaduk. Setelah itu, pisahkan bagian padat dari bagian cair dengan menggunakan filter. Jumlah etanol baru yang sama

digunakan untuk mengekstraksi ampas tiga kali. Setelah itu, ekstrak etanol dikumpulkan dalam wadah dan dipanaskan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kental (Hafsari *et al.*, 2015). Persentase rendemen ekstrak dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat serbuk simplisia}} \times 100 \%$$

(Maulida & Guntarti, 2015)

3.5.4 Penentuan Kadar Flavonoid Pada Ekstrak Daun Beluntas

3.5.4.1 Identifikasi Flavonoid

1 gram ekstrak etanolik 70% daun beluntas dilarutkan ke dalam 5 mL etanol. Selanjutnya, sebanyak 1 ml ekstrak etanol 70% daun beluntas ditambahkan 2-4 tetes HCl pekat dan sedikit serbuk Mg. Reaksi positif ketika warna kuning menjadi orange (Ikalinus *et al.*, 2015).

3.5.4.2 Penentuan Kadar Kuersetin

3.5.4.2.1 Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Larutan induk 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang 100 mg kuersetin dilarutkan dengan etanol p.a sampai volume 100 mL di labu ukur. Langkah selanjutnya diturunkan menjadi 100 ppm

dengan cara larutan induk kuersetin 1000 ppm diambil sebanyak 10 mL dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga 100 mL di labu ukur.

3.5.4.2.2 Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Larutan induk 100 ppm kuersetin dibuat seri larutan dengan variasi konsentrasi sebesar 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Pembuatannya adalah sebagai berikut :

- a. Larutan seri 20 ppm. Dipipet sebanyak 2 mL dari larutan induk 100 ppm (poin 3.5.4.2.1) dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.
- b. Larutan seri 40 ppm. Dipipet sebanyak 4 mL dari larutan induk 100 ppm (poin 3.5.4.2.1) dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.
- c. Larutan seri 60 ppm. Dipipet sebanyak 6 mL dari larutan induk 100 ppm (poin 3.5.4.2.1) dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.
- d. Larutan seri 80 ppm. Dipipet sebanyak 8 mL dari larutan induk 100 ppm (poin 3.5.4.2.1)

dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL
ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.

- e. Larutan seri 100 ppm. Menggunakan larutan yang
dibuat pada poin 3.5.4.2.1.

3.5.4.2.3 Penentuan λ Maksimal

Larutan kuersetin 100 ppm (poin 3.5.4.2.1)
diambil dalam 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL
AlCl₃ 10% dan 8 mL asam asetat 5% ke dalam
labu ukur 10 mL. Spektrofotometer UV-Vis
digunakan untuk mengukur panjang gelombang
maksimum, yaitu 400–800 nm. (Bakti *et al.*, 2017).

3.5.4.2.4 Penentuan kadar kuersetin pada ekstrak etanol daun beluntas

Sebanyak 100 miligram ekstrak daun
beluntas dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL
dan ditambahkan etanol p.a pada titik batas hingga
konsentrasi mencapai 1000 ppm. Selanjutnya, satu
mililiter larutan ekstrak dipipet, dan kemudian
ditambahkan satu mL AlCl₃ 10% dan 8 mL asam
asetat 5%. Larutan tersebut didiamkan selama 25
menit, dan kemudian dilakukan pembacaan
absorbansi pada panjang gelombang maksimum

yang ditemukan pada poin 3.5.4.2.3. Studi ini direplikasi tiga kali (Yunita *et al.*, 2020).

3.5.4.3 Penentuan Kadar Rutin

3.5.4.3.1 Pembuatan Larutan Induk Rutin

Larutan induk 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang 100 mg rutin dilarutkan dengan etanol p.a sampai volume 100 mL di labu ukur. Langkah selanjutnya diturunkan menjadi 100 ppm dengan cara larutan induk rutin 1000 ppm diambil sebanyak 10 mL dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga 100 mL di labu ukur.

3.5.4.3.2 Pembuatan Kurva Baku Rutin

Larutan induk 100 ppm rutin dibuat seri larutan dengan variasi konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Pembuatannya adalah sebagai berikut :

- a. Larutan seri 20 ppm. Dipipet sebanyak 2 mL dari larutan induk 100 ppm (poin 3.5.4.3.1) dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.
- b. Larutan seri 40 ppm. Dipipet sebanyak 4 mL dari larutan induk 100 ppm (poin 3.5.4.3.1) dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.

c. Larutan seri 60 ppm. Dipipet sebanyak 6 mL dari larutan induk 100 ppm (poin 3.5.4.3.1) dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.

d. Larutan seri 80 ppm. Dipipet sebanyak 8 mL dari larutan induk 100 ppm (poin 3.5.4.3.1) dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.

e. Larutan seri 100 ppm menggunakan larutan yang dibuat pada poin 3.5.4.3.1.

3.5.4.3.3 Penentuan λ Maksimal

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara larutan rutin 100 ppm (poin 3.5.4.3.1) diambil sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL Natrium asetat 1 M ke dalam labu ukur 10 mL dan dilakukan pembacaan dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nM sampai mendapatkan λ maksimal (Azizah *et al.*, 2020).

3.5.4.3.4 Penentuan kadar rutin ekstrak etanol daun beluntas

Ekstrak daun beluntas konsentrasi 1000 ppm (poin 3.5.4.2.4) dipipet 1 mL lalu ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL Natrium asetat 1 M. larutan

tersebut didiamkan selama 25 menit, kemudian dibaca absorbansi pada panjang maksimum yang diperoleh pada poin 3.5.4.3.3. Penelitian ini direplikasi sebanyak 3 kali (Azizah *et al.*, 2020).

3.5.5 Uji Aktivitas Anti Radikal Bebas

3.5.5.1 Pembuatan Larutan Induk DPPH

Larutan DPPH 0,4 mM (MR : 394, 32) dibuat dengan cara ditimbang sebanyak 100 mg serbuk DPPH, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas (2,536 mM) kemudian dipipet sebanyak 15,77 mL ke labu ukur 100 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.

3.5.5.2 Pembuatan Larutan Kuersetin Sebagai Pembanding

Larutan kuersetin 1000 ppm dibuat dengan cara ditimbang 100 mg kuersetin yang dilarutkan dengan etanol p.a sampai volume 100 mL. Langkah selanjutnya diturunkan sampai 100 ppm dengan cara larutan induk kuersetin 1000 ppm diambil sebanyak 10 mL dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga 100 mL di labu ukur.

Larutan induk 100 ppm kuersetin dibuat seri kadar sebesar 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Pembuatannya adalah sebagai berikut :

- a. Larutan seri 2 ppm. Dipipet sebanyak 0,5 mL larutan induk dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.
- b. Larutan seri 4 ppm. Dipipet sebanyak 1 mL larutan induk dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.
- c. Larutan seri 6 ppm. Dipipet sebanyak 1,5 mL larutan induk dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.
- d. Larutan seri 8 ppm. Dipipet sebanyak 2 mL larutan induk dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.
- e. Larutan seri 10 ppm. Dipipet sebanyak 2,5 mL larutan induk dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.

3.5.5.3 Penentuan λ Maksimal DPPH

Sebanyak 2 mL larutan DPPH 0,4 mM dimasukkan dalam labu ukur 5 mL lalu ditambahkan etanol p.a 3 mL, kemudian diukur serapan larutan dengan spektrofotometer UV-Vis pada *range* panjang gelombang 400-800 nm (Bakti *et al.*, 2017).

3.5.5.4 Pengukuran DPPH Sebagai Absorbansi Kontrol

Sebanyak 2 mL larutan DPPH 0,4 mM dimasukkan dalam labu ukur 5 mL, ditambahkan etanol p.a 3 mL. Larutan

kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 35 menit lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh pada poin 3.5.5.3 (Pujiastuti & Islamiyati, 2021).

3.5.5.5 Pengukuran Absorbansi Pembanding Kuersetin

Masing – masing larutan diambil sebanyak 3 mL dari seri kuersetin, lalu ditambahkan 2 mL larutan DPPH 0,4 mM ke dalam labu ukur 5 mL. Selama 35 menit, larutan disimpan di tempat gelap. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum hasil optimasi pada poin 3.5.5.3 penelitian direplikasi 3 kali (Bakti *et al.*, 2017).

