BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi dua yaitu bahan baku dan bahan kimia untuk keperluan analisa.

1. Bahan Baku

   Bahan baku yang digunakan adalah daun beluntas ruas daun nomor satu hingga enam dari pucuk. Daun beluntas yang digunakan diperoleh dari beberapa tempat disebabkan karena keterbatasan jumlah daun beluntas dari masing-masing lokasi, anatara lain Perumahan Pakuwon City Laguna; Taman Bendul Merisi Selatan, Kelurahan Bendul Merisi; Kelurahan Keputih, Kecamatan Sukolilo; dan Perumahan Babatan Pratama Wiyung yang berada di daerah Surabaya serta di Desa Lambang Kuning, Kecamatan Kertosono, Kabupaten Nganjuk.

2. Bahan Kimia untuk Analisa

   Bahan kimia yang digunakan untuk analisa daun beluntas adalah metanol (*Fulltime*), etanol (*J.T.Baker*), etil asetat (*J.T.Baker*), heksana (*J.T.Baker*), kloroform (*Merck*), amoniak (*Mallinckrodt*), H_2SO_4 (*Merck*), $HgCl_2$, KI (*Merck*), I_2 (*Merck*), NaOH (*Merck*), eter, asam asetat glasial (*Merck*), HCl (*Merck*), n-amil alkohol (*Merck*), serbuk Mg (*Merck*), $FeCl_3$ (*Merck*), Na-K-tartrat tetrahidrat (*Sigma-Aldrich*), Cu_2SO_4 , Na_2CO_3 (*Riedel-deHaën*), asam galat (*Riedel-deHaën*), folin-ciocalteu (*Merck*), $NaNO_2$ (*Merck*), $AlCl_3$ (*Schuchardt OHG*), (+)-katekin (*Sigma*), buffer fosfat yang terdiri dari sodium dihidrogen fosfat dihidrat (*Merck*) dan di-sodium hidrogen fosfat dihidrat (*Merck*), kalium ferri sianida (*Merck*), asam trikloroasetat (*Riedel-deHaën*), $FeCl_3$ (*Merck*), akuades (*PT Megah Sejahtera Scientific*), kertas saring kasar,

keras saring Whatmann No.40 (*Macherey-Nagel*, Ø 125 mm), kertas lensa, dan *aluminium foil*.

4.2. Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan meliputi alat untuk penepungan daun beluntas, alat untuk ekstraksi, dan alat untuk analisa.

a. Alat yang digunakan dalam penepungan daun beluntas adalah *chopper* (*Phillips*), ayakan 45 mesh (*Retsch*), dan solet plastik.
b. Alat yang digunakan untuk ekstraksi daun beluntas adalah seperangkat alat *Soxhlet apparatus* (*Schoot Duran*) dan *heater* (*Mantle*). Alat yang digunakan untuk menguapkan pelarut setelah diekstraksi adalah (*Büchi Waterbath B-480* dan *Büchi Rotavapor R-124*) serta *heat exchanger* (*Jeio Tech*).
c. Alat yang digunakan untuk analisa adalah spektrfotometer UV-Vis (*Shimadzu UV 1800 Pharmaspee*), kuvet (*Hellma*, *10mm*), seperangkat alat AAS (*Atomic Absoption Spectrosopy*), tabung sentrifus 15 mL (*Greiner*), eksikator (*Schoot Duran*), oven (*Binder*), oven vakum (*Binder*), akuades *purifier* (*Branstead*), neraca analitis (*Mettler Toledo*), vortex (*GSA MX-S*), vial/ *microcup*, mikro pipet (*Eppendorf*), *bulb* (D&N), lemari asam, *spot plate*, rak tabung reaksi, sendok tanduk, penangas, bunsen LPG, kaki tiga, botol semprot, refrigerator (LG), *freezer* (LG), dan seperangkat alat gelas (RRC, Schoot Duran, dan Pyrex).

4.3. Metode Penelitian

Metode penelitian meliputi tempat, waktu, dan rancangan penelitian.

4.3.1. Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, yaitu: Laboratorium

Kimia, Laboratorium Kimia-Biokimia Pangan dan Gizi, Laboratorium Teknologi Pengolahan Pangan, Laboratorium Analisa Pangan, serta Laboratorium Penelitian.

4.3.2. Waktu Penelitian

Penelitian pendahuluan dilakukan pada bulan Mei sampai dengan Oktober 2013. Penelitian utama dilaksanakan pada bulan November sampai dengan Desember 2013.