3.5.5.6 Penentuan Nilai IC_{50} Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun beluntas dengan DPPH

Larutan induk ekstrak etanol 70% daun beluntas 1000 ppm dibuat dengan cara ditimbang 100 mg ekstrak dan dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL. Langkah selanjutnya diturunkan menjadi 100 ppm dengan cara larutan induk ekstrak etanol 70% daun beluntas 1000 ppm diambil sebanyak 10 mL dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga 100 mL labu ukur. Kemudian dibuat seri konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm dengan memipet larutan induk 100 ppm sebanyak 2,5; 5; 7.5; 10; dan 12,5 mL kemudian ditambahkan ke dalam labu ukur 25 mL dengan etanol p.a. ke tanda batas dan

dihomogenkan. Masing – masing larutan diambil 3 mL ekstrak etanolik 70 % daun beluntas, lalu ditambahkan 2 mL larutan DPPH 0,4 mM ke dalam labu ukur 5 mL. Larutan didiamkan di tempat gelap selama 35 menit. Larutan didiamkan di tempat gelap selama 35 menit. Larutan dibaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada poin 3.5.5.3(Bakti *et al.*, 2017).

Penentuan aktivitas antioksidan dalam % inhibisi dapat dihitung menggunakan rumus berikut (Semirata & Lampung, 2013) :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi bahan uji}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Penentuan konsentrasi penghambatan 50% (IC_{50}) dapat ditentukan dengan terlebih dahulu membuat regresi liner yang diperoleh dari nilai konsentrasi sampel yang diplotkan dengan nilai persentase penghambatan. Rumus persamaan regresi liner nantinya didapatkan yaitu sebagai berikut (Semirata & Lampung, 2013) :

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y = presentase inhibisi

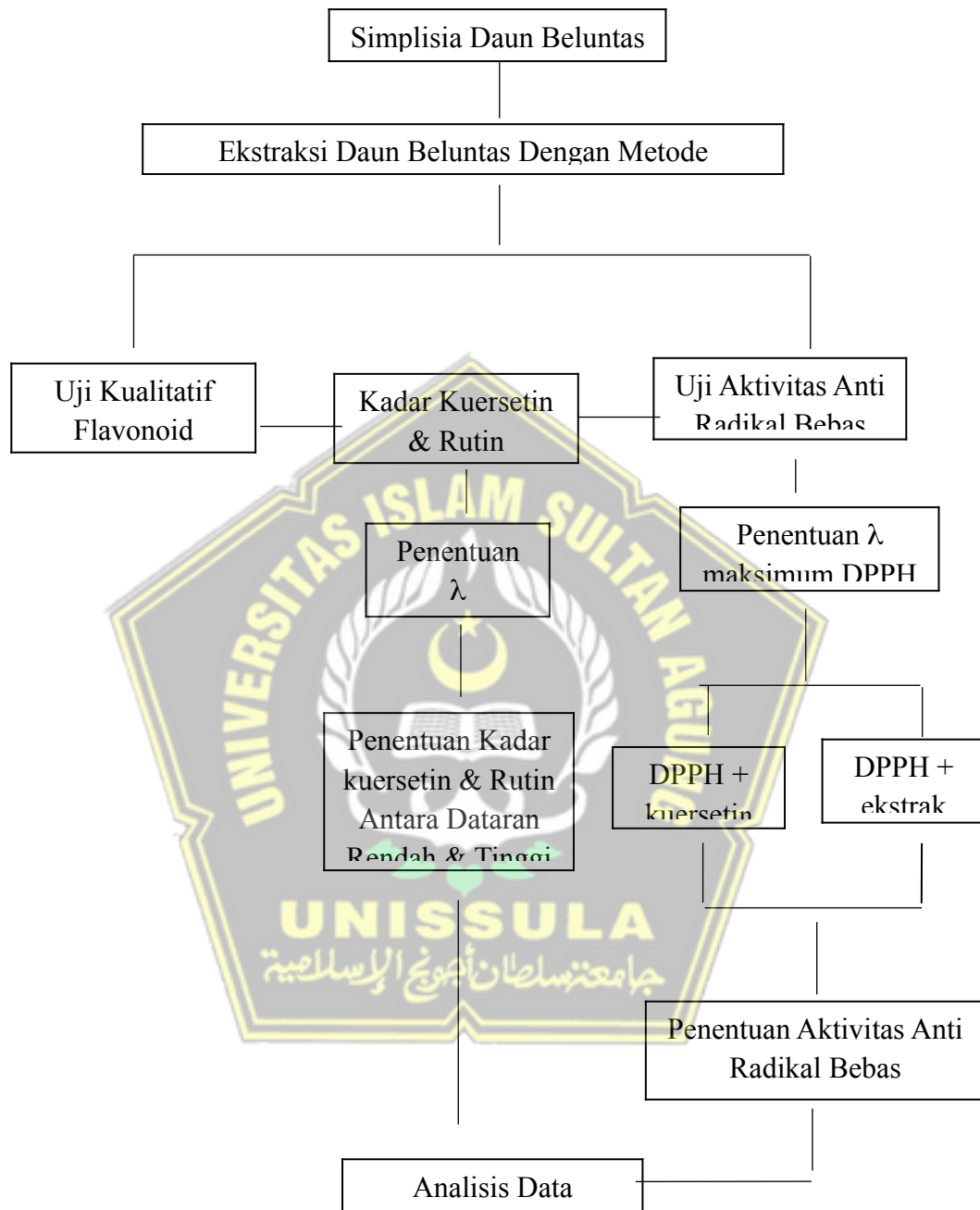
a = intersep

x = konsentrasi (ppm)

b = slope

Nilai IC_{50} didapatkan saat mengganti nilai y dengan 50.

3.6 Alur penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

3.7 Tempat dan Waktu Penelitian

3.7.1 Tempat

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi FK Unissula (uji aktivitas anti radikal bebas) dan Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang (determinasi tanaman).

3.7.2 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada Desember 2022 – Februari 2023.

3.8 Analisis Hasil

Hasil yang diperoleh dari uji aktivitas anti radikal bebas, kadar rutin, dan kadar kuersetin pada ekstrak etanolik daun beluntas dari Margoyoso dan Colo diuji normalitas menggunakan uji *Shapiro wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Levene Test*. Perbedaan aktivitas anti radikal bebas dan kadar kuersetin EEDB antara Margoyoso dan Colo yang diperoleh tidak normal dan homogen maka diuji dengan uji *Mann Whitney*, sedangkan kadar rutin EEDB antara Margoyoso dan Colo yang diperoleh normal dan homogen sehingga diuji dengan *independent T-Test*.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2022 – Februari 2023 di Laboratorium Prodi Farmasi Fakultas Kedokteran Unissula Semarang dan Laboratorium Biologi UNNES. Tujuan riset ini agar bisa mengetahui kadar flavonoid yaitu kuersetin dan rutin sebagai marker anti radikal bebas menggunakan metode DPPH dari dua tempat tumbuh yang berbeda ketinggian. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap diantaranya determinasi dan penentuan profil tempat tumbuh daun beluntas, ekstraksi, uji kualitatif flavonoid, uji kadar kuersetin dan rutin, uji aktivitas anti radikal bebas pada ekstrak etanolik daun beluntas dan langkah analisis data.

4.1.1 Determinasi Tanaman dan Penentuan Profil Tempat Tumbuh

Tanaman beluntas diperoleh dari daerah Margoyoso dan Colo. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang (UNNES). Berdasarkan hasil determinasi sampel benar - benar daun beluntas maka tanaman beluntas (*Pluchea indica* L) dari famili Asteraceae sesuai sudah tercantum pada Lampiran 2.

Adapun profil tempat tumbuh daun beluntas tersaji pada tabel 4.1.

Tabel 4. 1 Profil Tempat Tumbuh Daun Beluntas Antara Margoyoso dan Colo

Aspek	Margoyoso	Colo
pH tanah	6,8	4,5
Intensitas cahaya	<i>Low</i> (cahaya redup)	<i>Nor</i> (cahaya normal)
Altitude	113 mdpl	1600 mdpl
Suhu	33 °C	26 °C
Habitat	Dataran rendah, Warna tanah cokelat kemerahan, Tekstur tanah kering. Tanaman disekitar rerumputan liar.	Dataran tinggi, Warna tanah cokelat kehitaman, Tekstur tanah basah. Tanaman di sekitar pohon alpukat

Ket : Mdpl : meter di atas permukaan laut

°C : celcius

4.1.2 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dan data % rendemen serta kadar air tersaji pada tabel 4.2

Tabel 4. 2 Data % Rendemen dan Kadar Air Ekstrak Daun Beluntas Antara Margoyoso Dan Colo

Parameter	Margoyoso	Colo
Kadar Air Simplisia ¹⁾	8,16 %	7,62 %
Kadar Air Ekstrak ¹⁾	5,87 %	5,85 %
% Rendemen ²⁾	17, 85 %	21 %

Ket : 1) Hasil kadar air disajikan pada lampiran 3

2) Perhitungan data rendaman disajikan pada lampiran 4

4.1.3 Hasil Uji Kualitatif Ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L)

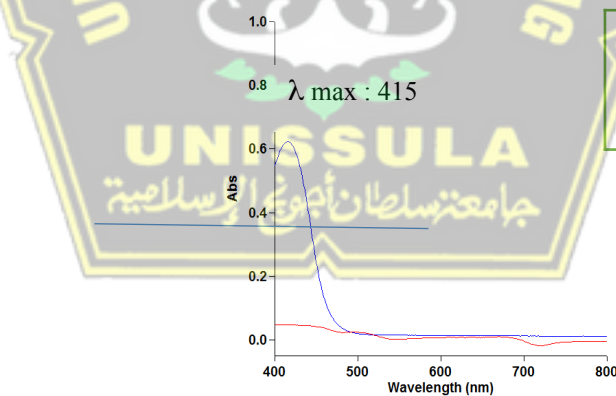
Uji kualitatif dilakukan untuk identifikasi adanya flavonoid dalam ekstrak daun beluntas menggunakan uji *Wilstatter*. Hasil uji kualitatif flavonoid tersaji pada tabel 4.3.

Tabel 4. 3 Hasil Uji Kualitatif Ekstrak daun beluntas

Tempat Tumbuh	Hasil Uji	Keterangan
Margoyoso	Warna jingga	(+) Flavonoid
Colo	Warna jingga	(+) Flavonoid

4.1.4 Penetapan Kadar Kuersetin dan Rutin

Hasil dari penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin disajikan pada gambar 4.1.

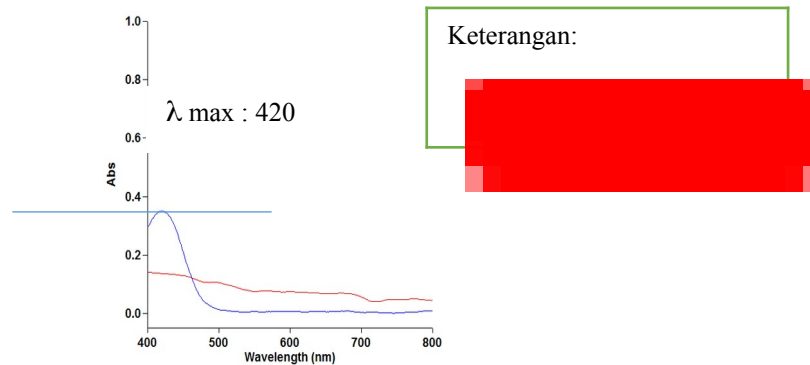


Keterangan:



Gambar 4. 1 Hasil Scan Panjang Gelombang Kuersetin Pada 400 – 800 nm

Hasil dari penentuan panjang gelombang maksimum rutin disajikan pada gambar 4.2.



Gambar 4. 2 Hasil *Scan Panjang Gelombang* Rutin Pada 400 – 800 nm

Adapun hasil penetapan kadar kuersetin dan rutin EEDB dari daerah Margoyoso & Colo disajikan pada tabel 4.4

Tabel 4. 4 Hasil Penetapan Kadar Kuersetin Dan Rutin Total EEDB dari Daerah Margoyoso & Colo

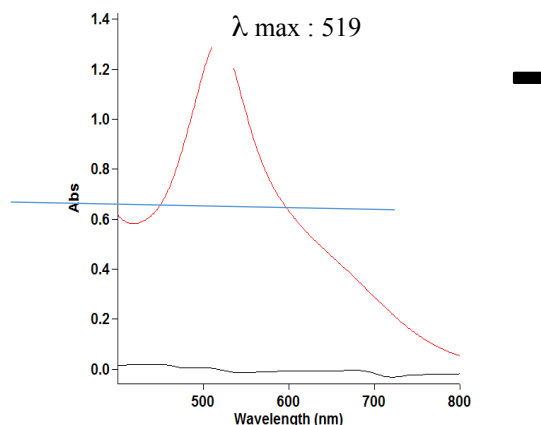
Replikasi	Kadar kuersetin (%)		Kadar rutin (%)	
	Margoyoso	Colo	Margoyoso	Colo
I	7,310	8,316	3,765	5,768
II	7,311	8,251	3,618	5,856
III	7,310	8,155	3,637	5,871
Rata – rata	7,310	8,240	3,637	5,831
SD	0,005	0,809	0,799	0,556
Ket : EEDB = Ekstrak Etanolik Daun Beluntas				
SD = Standar Deviasi				

4.1.5 Pengujian Aktivitas Anti Radikal Bebas EEDB Dengan Metode

DPPH

Hasil dari penentuan panjang gelombang maksimum DPPH disajikan pada gambar 4.3.

Keterangan:



Gambar 4. 3 Hasil Scan Panjang Gelombang DPPH Pada 400 – 800 nm

Penentuan aktivitas anti radikal bebas EEDB dilakukan dengan memperkirakan nilai IC_{50} yang didapat dari kondisi relaps langsung antara rangkaian fokus EEDB dengan % inhibisi. Nilai IC_{50} EEDB tersaji dalam tabel 4.5.

Tabel 4. 5 Nilai IC_{50} EEDB

Replikasi	IC_{50} EEDB (ppm)		Standar Kuersetin
	Margoyoso	Colo	
I	127,852	71,516	6,270
II	127,816	71,584	6,272
III	127,765	71,585	6,265
Rata – Rata	127,811	71,561	6,269
SD	0,043	0,039	0,003

Ket : EEDB = Ekstrak Etanolik Daun Beluntas

IC_{50} = Inhibitory Concentration Of 50%

SD = Standar Deviasi

4.1.6 Analisis Hasil

Hasil penelitian berupa kadar kuersetin, kadar rutin, dan aktivitas anti radikal bebas EEDB antara Margoyoso dan Colo dilakukan uji

penggunaan analisis statistik untuk menentukan apakah ada perbedaan yang signifikan atau tidak. Langkah pertama diawali dengan uji normalitas (*Shapiro Wilk*) dan uji homogenitas (*Levene Test*). Hasil uji normalitas bisa dilihat pada tabel 4.6. Hasil tes homogenitas, tes *Mann Whitney* dan uji *Independent T* bisa dilihat pada tabel 4.7.

Tabel 4. 6 Hasil Uji Normalitas Kadar Kuersetin, Rutin Dan Aktivitas Anti Radikal Bebas EEDB

EEDB	Uji Normalitas		
	Kadar Kuersetin	Kadar Rutin	Aktivitas Antioksidan
Margoyoso	0,000	*0,227	*0,811
Colo	*0,789	*0,258	0,000
Ket : *Data normal secara statistik ($p > 0,05$) EEDB = Ekstrak Etanolik Daun Beluntas			

Tabel 4. 7 Hasil Uji Homogenitas, Uji T dan Uji Mann Whitney EEDB

Data Yang Dianalisis	Uji Homogenitas	Uji T	Uji Mann Whitney
Kadar Kuersetin Margoyoso dan Colo	*0,074	-	**0,046
Kadar Rutin Margoyoso dan Colo	*0,401	**0,000	-
Aktivitas Antioksidan Margoyoso dan Colo	*0,978	-	**0,046
Ket : *Data homogen secara statistik ($p > 0,05$) **Data berbeda signifikan secara statistika ($p < 0,05$) EEDB : Ekstrak Etnaolik Daun Beluntas			

4.2 Pembahasan

4.2.1 Determinasi Tanaman Beluntas

Determinasi yaitu langkah awal untuk mengetahui kebenaran tentang jenis tanaman yang akan digunakan dan menghindari kesalahan penelitian (Hanifah, 2014). Langkah ini perlu dilakukan dengan tujuan untuk memastikan apakah tanaman yang akan diuji merupakan spesies dari *Pluchea indica* L. Less. Jika ada kesalahan dalam proses determinasi maka akan terjadi kesalahan pada pengumpulan bahan yang akan diteliti (Mulangsri *et al.*, 2017).