4.3.3. Rancangan Penelitian

Faktor penelitian ini terdiri atas lima perlakuan yaitu perbedaan jenis pelarut ekstraksi tepung daun beluntas kering yang terdiri dari lima perlakuan yaitu ekstrak daun beluntas dengan pelarut air, ekstrak daun beluntas dengan pelarut metanol, ekstrak daun beluntas dengan pelarut etanol, ekstrak daun beluntas dengan pelarut etil asetat, dan ekstrak daun beluntas dengan pelarut heksana. Masing-masing perlakuan dilakukan ulangan sebanyak lima kali sehingga secara keseluruhan diperoleh 25 unit eksperimen. Rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Penelitian ini menggunakan parameter uji adalah pengujian rendemen, pengujian sifat fitokimia secara kualitatif, pengujian kadar antioksidan secara kuantitatif meliputi total fenol dan total flavonoid, serta pengujian kemampuan antioksidan ekstrak daun beluntas dalam mereduksi ion besi (Fe^{3+}) dari ekstrak daun beluntas, serta parameter pendukung yaitu pengujian kadar air dan kadar Fe dari tepung daun beluntas. Data yang ada akan dihitung standar deviasi dan rata-ratanya untuk analisis kemampuan mereduksi ion besi (Fe^{3+}).

Tabel 4.1. Rancangan Penelitian

Perlakuan	Jenis Pelarut
P_1	Air
P_2	Metanol
P_3	Etanol
P_4	Etil Asetat
P_5	Heksana

Tabel 4.2. Matriks Perlakuan dan Ulangan

Ulangan (U)	Jenis Pelarut (P)				
	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5
U_1	$U_1 P_1$	$U_1 P_2$	$U_1 P_3$	$U_1 P_4$	$U_1 P_5$
U_2	$U_2 P_1$	$U_2 P_2$	$U_2 P_3$	$U_2 P_4$	$U_2 P_5$
U_3	$U_3 P_1$	$U_3 P_2$	$U_3 P_3$	$U_3 P_4$	$U_3 P_5$
U_4	$U_4 P_1$	$U_4 P_2$	$U_4 P_3$	$U_4 P_4$	$U_4 P_5$
U_5	$U_5 P_1$	$U_5 P_2$	$U_5 P_3$	$U_5 P_4$	$U_5 P_5$

Keterangan:

U_1P_1= ekstraksi tepung daun beluntas dengan pelarut air dan merupakan ulangan pertama dari lima ulangan.

U_3P_2= ekstraksi tepung daun beluntas dengan pelarut metanol dan merupakan ulangan ketiga dari lima ulangan.

U_5P_5= ekstraksi tepung daun beluntas dengan pelarut heksana dan merupakan ulangan kelima dari lima ulangan.

4.3.4. Unit Eksperimen

Daun beluntas yang diperoleh dari masing-masing daerah dikeringkan selama tujuh hari pada suhu ruang, kemudian dilakukan penepungan hingga diperoleh tepung daun beluntas berukuran 45 mesh. Tepung daun beluntas kering yang diperoleh sebayak 250 gram dan diaduk dengan sendok plastik selama dua menit agar homogen. Tepung daun beluntas dibagi menjadi lima bagian sebanyak 50 gram untuk setiap perlakuan. Masing-masing tepung daun beluntas kering dikemas dalam plastik PE (*polyethylene*) yang di *seal*, kemudian dilapisi dengan alumunium foil. Penyimpanan tepung daun beluntas kering pada suhu 4-5^{o}C. Ekstraksi dilakukan dengan menimbang 10 gram tepung daun beluntas dari setiap

plastik sesuai dengan perlakuannya. Unit eksprimen dalam penilitian ini ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3. Unit Eksperimen

Ulangan (U)	Jenis Pelarut (P)				
	P_1	P_2	P_3	P_4	P_5
U_1	10 gram	10 gram	10 gram	10 gram	10 gram
U_2	10 gram	10 gram	10 gram	10 gram	10 gram
U_3	10 gram	10 gram	10 gram	10 gram	10 gram
U_4	10 gram	10 gram	10 gram	10 gram	10 gram
U_5	10 gram	10 gram	10 gram	10 gram	10 gram

4.4. Pelaksanaan Penelitian

4.4.1. Ekstraksi Daun Beluntas

Metode ekstraksi yang digunakan untuk mengekstrak daun beluntas adalah metode *Soxhlet.* Prinsip dari metode *Soxhlet* adalah melarutkan komponen-komponen yang terkandung dalam daun beluntas dengan pelarut organik dengan berbagai tingkat kepolaran, sehingga diperoleh campuran komponen yang terlarut dalam masing-masing pelarut. Diagram alir ekstraksi daun beluntas dapat dilihat pada Gambar 4.2. Tahapan ekstraksi daun beluntas terdiri dari beberapa tahap, yaitu sebagai berikut:

1. Pengeringan daun beluntas

Pengeringan daun beluntas ruas nomor satu hingga enam dikeringkan pada suhu kamar selama tujuh hari (Widyawati dkk., 2010). Tahapan ini bertujuan untuk menurunkan kadar air daun beluntas sehingga mempermudah dalam proses penepungan.

2. Penepungan daun beluntas

Daun beluntas yang telah kering kemudian dilakukan pengecilan ukuran dengan *chopper* hingga lolos ayakan 45 mesh (Widyawati dkk., 2010 dengan modifikasi). Tahapan ini bertujuan untuk mengecilkan ukuran daun

beluntas sehingga dapat memperluas kontak antara bahan dan pelarut pada proses ekstraksi.