4.2.2 Pengecekan Faktor Lingkungan

Pengecekan faktor lingkungan tanaman beluntas didapatkan hasil yang berbeda dari dua tempat tumbuh yaitu Margoyoso dan Colo, seperti pH tanah & kelembapan, intensitas cahaya, ketinggian tempat tumbuh, suhu dan habitat. Kondisi tempat tumbuh yang berbeda tersebut dapat mempengaruhi produksi dari metabolit sekunder yang dihasilkan dan nantinya akan berpengaruh terhadap nilai kadar senyawa tertentu dalam suatu tanaman (Rachmadiarti *et al.*, 2019).

4.2.3 Ekstraksi

Ekstraksi yaitu suatu proses pemisahan bahan campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai pada kandungan dalam tanaman tersebut dimana tujuannya untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada tanaman. Dalam penelitian ini digunakan pelarut etanol

merupakan pelarut yang bersifat polar dan merupakan pelarut yang serba guna dan sangat baik digunakan sebagai ekstraksi pendahuluan. Pelarut etanol memiliki sifat untuk menembus bahan dinding sel sehingga mampu melakukan difusi sel dan menarik senyawa bioaktif lebih cepat (Prayitno & Rahim, 2020). Pelarut etanol 70 % digunakan karena pelarut dengan konsentrasi ini sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengganggu hanya skala kecil yang turut kedalam cairan pengekstraksi, yang mana pelarut ini sesuai dalam mengekstrak senyawa yang mengandung flavonoid (Yulianto & Savitri, 2019). Ekstraksi daun beluntas dilakukan dengan metode maserasi karena merupakan metode yang paling sederhana, tidak memerlukan alat khusus dibandingkan metode yang lain, dan dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Ibrahim *et al.*, 2016). Penetapan kadar air dilakukan untuk mengukur kandungan air yang terdapat dalam simplisia. Kadar air yang diperoleh dari daerah Margoyoso didapatkan hasil sebesar 8,16% dan dari daerah Colo didapatkan hasil sebesar 7,62%. Hasil yang diperoleh dikatakan sesuai dengan syarat mutu karena kurang dari 10%. Kadar air yang terlalu tinggi (>10%) dapat menyebabkan tumbuhnya mikroba yang akan menurunkan stabilitas pada ekstrak. Kadar air yang terlalu rendah dapat menyebabkan komposisi kimianya berubah (Depkes RI, 2000).

Ekstraksi dilakukan dengan cara sampel simplisia daun beluntas diserbuk untuk memperkecil ukuran daun. Pembuatan serbuk ini bertujuan untuk memperluas permukaan sampel sehingga pada saat kontak dengan pelarut diharapkan zat-zat aktif yang terkandung dalam serbuk tanaman akan tertarik secara efektif. Serbuk dari daerah Margoyoso dan Colo ditimbang sebanyak 200 gram kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 2 liter (perbandingan 1:10) karena semakin banyak pelarut yang digunakan maka semakin banyak senyawa yang dapat diekstrak. Simplisia direndam seluruhnya agar cairan penyari tersebut dapat menembus dinding dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, kemudian zat aktif tersebut akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan di luar sel, maka dari itu larutan yang terpekat terdesak keluar (Arifianti *et al.*, 2014). Kemudian wadah maserasi ditutup dengan alumunium foil dan ditutup dengan rapat lalu didiamkan selama 3x24 jam untuk memaksimalkan proses pengambilan senyawa-senyawa kimia yang terdapat pada sampel daun, dan ditempatkan di tempat yang terlindung dari cahaya matahari langsung yang bertujuan untuk mencegah reaksi katalisis cahaya ataupun perubahan warna dan sambil sesekali diaduk agar bahan dan pelarut tercampur homogen, kemudian disaring menggunakan kertas saring atau kain flannel, diulangi sebanyak 3x

untuk menarik kandungan senyawa yang masih tertinggal pada saat maserasi pertama (Indarto *et al.*, 2019).

Hasil penyaringan (maserat) dari dua tempat tumbuh berbeda masing-masing dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* pada suhu 40°C untuk dilakukan pemekatan ekstrak dimana alat ini dapat menguapkan pelarut pada suhu rendah yaitu dibawah titik didih pelarut adanya bantuan vakum (Sutriandi *et al.*, 2016). Kemudian ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam *waterbath* pada suhu 40°C agar senyawa metabolit tidak rusak karena pemanasan tinggi, sampai diperoleh ekstrak kental (Sari *et al.*, 2017). Ditimbang dan dihitung nilai rendemen ekstrak kental yang diperoleh untuk membandingkan berapa banyak konsentrat yang didapat dari suatu bahan pada beban dasar bahan simplisia, yang akan sesuai dengan berapa banyak campuran bioaktif yang terkandung dalam bahan yang diekstraksi (Utami *et al.*, 2020). Jumlah ekstrak dari daerah Margoyoso didapatkan nilai rendemen sebesar 17,58% dan jumlah ekstrak dari daerah Colo didapatkan nilai rendemen sebesar 21% yang artinya memenuhi parameter standar ekstrak karena masuk dalam range persen rendemen dikatakan baik apabila nilainya lebih dari 10% (Wardaningrum, 2019). Pada penelitian ini yang menjadi faktor pembeda nilai rendemen adalah daerah pengambilan sampel yang berbeda dapat menghasilkan senyawa metabolite sekunder yang berbeda pula. Hal ini dikarenakan tempat

tumbuh merupakan faktor eksternal yang dapat mempengaruhi hasil metabolite sekunder (Rifai *et al.*, 2018).

4.2.4 Uji Kualitatif Flavonoid

Uji kualitatif pada penelitian untuk mengetahui apakah ekstrak daun beluntas mengandung flavonoid. Hasil identifikasi kandungan ekstrak daun beluntas ditunjukkan dalam Tabel 4.1, yang menunjukkan bahwa ekstrak daun beluntas dari dua tempat tumbuh, Margoyoso dan Colo positif, mengandung flavonoid. Pada uji flavonoid, reaksi yang digunakan adalah HCl pekat dan serbuk Mg. Logam Mg dan HCl pekat mereduksi inti benzopiron sudah ada pada susunan flavonoid, menyebabkan warna menjadi merah, kuning, atau jingga (Illing *et al.*, 2017).

4.2.5 Penetapan Kadar Kuersetin

Penetapan kadar kuersetin dilakukan dengan pengukuran absorbansi panjang gelombang terlebih dahulu pada larutan standar. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan serapan maksimum 415 nm sesuai dengan panjang gelombang yang didapat pada konsentrasi 100 ppm. Karena panjang gelombang ini memiliki sensitifitas tertinggi dibandingkan panjang gelombang lainnya, panjang gelombang maksimum digunakan untuk penelitian ini. Kuersetin adalah standar karena terdiri dari kelompok flavonoid yang sangat baik dalam

mengerti radikal bebas dan mencegah berbagai reaksi oksidasi (Ahmad *et al.*, 2015).

Pada penelitian ini kandungan kuersetin ditentukan berdasarkan metode kolorimetri dengan menggunakan $AlCl_3$. Prinsip dari metode ini adalah ini adalah bahwa $AlCl_3$ membentuk kompleks korosif yang stabil dengan gugus keton C-4, kemudian dengan kumpulan hidroksil C-3 atau C-5 dari flavon dan flavonol (Azizah & Salamah, 2013). Kadar kuersetin yang diperoleh yaitu sebesar $7,310 \pm 0,005$ mg equivalen/100 mg ekstrak untuk daerah Margoyoso dan $8,240 \pm 0,809$ mg equivalen/100 mg ekstrak untuk daerah Colo. Kadar kuersetin EEDB Margoyoso dan Colo berbeda signifikan ($p < 0,05$), dimana daerah Colo lebih tinggi dari pada daerah Margoyoso. Hasil tersebut sama dengan penelitian Rubani (2020), dimana kadar yang diperoleh dari dataran rendah sebesar 5,63 ppm dan dataran tinggi sebesar 26,57 ppm. Perbedaan hasil tersebut karena berbagai faktor lingkungan seperti cahaya, suhu, pH tanah, ketinggian tempat tumbuh, kelembapan (Malinikova *et al.*, 2013).

Cahaya merupakan salah satu faktor penting yang dapat mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder, morfogenesis dan pengumpulan flavonoid. Pada penelitian ini, hasil intensitas cahaya di daerah Margoyoso adalah *Low* (redup) dan Colo adalah *Nor* (Normal), untuk dataran rendah di daerah Margoyoso intensitas cahaya yang didapat redup dikarenakan waktu pengambilan tanaman & pengecekan

faktor lingkungan dilakukan pada musim penghujan jadi untuk didaerah tersebut cuaca atau intensitas cahayanya dapat berubah berubah (Alwiyah *et al.*, 2015). Sinar UV-A (320-400 nm) dapat mencapai bumi bersama dengan sebagian (0,5%) sinar UV-B (280-320 nm), meskipun sedikit hal ini memiliki efek yang berbahaya pada tanaman dan hewan. Adanya sinar ini dapat menyebabkan aktivasi ROS (*Reactive Oxygen Species*) di dalam sel yang berdampak pada kerusakan DNA, RNA, dan pigmen fotosintesis pada tanaman. Flavonol merupakan senyawa pengangkut ROS yang sangat baik, oleh karena itu tanaman akan menghasilkan lebih banyak flavonol untuk perlindungan yang lebih baik (Idris *et al.*, 2018).

pH tanah akan berpengaruh terhadap kesuburan dan nutrisi tanah sehingga pada pH yang optimum maka pertumbuhan tanaman menjadi baik dan kandungan metabolit sekundernya semakin meningkat. Pada penelitian ini pH tanah daerah Margoyoso yaitu 6,8 sedangkan Colo 4,5. Adapun pH tanah <7 adalah asam dan >7 adalah basa, pH tanah asam <7 dimana dalam pH tersebut juga berpengaruh dapat memicu secara lebih cepat terjadinya sintesis pada metabolite sekunder yang terdapat pada tanaman (Prahesti *et al.*, 2018). Pengaruh pH tanah sangat berpengaruh terhadap penyerapan zat hara dan pertumbuhan meliputi pengaruh dari zat beracun dan kelembaban zat hara (Wahyuningsih *et al.*, 2019).

Perbedaan ketinggian tempat tumbuh dapat menyebabkan perbedaan kondisi iklim seperti temperatur serta kelembapan udara. Jika ketinggian tempat tumbuh lebih tinggi, suhu udara akan menurun, dan kelembapan udara akan meningkat, yang berdampak pada kandungan metabolit sekunder dalam tanaman. Pada penelitian ini ketinggian tempat tumbuh EEDB Colo (1600 mdpl) lebih tinggi dari pada EEDB yang tumbuh di Margoyoso (113 mdpl). Diketahui beluntas tumbuh optimum pada ketinggian 1.000-1.400 mdpl sehingga kadar kuersetin total dan rutin total EEDB dari daerah Colo lebih besar dari pada daerah Margoyoso (Pradipta, 2018).

4.2.6 Penetapan Kadar Rutin

Pada penetapan kadar rutin, etanol p.a ditambahkan sebagai pelarut, dan penambahan 10% AlCl_3 berfungsi sebagai efek batokromik, yang mengubah panjang gelombang rutin ke rentang panjang gelombang UV-Vis 400-800 nm. Efek batokromik membuat warna menjadi lebih kuning. Setelah itu, natrium asetat 1M ditambahkan untuk menjadikannya stabil, dan air suling ditambahkan untuk memastikan bahwa reaksi antara larutan biasa pada pereaksi telah ditambahkan bisa berlangsung dengan baik (Azizah *et al.*, 2020). Kadar rutin yang diperoleh yaitu sebesar $3,637 \pm 0,799$ mg equivalen/100 mg ekstrak untuk daerah Margoyoso dan $5,831 \pm 0,556$ mg equivalen/100 mg ekstrak untuk daerah Colo. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa kadar rutin EEDB Margoyoso dan Colo berbeda signifikan

($p < 0,05$). Selain dipengaruhi oleh faktor genetik, kadar rutin juga dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan meliputi cahaya, suhu, jenis tanah, kondisi tanah, ketinggian tempat dan kelembapan (Hadiyanti & Pardono, 2018).

4.2.7 Pengujian Aktivitas Anti Radikal Bebas EEDB dengan Metode

DPPH

Pengukuran aktivitas anti radikal bebas dilakukan dengan metode DPPH. Keberadaan DPPH diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan didapatkan panjang gelombang maksimum DPPH sebesar 519 nm. Hasil ini sama dengan penelitian Wahyuni (2018), yang memperoleh panjang gelombang maksimum DPPH sebesar 517 nm. Uji aktivitas antioksidan pada penelitin ini menggunakan metode DPPH karena metode ini merupakan metode sederhana, mudah, dan cepat menentukan aktivitas antioksidan. Metode ini juga memiliki kelebihan karena DPPH adalah senyawa radikal yang stabil (H. Faisal, 2019; Setiawan et al., 2018).

Kuersetin merupakan standar yang baik untuk uji DPPH karena ketika kuersetin bereaksi dengan radikal bebas, kuersetin akan mendonorkan protonnya dan menjadi senyawa radikal. Elektron tak berpasangan yang muncul karena respons ini terdelokalisasi ke dalam sistem aromatik sehingga senyawa radikal kuersetin memiliki energi yang sangat rendah dan kurang efektif, oleh karena itu kuersetin sangat baik dalam menghambat radikal bebas DPPH. Kemudian antioksidan

pada senyawa flavonoid yang termasuk dalam metabolite sekunder ini, dapat mendonorkan hidrogen pada radikal bebas yang menghasilkan radikal stabil berenergi rendah dari senyawa flavonoid yang kehilangan atom hidrogen. Radikal antioksidan tersebut menjadi lebih stabil melalui proses resonansi dalam struktur cincin aromatik dan tidak mudah terlibat pada reaksi radikal lain (Faisal *et al.*, 2022). Pada penelitian ini pengujian aktivitas antioksidan EEDB Margoyoso, yang memiliki nilai IC_{50} 127,811 ppm, menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) dengan EEDB Colo, yang memiliki nilai IC_{50} 71,561 ppm. Hasil menunjukkan bahwa daerah Margoyoso memiliki aktivitas antioksidan sedang pada EEDB karena IC_{50} kurang dari 150 ppm, sedangkan daerah Colo memiliki aktivitas antioksidan kuat sebab IC_{50} kurang dari 100 ppm. Hal ini karena terdapat perbedaan geografis yang lebih tinggi di daerah Colo. Untuk menghasilkan kadar antioksidan yang lebih tinggi, tanaman beluntas tumbuh dengan baik pada ketinggian 1000–1400 mdpl. Semakin rendah nilai IC_{50} , semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Adapun perbedaan kondisi tempat tumbuh yang berbeda tersebut dapat berpengaruh terhadap produksi dari metabolit sekunder yang dihasilkan pada tanaman dan nantinya berpengaruh terhadap nilai kadar senyawa tertentu yang berperan sebagai aktivitas antioksidan (Rachmadiarti *et al.*, 2019).