3. Ekstraksi daun beluntas

Daun beluntas yang lolos ayakan 45 mesh diekstrak dengan beberapa macam pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya (air, metanol, etanol, etil asetat, dan heksana). Ekstraksi yang dilakukan menggunakan metode ekstraksi *Soxhlet* pada titik didih masing-masing pelarut selama tiga jam. Titik didih pelarut dapat dilihat pada Tabel 4.4. Perbandingan berat tepung daun beluntas dengan pelarut adalah 1:15 (b/v), yang berarti 10 gram tepung daun beluntas diekstrak dengan 150 mL pelarut.

Tabel 4.4. Titik Didih Pelarut

Pelarut	Titik Didih (°C)
Air	100
Metanol	64,7
Etanol	78,32
Etil Asetat	77
Heksana	69

Sumber: Perry (1984); Munawaroh dkk., (2010)

Tabung ekstraksi *Soxhlet* yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.1. Tabung ekstraksi *Soxhlet* yang digunakan ada empat buah dan tidak dapat dikendalikan homogenitasnya karena keterbatasan alat yang tersedia. Masing-masing tabung ekstraksi memiliki karakteristik sebagai berikut:

a. Panjang sifon tabung ekstraksi *Soxhlet* A, B, C, dan D secara berurutan adalah 9,2cm; 6cm; 10cm; dan 10,2cm.
b. Diameter atas tabung ekstraksi *Soxhlet* A adalah 5,5cm dan diameter atas tabung ekstraksi *Soxhlet* B, C, dan D adalah 4,5cm.
c. Diameter bawah tabung ekstraksi *Soxhlet* A, B, C, dan D adalah 2cm.

d. Jumlah sirkulasi tabung ekstraksi *Soxhlet* B tiga kali lebih cepat dibandingkan dengan sirkulasi tabung ekstraksi *Soxhlet* A, C, dan D.

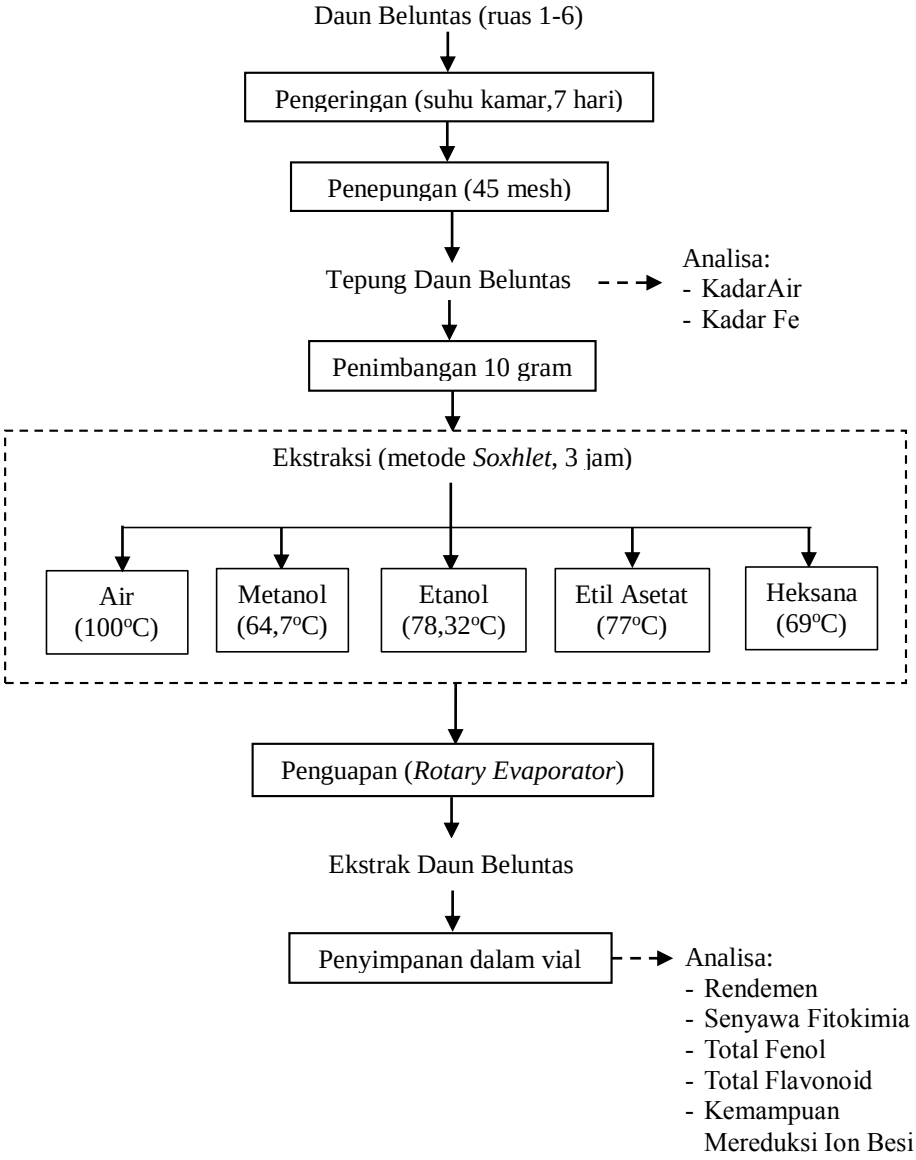
Gambar 4.1. Tabung Ekstraksi *Soxhlet* yang Digunakan

4. Penguapan pelarut hasil ekstraksi daun beluntas

Penguapan pelarut hasil ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Suhu penguapan yang digunakan dibawah titik didih masing-masing pelarut yang digunakan, serta tekanan 200-300 bar dan kecepatan putaran 60 rpm. Tahapan ini bertujuan untuk menguapkan pelarut sehingga diperoleh ekstrak pekat.

5. Penyimpanan ekstrak

Ekstrak pekat hasil penguapan pelarut disimpan didalam vial/*microcup* dengan volume 2 mL sebanyak dua vial. Ekstrak tersebut yang digunakan sebagai sampel untuk berbagai macam analisa dan disimpan pada suhu 4^{o}C.



Gambar 4.2. Diagram Alir Penelitian Ekstraksi Daun Beluntas

4.4.2. Metode Analisa

Analisa yang dilakukan dalam penelitian ini terdiri atas:

4.4.2.1. Analisa Kadar Air Tepung Daun Beluntas (AOAC, 2005)

Analisa kadar air tepung daun beluntas mengunakan metode gravimetri. Prinsip analisa kadar air dengan metode gravimetri adalah menguapkan air yang terkandung dalam tepung daun beluntas dengan cara dipanaskan dalam oven vakum. Penggunaan oven vakum memiliki suhu lebih rendah dari oven biasa, selain itu penggunaan oven vakum juga diimbangi dengan tekanan tertentu. Kadar air diperoleh dari perhitungan selisih berat akhir sampel setelah pemanasan (berat akhir yang telah konstan) dengan berat awal sampel dibagi dengan berat awal sampel untuk %wb (*wet basis*) atau dibagi dengan berat akhir sampel yang telah konstan %db (*dry basis*).

4.4.2.2. Analisa Kadar Fe Tepung Daun Beluntas (AOAC, 2005)

Analisa kadar Fe tepung daun beluntas menggunakan metode spektrofotometri serapan nyala/ *atomic absorption spectroscopy* (AAS). Prinsip analisa kadar Fe dengan metode AAS adalah atomisasi Fe dalam sampel dan absorbsi radiasi sinar yang melewati sampel yang telah diatomisasi, yang diukur pada panjang gelombang tertentu (385,8 nm).

4.4.2.3. Analisa Rendemen (Ljubuncic *et al.*, 2005)

Prinsip analisa rendemen ekstrak tepung daun beluntas berdasarkan metode gravimetri yaitu membandingkan berat ekstrak daun beluntas yang diperoleh dengan berat sampel yang digunakan untuk ekstraksi.

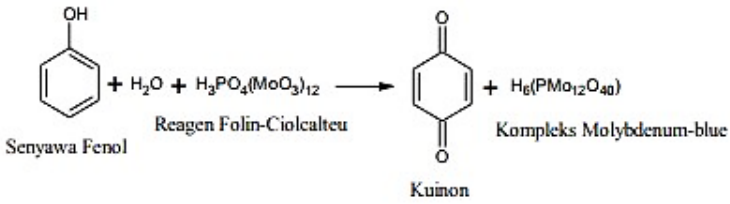
4.4.2.4. Analisa Senyawa Fitokimia Daun Beluntas (Harborne, 1996 dengan modifikasi)

Analisa senyawa fitokimia daun beluntas meliputi analisa alkaloid, analisa flavonoid dan fenolik, analisa triterpenoid dan sterol, analisa flavonoid, saponin, dan tanin, serta analisa kardiak glikosida (uji Fehling). Analisa senyawa fitokimia dilakukan secara kualitatif dengan mengamati perubahan warna sampel yang terjadi. Tujuan analisa senyawa fitokimia untuk mengetahui senyawa fitokimia yang terdapat dalam daun beluntas.

4.4.2.5. Analisa Kadar Antioksidan berdasarkan Uji Kualitatif

4.4.2.5.1. Analisa Total Fenol (Kumar *et al.*, 2008)

Analisa kadar total fenol menggunakan metode kolorimetri Folin Ciocalteu (FC). Prinsip analisa kadar total fenol adalah reaksi reduksi antara senyawa fenolik yang terdapat dalam ekstrak sampel dengan reagen FC yang terkandung senyawa asam fosmolibdat dan asam fosfotungstat, menghasilkan senyawa kompleks dari tungsten dan molibdenum oksida yang berwarna biru. Warna biru yang dihasilkan diukur pada panjang gelombang 765 nm. Reaksi antara senyawa fenol dengan reagen FC dapat dilihat pada Gambar 4.3. Intensitas absorbsi berbanding lurus dengan konsentrasi fenol (Waterhouse, 2002; Mediyaningsih, 2009). Standar yang digunakan adalah asam galat dengan berbagai konsentrasi, sehingga kadar total fenol dinyatakan dalam *Gallic Acid Equivalent* (GAE).