4.2.8 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini ialah tidak dilakukannya pengecekan profil tempat tumbuh (suhu & pH tanah) tanaman beluntas (*Pluchea indica* L) antara daerah Margoyoso Colo secara replikasi dalam proses pengerjaanya.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan data telah dianalisis, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Kadar kuersetin EEDB sebesar 73,10 ppm dari daerah Margoyoso dan 82,40 ppm dari daerah Colo, sedangkan kadar rutin EEDB sebesar 36,37 ppm dari daerah Margoyoso dan 58,31 ppm dari daerah Colo. Hasil analisis kadar kuersetin dan kadar rutin EEDB daerah Margoyoso dan Colo berbeda bermakna secara statistik dengan signifikan (2-tailed) <0.05 .
2. Berdasarkan nilai IC_{50} menggunakan metode DPPH, aktivitas anti radikal bebas termasuk kriteria sedang dengan nilai IC_{50} 127,811 ppm untuk daerah Margoyoso dan kriteria kuat dengan nilai IC_{50} 71,561 ppm untuk daerah Colo. Hasil analisis aktivitas anti radikal bebas Margoyoso dan Colo berbeda bermakna secara statistik dengan signifikan (2-tailed) <0.05 .
3. Perbedaan hasil kadar flavonoid yang diperoleh dari dua tempat tumbuh yang berbeda dipengaruhi faktor ketinggian, pH tanah, paparan sinar matahari dan habitat di sekitarnya. Berdasarkan faktor lingkungan tumbuh, daerah Colo lebih tinggi intensitas cahayanya, lebih rendah suhunya, lebih tinggi tempat tumbuhnya dan PH tanahnya basa dibandingkan daerah Margoyoso.

5.2 SARAN

Saran untuk penelitian selanjutnya :

Perlu dilakukan replikasi dalam pengecekan profil tempat tumbuh (suhu & pH tanah) tanaman beluntas (*Pluchea indica* L) antara daerah Margoyoso Colo agar dapat mengoptimalkan terjadinya kesalahan dalam hasil analisa dan pengukuran.



DAFTAR PUSTAKA

- Alwiyah, A. Y., Sri W, M., & Edy S. W., (2015). *Pengaruh Intensitas Cahaya Terhadap Biomassa Dan Kadar Saponin Kalus Ginseng Jawa (Talinum Paniculatum Gaertn.) Pada Berbagai Waktu Kultur*. 1–23.
- Agustina, E. (2017). Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan Dari Ekstrak Daun Tiin (Ficus Carica Linn) Dengan Pelarut Air, Metanol Dan Campuran Metanol-Air. *Klorofil: Jurnal Ilmu Biologi Dan Terapan*, 1(1), 38–47. [Http://Jurnal.Uinsu.Ac.Id/Index.Php/Klorofil/Article/View/1240](http://Jurnal.Uinsu.Ac.Id/Index.Php/Klorofil/Article/View/1240)
- Ahemd, S. A. (2013). *Konstituen Fenolik Dan Aktivitas Biologis Genuspluchea*. 5(5), 109–114.
- Ahmad, A. R., Juwita, J., & Ratulangi, S. A. D. (2015). Penetapan Kadar Fenolik Dan Flavonoid Total Ekstrak Metanol Buah Dan Daun Patikala (Etlingera Elatior (Jack) R.M.Sm). *Pharmaceutical Sciences And Research*, 2(1), 1–10. [Https://Doi.Org/10.7454/psr.v2i1.3481](https://doi.org/10.7454/psr.v2i1.3481)
- Amin, A., Wunas, J., & Anin, Y. M. (2013). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Klika Faloak (Sterculia Quadrifida R.Br). *Fitofarmaka*, 2(2), 111–114.
- Andarina, R., & Djauhari, T. (2017). Antioksidan Dalam Dermatologi. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, 4(1), 39–48.
- Arifianti, L., Oktarina, R. D., & Kusumawati, I. (2014). Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi. *E-Journal Planta Husada*, 2(1), 3–6.
- Arifianti, L., Oktarina, R. D., Kusumawati, I., Farmakognosi, D., Farmasi, F., & Airlangga, U. (2014). Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinensetin Dalam Ekstrak Daun Orthosiphon Stamineus Benth. *Journal Planta Husada Vol.2, No.1 April 2014. E-Journal Planta Husada*, 2(1), 3–6.
- Arifin, B., & Ibrahim, S. (2018). Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1), 21–29. [Https://Doi.Org/10.31629/Zarah.V6i1.313](https://doi.org/10.31629/Zarah.V6i1.313)
- Auha, N. A., & Alauhdin, M. (2021). Indonesian Journal Of Chemical Science Development And Validation Of Infrared Spectroscopy Methods For Rutin Compound Analysis. *J. Chem. Sci.*, 10(2).

[Http://Journal.Unnes.Ac.Id/Sju/Index.Php/Ijcs](http://Journal.Unnes.Ac.Id/Sju/Index.Php/Ijcs)

- Azizah, B., & Salamah, N. (2013). Standarisasi Parameter Non Spesifik Dan Perbandingan Kadar Kurkumin Ekstrak Etanol Dan Ekstrak Terpurifikasi Rimpang Kunyit. *Pharmaciana*, 3(1). <https://doi.org/10.12928/Pharmaciana.V3i1.416>
- Azizah, Z., Elvis, F., Zulharmita, Misfadhila, S., Chandra, B., & Yetti, R. D. (2020). Penetapan Kadar Flavonoid Rutin Pada Daun Ubi Kayu (Manihot Esculenta Crantz) Secara Spektrofotometri Sinar Tampak. *Jurnal Farmasi Higea*, 12(1), 90–98.
- Bakti, A. A., Triyasmono, L., & Rizki, M. I. (2017a). Penentuan Kadar Flavonoid Total Dan Uji Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kasturi (*Mangifera Casturi Kosterm.*) Dengan Metode Dpph. 04(01), 102–108.
- Bakti, A. A., Triyasmono, L., & Rizki, M. I. (2017b). Penentuan Kadar Flavonoid Total Dan Uji Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kasturi (Mangifera Casturi Kosterm.) Dengan Metode Dpph. *Jurnal Pharmascience*, 4(1), 102–108. <https://doi.org/10.20527/Jps.V4i1.5762>
- Faisal, A. P., Nasution, P. R., & Wakidi, R. F. (2022). Aktivitas Antioksidan Dari Daun Bintangur (*Calophyllum Inophyllum L.*) Terhadap Radikal Bebas Dpph Antioxidant Activity Of Bintangur Leaves (*Calophyllum Inophyllum L.*) Against Dpph Free Radical (1 , 1. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 4(1). <https://doi.org/10.33759/Jrki.V4i1.200>
- Faisal, H. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Okra (*Abelmoschus Esculentus L. Moench*) Dengan Metode Dpph (1 , 1- Difenil-2-Pikrilhidrazil) Dan Metode Abts. *Regional Development Industry & Health Science, Technology And Art Of Life*, 2 (1), 1–5.
- Fatonah, S. Asih, D. Mulyanti, D. Iriani, D. (2013). No Title. *Biospecies*, 6(2).
- Gutbrodt, B., Dorn, S., Unsicker, S. B., & Mody, K. (2012). Species-Specific Responses Of Herbivores To Within-Plant And Environmentally Mediated Between-Plant Variability In Plant Chemistry. *Chemoecology*, 22(2), 101–111. <https://doi.org/10.1007/S00049-012-0102-1>
- Hadiyanti, N., & Pardono, S. (2018). Diversity Of Ciplukan (*Physalis Spp*) On The