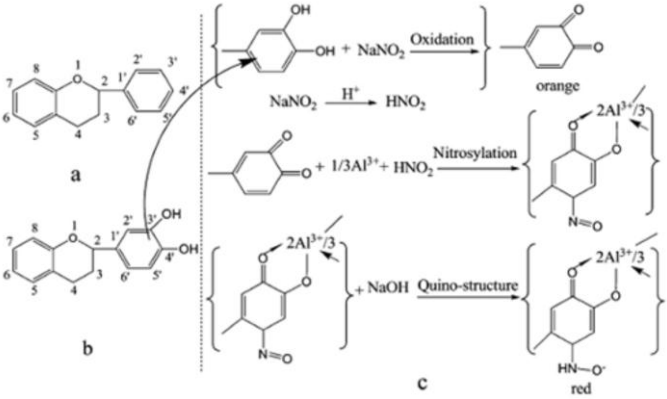


Gambar 4.3. Reaksi antara Senyawa Fenol dengan Reagen Folin-Ciolcalteu

Sumber: Hardianta dkk. (2012)

4.4.2.5.2. Analisa Total Flavonoid (Kumar *et al.*, 2008)

Analisa kadar total flavonoid menggunakan metode kolorimetri alumunium klorida. Prinsip analisa kadar total flavonoid adalah penambahan $AlCl_3$ pada sampel yang mengandung senyawa flavonoid sehingga terbentuk kompleks asam yang stabil dengan C-4 gugus keto, C-3 atau C-5 gugus hidroksil membentuk kompleks asam yang labil dengan gugus orto dihidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (Fessenden dan Fessenden, 1986 dalam Ukieyana, 2012). Reaksi dalam penentuan total flavonoid dapat dilihat pada Gambar 4.4. Senyawa komplek yang dihasilkan berwarna merah dan diukur pada panjang gelombang 510 nm. Standar yang digunakan adalah (+)-katekin dengan berbagai konsentrasi, sehingga kadar total flavonoid dinyatakan dalam *Catechin Equivalent* (CE).



Gambar 4.4. Reaksi antara Senyawa Flavonoid dalam Penentuan Total Flavonoid dengan Pereaksi $AlCl_3$ dalam Suasana Basa (NaOH)
Sumber: Zarnia dan Tan (2013)

4.4.2.6. Analisa Aktivitas Antioksidan dalam Mereduksi Ion Besi (Fe^{2+}) (Jayanthi dan Lalitha, 2011 dengan modifikasi)

Analisa aktivitas antioksidan dalam mereduksi ion besi menggunakan metode *Ferric Reducing Power* (FRP). Prinsip analisa aktivitas antioksidan dalam mereduksi ion besi adalah uji kolorimetri berbasis reaksi reduksi. Kekuatan mereduksi dilakukan berdasarkan kemampuan antioksidan untuk mereduksi ion Fe^{3+} menjadi ion Fe^{2+}, hal ini ditandai dengan perubahan warna dari kuning menjadi hijau atau biru. Metode ini menggunakan kompleks $Fe(CN)_6^{3-}$ sebagai pereaksi (Koksal *et al*, 2011). Reaksinya dapat dilihat pada Gambar 4.5.

$$Fe(CN)_6^{3-} + A\text{-}OH \rightarrow Fe(CN)_6^{4-} + A{=}O$$

$$Fe(CN)_6^{4-} + FeCl_3 \rightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3$$

Gambar 4.5. Reaksi Reduksi Ion Besi (Fe^{3+}) dengan Metode *Ferric Reducing Power* (FRP) Sumber: Koksal *et al*. (2011)

Senyawa komplek yang dihasilkan berwarna biru prusian dan diukur pada panjang gelombang 700 nm.

DAFTAR PUSTAKA

Ali, M.S.M. 2008. Analysis of Phenolic and Other Phytochemicals in Selected Malaysian Traditional Vegetables and Their Activities in Vitro, *Doctor of Philosophy in Biomedical and Life Science Thesis*, University of Glasgow. http://theses.gla.ac.uk/158/1/THESIS_MOHD_SHUKRI_MAT_ALI_2008.pdf (17 Oktober 2013).

Andarwulan, N., Batari R., Sandrasari D.A., Bolling B., and Wijaya H. 2010. Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Vegetables from Indonesia. *Food Chemistry* 121: 1231-1235.

AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International (18th ed.)*. USA: AOAC International.

Apak, R. 2007. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assay Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* 12: 1496-1547.

Apak, R., Shela G., Volker B., Karen M.S., Mustafa O., and Kubilay G. 2013. Methodes of Meassurement and Evaluation of Natura Antioxidant Capacity/ Activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 85(5): 957-998.

Aparadh, V.T., Naik V.V., and Karadge B.A. 2012. Antioxidative Properties (TPC, DPPH, FRAP, Metal Chelating Ability, Reducing Power, and TAC) within Some *Cleome* Species. *Annali Di Botanica* 2: 49-56.