- Gradient Of Mt. Kelud, East Java. *Beita Biologi*, 17(2), 135–146. [Http://E-Journal.Biologi.Lipi.Go.Id/Index.Php/Berita_Biologi/Article/View/3238/2980](http://E-Journal.Biologi.Lipi.Go.Id/Index.Php/Berita_Biologi/Article/View/3238/2980)
- Hafsari, A. R., Tri, C., Toni, S., & Rahayu, I. L. (2015). Uji Aktivitas Antibakteri Daun Beluntas. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Beluntas (Pluchea Indica (L.) Less.) Terhadap Propionibacterium Acnes Penyebab Jerawat*, 9(1), 142–161.
- Hammado, N., & Illing, I. (2013). Identifikasi Senyawa Bahan Aktif Alkaloid Pada Tanaman Lahuna (Eupatorium Odoratum). *Jurnal Dinamika*, 04(2), 1–18.
- Hanifah Salma. (2014). *Isolasi Dan Elusidasi Struktur Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Etil Asetat Daun Angiopteris Palmiformis (Cav.) C.Chr.*
- Hidayah, N., Purwanto, D. A., & Isnaeni. (2015). Penapisan Aktivitas Antioksidan Kombinasi Yogurt Dan Jus Tomat Dibandingkan Dengan Vitamin C. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, 3(1), 41–48. [Https://Repository.Unair.Ac.Id/90550/](https://Repository.Unair.Ac.Id/90550/)
- Ibrahim, W., Mutia, R., Nelwida, & Berliana. (2016). Penggunaan Kulit Nanas Fermentasi Dalam Ransum Yang Mengandung Gulma Berkhasiat Obat Terhadap Konsumsi Nutrient Ayam Broiler (Fermented Pineapple Peel Supplementation With Addition Of Medicinal Weeds On Nutrient Intake Consumption Of Broiler Chicken). *Agripet*, 16(2), 76–82.
- Idris, A., Linatoc, A. C., Abu Bakar, M. F., Ibrahim Takai, Z., & Audu, Y. (2018). Effect Of Light Quality And Quantity On The Accumulation Of Flavonoid In Plant Species. *Journal Of Science And Technology*, 10(3). [Https://Doi.Org/10.30880/Jst.2018.10.03.006](https://doi.org/10.30880/jst.2018.10.03.006)
- Ikalinus, R., Widyastuti, S., & Eka Setiasih, N. (2015). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (Moringa Oleifera). *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(1), 71–79.
- Illing, I., Safitri, W., & Erfiana. (2017). Uji Fitokimia Ekstrak Buah Degen Ilmiati Illing, Wulan Safitri Dan Erfiana. *Jurnal Dinamika*, 8(1), 66–84.
- Indarto, I., Narulita, W., Anggoro, B. S., & Novitasari, A. (2019). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong Terhadap Propionibacterium Acnes. *Biosfer: Jurnal Tadris Biologi*, 10(1), 67–78. [Https://Doi.Org/10.24042/Biosfer.V10i1.4102](https://doi.org/10.24042/biosfer.v10i1.4102)

- Karyati, Putri, R. O., & Syafrudin, M. (2018). Soil Temperature And Humidity At Post Mining Revegetation In Pt Adimitra Baratama Nusantara, East Kalimantan Province. *Agrifor*, 17(1), 103–114.
- Koirewoa, Y. A., Fatimawali, & Wiyono, W. I. (2012). Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Dalam Daun Beluntas (*Pluchea Indica* L.). *Pharmacon*, 1(1), 47–52.
- Kurniasih, N., Kusmiyati, M., Nurhasanah, Puspita Sari, R., & Wafdan, R. (2015). Potensi Daun Sirsak (*Annona Muricata* Linn), Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis), Dan Daun Benalu Mangga (<I>Dendrophthoe Pentandra) Sebagai Antioksidan Pencegah Kanker. *Jurnal Istek*, 9(1), 162–184. <https://journal.uinsgd.ac.id/index.php/istek/article/view/182>
- Lukiyono, Y. T., Sudjarw, G. W., Haq, M. N. A., & Mahmiah. (2020). Uji Aktivitas Antioksidan Nanopartikel Kitosan Dari Limbah Kulit Udang Litopenaeus Vannamei Menggunakan Metode Dpph. *Prosiding Seminar Nasional Kesehatan*, 1–5.
- Maesaroh, K., Kurnia, D., & Al Anshori, J. (2018). Perbandingan Metode Uji Aktivitas Antioksidan Dpph, Frap Dan Fic Terhadap Asam Askorbat, Asam Galat Dan Kuersetin. *Chimica Et Natura Acta*, 6(2), 93. <https://doi.org/10.24198/cna.v6.n2.19049>
- Magfiroh, U. L. (2017). Faktor Ketinggian Tempat Terhadap Sintesis Vitamin Buah Carica (*Carica Pubescens*). *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Biologi*, 2011, 69–74.
- Maliníková, E., Kukla, J., Kuklová, M., & Balážová, M. (2013). Altitudinal Variation Of Plant Traits: Morphological Characteristics In *Fragaria Vesca* L. (Rosaceae). *Annals Of Forest Research*, 56(1), 79–89. <https://doi.org/10.15287/afr.2013.45>
- Maulida, R., & Guntarti, A. (2015). Pengaruh Ukuran Partikel Beras Hitam (*Oryza Sativa* L.) Terhadap Rendemen Ekstrak Dan Kandungan Total Antosianin. *Pharmaciana*, 5(1), 9–16. <https://doi.org/10.12928/Pharmaciana.V5i1.2281>
- Misbahri. Indrayana, M.T. Bebasar, E. 2014. (2014). *Fakultas Kedokteran Universitas Riau Pekanbaru 2021*. 1(2), 1–17.
- Mohamad, Irfan Fitriansyah; And Raden, B. I. (2017). Review: Profil Fitokimia Dan

- Aktivitas Farmakologi Baluntas (*Pluchea Indica* L.). *Unsrat Press*, 16(2), 337–346.
- Mulangsri, D. A. K., Budiarti, A., & Saputri, E. N. (2017). Aktivitas Antioksidan Fraksi Dietileter Buah Mangga Arumanis (*Mangifera Indica* L.) Dengan Metode Dpph. *Jurnal Pharmascience*, 4(1), 85–93. <https://doi.org/10.20527/Jps.V4i1.5760>
- Noer, S., Pratiwi, R. D., & Gresinta, E. (2018). Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Tanin, Saponin Dan Flavonoid) Sebagai Kuersetin Pada Ekstrak Daun Inggu (*Ruta Angustifolia* L.). *Jurnal Eksakta*, 18(1), 19–29. <https://doi.org/10.20885/Eksakta.Vol18.Iss1.Art3>
- Pavarini, D. P., Pavarini, S. P., Niehues, M., & Lopes, N. P. (2012). Exogenous Influences On Plant Secondary Metabolite Levels. *Animal Feed Science And Technology*, 176(1–4), 5–16. <https://doi.org/10.1016/J.Anifeedsci.2012.07.002>
- Pradipta, A. E., & Applied. (2018). *Pertumbuhan Dan Multiplikasi Tunas Adventif Bulbil Bawang Putih (Allium Sativum L.) Pada Beberapa Komposisi Zat Pengatur Tumbuh*. 1–23.
- Prahesti, D. A., Pujiyanti, S., Rukmi, I., Biologi, D., Sains, F., & Diponegoro, U. (2018). Isolasi , Uji Aktivitas , Dan Optimasi Inhibitor A-Amilase Isolat Kapang Endofit Tanaman Binahong (*Anredera Cordifolia*) (Ten .) Steenis. 7(1).
- Pujiastuti, E., & Islamiyati, R. (2021). Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Dan Air Ranting Buah Parijoto (*Medinilla Speciosa* Blume) Dengan Peredaman Radikal Bebas Dpph. *Cendekia Journal Of Pharmacy*, 5(2), 135–144.
- Rachmadiarti, F., Surabaya, U. N., Dewi, S. K., Surabaya, U. N., Soegianto, A., & Airlangga, U. (2019). Kandungan Total Fenolik Dan Flavonoid Darikudis *Elephantopus* Dan *Ageratum Conyzoides* (*Asteraceae*) Ekstrak Daun Dari Berbagai Habitat Ketinggian.
- Rifai, G., Rai Widarta, I. W., & Ayu Nocianitri, K. (2018). Pengaruh Jenis Pelarut Dan Rasio Bahan Dengan Pelarut Terhadap Kandungan Senyawa Fenolik Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Alpukat (*Persea Americana* Mill.). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (Itepa)*, 7(2), 22. <https://doi.org/10.24843/Itepa.2018.V07.I02.P03>