Aprianti, D. 2011. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Picung (*Pangium edule* Reinw) dan Pengaruhnya terhadap Stabilitas Fisikokimia, Mikrobiologi, dan Sensori Ikan Kembung (*Rastrelliger neglectus*), *Skripsi S-I*, Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta. http://www.bbp4b.litbang.kkp.go.id/jurnal-pascapanen/doc_download/53-pengaruh-lama-penyimpanan-biji-picung-pangium-edule-reinw-beku-terhadap-aktivitasnya-dalam-mengawetkan-ikan-nila-oreochromis-niloticus (10 Oktober 2013).

Ardiansyah, Lilis N., dan Nuri A. 2003. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) dan Stabilitas Aktivitasnya pada

Berbagai Konsentrasi Garam dan Tingkat pH. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 14(2): 90-97.

Baker, J.T. 2013. http://us.vwr.com

Balasundram, N., Sundram K., and Samman S. 2006. Phenolic Compounds in Plants and Agri-industrial by-products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chemistry* 99: 191-203.

Bhalodia, N.R., Pankaj B.N., Acharya R.N., and Shulka V.J. 2011. Evaluation of In Vitro Antioxidant Activity of Flowers of *Cassia fistula* Linn. *International Journal of Pharmacology Technology Research* 3(1): 589-599.

Brown, G.G. 1950. Unit Operation. dalam Nasir S., Fitriyanti, dan Hilma K. 2009. Ekstraksi Dedak Padi Menjadi Minyak Mentah Dedak Padi (*Crude Bran Oil*) dengan Menggunakan Pelarut *n-Hexane* dan *Ethanol*. *Jurnal Rekayasa Sriwijaya* 1(18): 37-44.

Champangain, B.P., and Wiesman Z. 2005. Larvacidal Activity of the Fruit Mesocarp Extract of *Balanites aegyptiaca* and its Saponin Fraction against *Aedes aegypti*. *Buletin of Degue 29.*

Cholisoh, Z. dan Wahyu U. 2007. Uji Daya Reduksi Ekstrak Etanol 70% Biji Jengkol (*Pithecellobium jiringa*) terhadap Ion Ferri. *Pharmacon* 8(2): 33-39.

Dalimartha, S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Jilid I*. Jakarta: Trubus Agriwidya.

Dey, P.M. and Harborne J.B. (Ed.). 1997. *Plant Biochemistry*. San Diego: Academic Press.

Dorge, W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.

Evans, W.C. 2004. *Trease and Evans Pharmacognosy (15th ed.)*. New York: W.B. Saunders.

Fauzi, F. 2011. Uji Efek Proteksi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Metanol Rimpang Temu Giring (*Curcuma heyneana* Val.) terhadap Peningkatan Kadar

Kolesterol Darah Tikus Jantan Galur Wistars yang Diberi Diet Kolesterol Tinggi, *Skripsi S-I*, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.

Fennema, O.R. 1996. *Food Chemistry 3rd Ed*. USA: Marcell Dekker, Inc.

Hagerman, A.E. 2002. *Tanin Handbook.* USA: Hagerman Publication List.

Halim, F.Y. 2012. Identifikasi Potensi Antioksidan Minuman Coklat dari Kakao Lindak (*Theobroma cacao* L.) dengan Berbagai Cara Preprasi: Metode *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP). *Skripsi S-I.* Program Studi Teknologi Pangan Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya.

Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia*. Padmawinata, K. dan Soediro, I. (Ed.). Bandung: Institut Teknologi Bandung.

Helsmentine, A.M. 2011. *Phenol Chemical Structure*. http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---P/Phenol.-eY6.htm (17 Oktober 2013).

http://foter.com/photo/indian-camphorweed-pluchea-indica-cuc-tan-cay-luc-phat-pha-tay-2/ (17 Oktober 2013).

International Centre for Science and High Technology. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste.

Jayanthi, P. and Lalitha P. 2011. Reducing Power of The Solvent Extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *International Journal of Pharmachy and Pharmaceutical Science* 3(3): 126-128.

Katja, D.G., Suryanto E., dan Wehantouw F. 2009. Potensi Daun Alpukat (*Persea americana* Mill) sebagai Sumber Antioksidan Alami. *Chemistry Progress* 2(1): 58-64.

Khanbabaee, K. and Teunis V.R. 2001. Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports* 18: 641-649.

Kohen, R. and Abraham N. 2002. Oxidation of Biological System: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reaction, and Methods for Their Quantifications. *Toxicologic Phatology* 30(6): 620-650.

Koirewoa, Y.A., Fatimawali, dan Weny I.W. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.). *Pharmacon* 1(1): 47-52.

Koksal, E., Ercan B., Emrah D., Fatih T., and Ilhami G. 2011. Antioxidant Activity of *Melissa officinalis* Leaves. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(2): 217-222.

Krinsky, N.I. 1992. Mechanism of Action Biological Antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 200: 248-254.

Kumar, S., Kumar D., Manjusha, Saroha K., Singh N., and Vashishta B. 2008. Antioxidant and Free Radical Scavenging Potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Methanolic Fruit Extract. *Acta Pharmaceutica* 58:215-220.

Lathifah, Q.A. 2008. Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri pada Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan Variasi Pelarut, *Skripsi S-I*, Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri, Malang. http://lib.uin-malang.ac.id/files/thesis/fullchapter/03530015.pdf (21 Agustus 2013).