- Riskiyani, T., Nurcahyo, H., & Febriyanti, R. (2020). *Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Flavonoid Ekstrak Daun Beluntas (Pluchea Indica L)*. 7(1), 3.
- Ruma, O. C., & Zipagang, T. B. (2015). Determination Of Secondary Metabolites And Antibacterial Property Of Extract From The Leaves Of Stachytarpheta Jamaicensis (L.) Vahl. *Journal Of Medicinal Plant Studies*, 3(4), 79–81.
- Ruswanto, R., Garna, I. M., Tuslinah, L., Mardianingrum, R., Lestari, T., & Nofianti, T. (2018). Kuersetin, Penghambat Uridin 5-Monofosfat Sintase Sebagai Kandidat Anti-Kanker. *Alchemy Jurnal Penelitian Kimia*, 14(2), 236. <https://doi.org/10.20961/Alchemy.14.2.14396.236-254>
- Safrina, D., & Priyambodo, W. J. (2018). Pengaruh Ketinggian Tempat Tumbuh Dan Pengerangan Terhadap Flavonoid Total Sambang Colok (Iresine Herbstii). *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian*, 15(3), 147. <https://doi.org/10.21082/jpasca.V15n3.2018.147-154>
- Saputri, D. A., Kamelia, M., Almayra, S., & Fatayati, S. (2019). Perubahan Anatomi Dan Morfologi Daun Kedelai (Glysin Max L. (Merril), Dan Alang-Alang (Imperata Cylindrica L.) Yang Tumbuh Di Tempat Terbuka Dan Ternaungi. *Bioedukasi (Jurnal Pendidikan Biologi)*, 10(1), 75. <https://doi.org/10.24127/Bioedukasi.V10i1.2012>
- Sari, R., Muhani, M., & Fajriaty, I. (2017). Antibacterial Activity Of Ethanolic Leaves Extract Of Agarwood (Aquilaria Microcarpa Baill.) Against Staphylococcus Aureus And Proteus Mirabilis. *Pharmaceutical Sciences And Research*, 4(3), 143–154. <https://doi.org/10.7454/Psr.V4i3.3756>
- Semirata, P., & Lampung, F. U. (2013). *Semirata 2013 Fmipa Unila |291 Struktur Anatomi Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kersen (Muntingia Calabura)*. 291–296.
- Setiawan, F., Yunita, O., & Kurniawan, A. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kayu Secang Dan Frap. *Media Pharmaceutica Indonesiana*, 2(2), 82–89.
- Sibarani, V. R., Wowor, P. M., & Awaloei, H. (2013). Uji Efek Analgesik Ekstrak Daun Beluntas (Pluchea Indica (L.) Less.) Pada Mencit (Mus Musculus). *Jurnal E-Biomedik*, 1(1), 621–628. <https://doi.org/10.35790/Ebm.1.1.2013.4609>

- Silalahi, M. (2019). Pemanfaatan Beluntas (*Pluchea Indica* (L.) Less) Dan Bioaktivitasnya (Kajian Lanjutan Pemanfaatan Tumbuhan Dari Pengabdian Kepada Masyarakat Di Desa Sindang Jaya, Kabupaten Cianjur). *Vivabio: Jurnal Pengabdian Multidisiplin*, 1(1), 8–18. <https://doi.org/10.35799/Vivabio.V1i1.24739>
- Sri Widyawati, P., Budianta, T. D. W., Kusuma, F. A., & Wijaya, E. L. (2014). Difference Of Solvent Polarity To Phytochemical Content And Antioxidant Activity Of *Pluchea Indica* Less Leaves Extracts. *International Journal Of Pharmacognosy And Phytochemical Research*, 6(4), 850–855.
- Sutriandi, A., Maulana, I. T., & Sadiyah, E. R. (2016). Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Mutu Ekstrak Biji Kara Benguk (*Mucuna Pruriens* (L.) DC.) Yang Dihasilkan. *Prosiding Farmasi*, 2(2), 710–716.
- Utami, N. F., Sutanto, Nurdayanty, S. M., & Suhendar, U. (2020). Pengaruh Berbagai Metode Ekstraksi Pada Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Iler (*Plectranthus Scutellarioides*). *Fitofarmaka: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 10(1), 76–83.
- Utomo, D. S., Kristiani, E. B. E., & Mahardika, A. (2020). Pengaruh Lokasi Tumbuh Terhadap Kadar Flavonoid, Fenolik, Klorofil, Karotenoid Dan Aktivitas Antioksidan Pada Tumbuhan Pecut Kuda (*Stachytarpheta Jamaicensis*). *Bioma*, 22(2), 143–149.
- Wahyuningsih, Triyanti, M., & Sepriyaningsih, S. (2019). Inventarisasi Tumbuhan Paku (*Pteridophyta*) Di Perkebunan Pt Bina Sains Cemerlang Kabupaten Musi Rawas. *Jurnal Biosilampari: Jurnal Biologi*, 2(1), 29–35. <https://doi.org/10.31540/Biosilampari.V2i1.815>
- Wanita, D. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea Indica* L.) Dengan Metode Dpph (2, 2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). *Indonesian Chemistry And Application Journal*, 2(2), 25. <https://doi.org/10.26740/Icaj.V2n2.P25-28>
- Wardaningrum, R. Y. (2019). Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Terpurifikasi Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas* .L) Dengan Vitamin E. *Progress In Retinal And Eye Research*, 561(3), S2–S3.
- Wicaksono, T. B, Hasjim, S. & Haryadi, N. T. (2019). Program Studi Agroteknologi,

- Fakultas Pertanian, Universitas Jember, Jl. Kalimantan 37 Jember. 68121
Program Studi Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian, Universitas Jember, Jl.
Kalimantan 37 Jember. 68121. *Bioindustri*, 02(01), 399–412.
- Widiasari, S. (2018). *Mekanisme Inhibisi Angiotensin Converting Enzym Oleh Flavonoid Pada Hipertensi Inhibition Angiotensin Converting Enzym Mechanism By Flavonoid In Hypertension*. 1(2), 30–44.
- Widyasari, E. M., Sriyani, M. E., Daruwati, I., Halimah, I., & Nuraeni, W. (2019). Karakteristik Fisikokimia Senyawa Bertanda 99mtc-Kuersetin. *Jurnal Sains Dan Teknologi Nuklir Indonesia*, 20(1), 9. <https://doi.org/10.17146/Jstni.2019.1.1.4108>
- Widyawati, P. S., Budianta, T. D. W., Gunawan, D. I., & Wongso, R. S. (2015). Evaluation Antidiabetic Activity Of Various Leaf Extracts Of Pluchea Indica Less. *International Journal Of Pharmacognosy And Phytochemical Research*, 7(3), 597–603.
- Widyawati, P. S., Budianta, T. D. W., Werdani, Y. D. W., & Halim, M. O. (2018). Aktivitas Antioksidan Minuman Daun Beluntas Teh Hitam (Pluchea Indica Less-Camelia Sinensis). *Agritech*, 38(2), 200. <https://doi.org/10.22146/Agritech.25699>
- Wulansari, A. N. (2018). Alternatif Cantigi Ungu (Vaccinium Varingiaefolium) Sebagai Antioksidan Alami : Review. *Farmaka*, 16(2), 419–429.
- Yuliani, Y., Surabaya, U. N., Yanuwadi, B., Brawijaya, U., Leksono, A., & Brawijaya, U. (2015). *Kandungan Total Fenolik Dan Flavonoid Pluchea Indica Lebih Sedikit Ekstrak Daun Dari Beberapa Habitat Ketinggian*.
- Yulianto, D., & Savitri, S. R. (2019). Perbandingan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanolik Daun Beluntas (Pluchea Indica L.) Berdasarkan Variasi Konsentrasi Pelarut Secara Spektrofotometer Uv–Vis. *Surya Medika: Jurnal Ilmiah Ilmu Keperawatan Dan Ilmu Kesehatan Masyarakat*, 14(1), 18–25. <https://doi.org/10.32504/Sm.V14i1.104>
- Yunita, E., Yulianto, D., Fatimah, S., & Firanita, T. (2020). Validation Of Uv-Vis Spectrophotometric Method Of Quercetin In Ethanol Extract Of Tamarind Leaf. *Journal Of Fundamental And Applied Pharmaceutical Science*, 1(1), 10–18. <https://doi.org/10.18196/Jfaps.010102>

Yustiningsih, M. (2019). Bio-Edu : Jurnal Pendidikan Biologi Intensitas Cahaya Dan Efisiensi Fotosintesis Pada Tanaman Naungan Dan. *Jurnal Pendidikan Biologi*, 4(2), 44–49.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Keterangan Selesai Penelitian