Lieu, P.T., Marja H., Per A.P., dan Young Y. 2001. The Roles of Iron in Health and Disease. *Molecular Aspects of Medicine* 22: 1-87.

Ljubuncic, P., Azaizeh H., Portnaya I., Cogan U., Said O., Saleh K.A., and Bomzon A. 2005. Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Eight Plants Used in Traditional Arab Medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology* 99:43-47.

Luger, P., Weber M., Dung N.X., Ngoc P.H., Tuong D.T., and Rang D.D. 2000. The Crystal Structure of hop-17(21)-en-3β-yl acetate of *Pluchea pteropoda* Hemsl. from Vietnam. *Crystal Research and Technology* 35(3):355-362.

Manisha, P., Kanchan S., Jovita K., Koshy M.K., and Shubhini S. 2009. *Sida veronicacaefolia* as a Source of Natural Antioxiant. *International Journal of Pharmaceutical Science and Drugs Research* 1(3): 180-182.

Mediyaningsih, E. 2009. Potensi Ampas Nanas sebagai Sumber Antioksidan: Karakterisasi Antioksidan Ampas Nanas dari Nanas yang telah Mendapat Perlakuan *Blanching*. *Skripsi S-I*. Surabaya: Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Munawaroh, S. dan Handayani P.A. 2010. Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.) dengan Pelarut Etanol dan N-Heksana. *Jurnal Kompetensi Teknik* 2(1): 73-78.

Murphy, M.C. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology Review*s 12: 564-5821.

Nair, K.M. and Vasuprada I. 2009. Iron Content, Bioavaibility & Factors Affecting Iron Status of Indians. *Indian Journal of Medical Research* 130: 634-645.

Papanikolaou, G. and Pantopoilos K. 2005. Iron Metabolism and Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202: 199-211.

Pierre, J.L. and Fontecave M. 1999. Iron and Activated Oxygen Species in Biology: The Basic Chemistry. *Biometals* 12: 195-199.

Perry, R.H. and Green D.W. 1984. *Perry's Chemical Engineering Handbook (6th ed.)*. New York: McGraw Hill Book Company, Inc.

Prasetyo, S., Prima K., dan Felicia Y. 2011. Pengaruh Rasio Biji Teh/ Pelarut Air dan Temperatur pada Ekstraksi Saponin Biji Teh secara *Batch*. *Laporan*. Jurusan Teknik Kimia Universitas Katolik Parahyangan, Bandung. http://journal.unpar.ac.id/index.php/rekayasa/article/download/116/703 (3 Oktober 2013).

Pramita, D.S. 2008. Pengaruh Teknik Pemanasan terhadap Kadar Asam Fitat dan Aktivitas Antioksidan Koro Benguk (*Muncuna pruriens*), Koro Glinding (*Phaseolus iunatus*), dan Koro Pedang (*Canavalia ensiformis*), *Skripsi S-I*, Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret, Surakarta. http://eprints.uns.ac.id/4359/1/76051407200905531.pdf (1 September 2013).

Pratiwi, E. 2009. Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Aktif Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* Roxb.), *Skripsi S-1*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian, Bogor. http://repository.ipb.ac.id./bitstream/123456789/12658/1/G09epr_abstract.pdf (21 Agustus 2013).

Proctor, P.H. and Reynolds E.S. 1984. Free Radicals and Disease in Man. *Physiological Chemistry and Physics and Medical* 16: 175-195.

Raharjo I. dan Horsten S.F.A.J. 2008. Tumbuhan Pantai *Pluchea indica Less*. *Medicinal and Poisonous Plants* 12(2):441-443.

Rumiantin, R.O. 2011. Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Lamun *Enhalus acoroides*. *Skripsi S-I*, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian, Bogor. repository.ipb.ac.id (20 Oktober 2013).

Ruxton, C. 1994. Antioxidant Nutrients- Do They Have Protective Role? *Food and Chemical Toxicology* 33(10): 995-1005.

Sarastani, D., Suwarna T., Soekarto, Tien R., Muchtadi R., Fardiaz D., dan Apriyanto A. 2002. Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Biji Atung. *Teknologi dan Industri Pangan* 13: 149-156.

Scientific Advisory Committee on Nutrition. 2010. *Iron and Health*. London: TSO.

Septiana, A.T. dan Ari A. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *Agrointek* 6(1): 22-28.

Sermakkani, M. and Thangapandian V. 2010. Phytochemical Screening for Active Compounds in *Pedalium murex* L. *Journal Recruiters Research Science Technology* 2: 110-114.

Setiawati, H. 2012. Kadar Antosianin dan Aktivitas Antioksidan *Flake* Beras Merah dan Beras Ketan Hitam dengan Variasi Suhu Perebusan. *Skripsi S-I*. Surabaya: Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Setyaningsih, D., Anton A., dan Maya P.S. 2010. *Analisis Sensori untuk Industri Pangan dan Agro*. Bogor: IPB Press.

Srisook, K., Doungnapa B., Rattiya B., Panadda S., Yaowaluck C., dan Ekaruth S. 2012. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Hot Water Extract from *Pluchea indica* Less. Herbal Tea. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(23): 4077-4081.

Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 2007. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.

Sulistyaningsih. 2009. Potensi Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less.) sebagai Inhibitor terhadap *Pseudomonas aeruginosa Multi Resistant* dan *Methicillin Resistant Stapylococcus aureus*. *Laporan Penelitian Mandiri*. Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Bandung. https://www.google.co.id/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCkQFjAA&url=http%3A%2F%2Fpustaka.unpad.ac.id%2Fwp-content%2Fuploads%2F2010%2F11%2Fpotensi_daun_beluntas.pdf&ei=_Gx2Uoe4FIilrQff6YGABQ&usg=AFQjCNGLzrTqCN0qKuoxlnVey5HA0neCRA&sig2=1IthiLunNJj0CyRkdrkfHw&bvm=bv.55819444,d.bmk&cad=rja (3 Oktober 2013).

Sultana, B., Anwar F., and Przybylski R. 2007. Antioxidant Potential of Conrcob Extracts for Stabilization of Corn Oil Subjected to Microwave Heating. *Journal of Food Chemistry* 104(3): 997-1005.

Supriadi. 2002. Optimalisasi Ekstraksi Komponen Bioaktif Daun Tabat Barito (Ficus deltoidea), *Skripsi S-I*, Jurusan Teknologi Industri Pertanian Institut Pertanian Bogor, Bogor. http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/16233/F02sup_abstract.pdf?sequence= (3 Oktober 2013).

Supriyanto, Haryadi, Budi R., dan Djagal W.M. 2006. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Polifenol Kasar dari Kakao Hasil Penyangraian Menggunakan Enerji Gelombang Mikro. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 17(3): 176-182.

Suryohudoyo, P. 2007. Oksidan dan Radikal Bebas. http://www.google.co.id/url?sa=t&rct=j&q=suryohudoyo+2007+oksidan+dan+rafikal+bebas&source=web&cd=4&ved=0CDoFjAD

&url=http%3A%2F%2Fmhanafi123.files.wordpress.com%2F2012%2F07%2Foksidan-anti-oksidan-da-radikal-bebas.pdf&ei=BB6GUpGEDce14ATg34CwDA&usg=AFQjCNE9X23ymsKA-uJkvcJxZ8pHZ3L9_A&bvm=bv.56643336,d.bGE (17 Oktober 2013).

Taha, S.R. 2009. Kajian Potensi Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) dan Beluntas (*Pluchea indica* L.) sebagai Alternatif Bahan Obat Flu Burung, *Thesis S-2*, Program Studi Kesehatan Masyarakat Veteriner Institut Pertanian Bogor, Bogor. http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/43830/2009srt.pdf?sequence=1**. (11 Juli 2013).**

Tiong, S.H., Chung Y.L., Hazrina H., Aditya A., Mohammagjavad P., Won F.W., Shiau C.C., Mohd R.M., and Khalijah A. 2013. Antidiabetic and Antioxidant Properties of Alkaloids from *Catharantus roseus* (L.) G. Don. *Molecules* 18: 9770-9784.

Trilaksani, W. 2003. Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan [Makalah]. Bogor: Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor. repository.ipb.ac.id (20 Oktober 2013).

Vashchenko, G. and Ross T.A.M. 2013. Multi-Copper Oxidases and Human Iron Metabolism. *Nutrients* 5: 2289-2313.

Walter, M. and Marchesan E. 2011. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Rice. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54(1): 371-377.

Wanasundara, P.K.J.P.D. and Shahidi F. 2005. *Antioxidants: Science, Technology, and Applications*. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Waterhouse, A. L. 2002. *Determination of Total Phenolics*. New York: Wiley & Sons.

Widyawati, P.S., Hanny W., Peni S.H., dan Dondin S. 2010. Pengaruh Ekstraksi dan Fraksinasi terhadap Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) Ekstrak dan Fraksi Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less.). *Seminar Rekayasa Kimia dan Proses ISSN: 1411-4216.* Semarang: Universitas Diponegoro. C(18)1-7.

Widyawati, P.S., Hanny W., Peni S.H., dan Dondin S. 2011. Evaluasi Aktvitas Antioksidatif Ekstrak Daun Belutas (*Pluchea indica*) berdasarkan Perbedan Ruas Daun. *Rekapangan Jurnal Teknologi Pangan*. 5(1):1-14.

Winarsih, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas, Cetakan Ke-1*. Yogyakarta: Kanisius.

Yuhernita dan Juniarti. 2011. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun Surian yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Makara, Sains* 15(1): 48-52.

Youngson, R. 2005. *Antioksidan Manfaat Vitamin C dan E Bagi Kesehatan*. Penerjemah: Susi Purwoko. Jakarta: Arcan.

Zarnia, Z. and Tan S.Y. 2013. Determination of Flavonoids in *Citrusgrandis* (Pomelo) Peels and Their Inhibition Activity on Lipid Peroxidation in Fish Tissue. *International Food Research Journal* 20(1): 313-317.