

## ANALISIS KANDUNGAN FITOKIMIA DAN UJI TOKSISITAS DARI HASIL PARTISI DAUN LIWAS DENGAN METODE BRINE SHRIMP LETHALITY TEST

Zulkifli<sup>1)</sup>, Max R.J. Runtuwene<sup>1)</sup>, Jemmy Abidjulu<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sam Ratulangi Manado, 95115

### ABSTRACT

*A research aimed to determine total phenolic, flavonoid, and tannin content and toxicity of ethyl acetate, n-hexane, and water fractions of liwas leaves had been done. Toxicity test were accomplished using Brine Shrimp Lethality Test on 48 hours old shrimp *A. salina* Leach. The number of dead shrimp was used to determine the percentage of shrimp mortality and the value of  $LC_{50}$  was calculated using Probit Analysis. The results showed that  $LC_{50}$  value of water, ethyl acetate, and n-hexane fractions were 2.219, 3.393, and 207.625 mg/L respectively. The total phenolic and flavonoid content in n-hexane, ethyl acetate, and water were 29.713, 41.142, 78.286 mg/g and 7.129, 19.401, 41.004 mg/g respectively.*

**Keywords:** *Liwas Leaves, Phenolic, Flavonoid, Tannin, BSLT,  $LC_{50}$ .*

### ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk menentukan kandungan total fenolik, flavonoid, tanin dan uji toksisitas menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dari partisi etil asetat, partisi *n*-heksan, dan partisi air daun liwas. Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan udang *A. salina* Leach yang berumur 48 jam. Jumlah udang yang mati dihitung dengan menentukan prosentase kematian *A. salina*, nilai  $LC_{50}$  dihitung dengan metode analisa Probit menggunakan SPSS 15.0. Hasil penelitian menunjukkan nilai  $LC_{50}$  didapatkan pada partisi air, partisi etil asetat, dan *n*-heksan yaitu 2,219; 3,393; 207,625 mg/L. Hasil partisi *n*-heksan, etil asetat, dan air memiliki kandungan total fenolik dan flavonoid dengan nilai berturut-turut 29,713; 41,142; 78,286 mg/g dan 7,129; 19,401; 41,004 mg/g.

**Kata kunci:** Daun Liwas, Fenolik, Flavonoid, Tanin, BSLT,  $LC_{50}$ .

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan di Asia Tenggara yang kaya akan tumbuhan. Tumbuhan sangat dibutuhkan dalam hidup manusia. Oleh karena itu, tumbuhan dapat dijadikan sebagai bahan baku obat tradisional yang banyak digunakan oleh masyarakat untuk berbagai macam tujuan seperti menjaga kesehatan tubuh secara keseluruhan, dan menyembuhkan penyakit tertentu (Liu, 1999).

Tumbuhan umumnya mengandung senyawa bioaktif dalam bentuk metabolit sekunder seperti flavonoid, tannin, alkaloid, triterpenoid, steroid, saponin, dan lain-lain (Lenny, 2006). Flavonoid menunjukkan aktivitas biokimia misalnya antioksidan, anti virus, anti bakteri, dan anti kanker (Fowler *et al.*, 2009). Flavonoid merupakan senyawa polar karena memiliki gugus OH<sup>-</sup> dan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, dan air (Markham, 1988).

Menurut Sumihe (2014) liwas merupakan tumbuhan obat tradisional di daerah kabupaten Minahasa Tenggara provinsi Sulawesi Utara. Daun Liwas digunakan sebagai anti rabies dan infeksi oleh masyarakat Minahasa Tenggara. Sumihe (2014) melaporkan bahwa senyawa fitokimia yang diidentifikasi adalah flavonoid, tanin, saponin. Telah diuji nilai toksisitasnya dari ekstrak metanol, hasilnya menunjukkan nilai *Lethal Concentration* 50 sampel ekstrak metanol 15,69 mg/L ini berarti daun liwas bersifat sangat toksik.

Berdasarkan penelitian sebelumnya dapat menjadi informasi awal untuk melakukan penelitian lebih lanjut, maka dilakukan penelitian tentang kandungan total fenolik, flavonoid, dan tanin terkondensasi serta melihat nilai LC<sub>50</sub>

berdasarkan tingkat kepolaran dengan menggunakan pelarut metanol, *n*-heksan, etil asetat, dan air. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi secara ilmiah mengenai daun liwas kepada masyarakat ilmiah.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, *Aluminium foil*, desikator, alat – alat gelas, oven, blender, ayakan 65 *mesh*, kertas saring, waterbath, *rotary evaporator*, spektrofotometri UV-Vis, Vortex, spatula, lampu pijar 40 watt, wadah bening, blender, termometer, pipet mikro, pipet tetes, lemari asam, kaca pembesar.

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun liwas yang diperoleh dari Desa Liwutung. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut organik teknis (redestilasi) seperti: metanol, *n*-heksana, etil asetat, serta bahan kimia lainnya seperti: telur udang *A. salina*, garam tak beryodium, silica gel 60 F<sub>254</sub>, Folin Ciocalteu, natrium karbonat, aluminium klorida hexahydrate, quercetin, vanilin, asam klorida pekat, katekin, asam galat, aquades, vaselin.

### Preparasi Sampel

Sampel daun liwas dibersihkan kemudian dikering-anginkan selama 1 minggu. Setelah kering sampel diblender hingga berbentuk serbuk lalu diayak dengan ayakan 65 *mesh*.

### Ekstraksi Maserasi

Sebanyak 300 g simplisia diekstraksi dengan cara maserasi selama 3 x 24 jam menggunakan pelarut metanol sebanyak 2 L. Selanjutnya disaring hingga diperoleh filtrat. Filtrat yang diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*. Kemudian dikeringkan

dalam oven pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak pekat.

### **Partisi**

Sebanyak 10 g ekstrak pekat yang dihasilkan dari proses maserasi dilarutkan dalam 100 ml aquades. Larutan selanjutnya dipartisi dengan menambahkan 50 mL n-heksan, dikocok dalam corong pisah dan didiamkan hingga terdapat dua lapisan (aquades pada bagian bawah dan n-heksana dibagian atas). Kedua lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan, diambil lapisan n-heksan. Proses penambahan pelarut n-heksan yang terbentuk dalam air diulangi sampai n-heksan menjadi bening. Lapisan aquades kemudian dipartisi kembali dengan cara yang sama menggunakan pelarut etil asetat. Hasil partisi diupayakan menggunakan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat.

### **Penentuan Kandungan Total Fenolik (Conde *et al.*, 1997)**

Kandungan total fenolik ekstrak daun liwas ditentukan dengan menggunakan metode Folin Ciocalteu. Sebanyak 0,1 mL larutan ekstrak dengan konsentrasi 10.000 mg/L dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,1 mL reagen Folin Ciocalteu 50%. Kemudian divortex, lalu ditambahkan 2 mL larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% dan divortex. Selanjutnya, campuran diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit. Pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer. Kandungan total fenolik dari ekstrak dihitung dengan menggunakan kurva standar asam galat.

### **Penentuan Kandungan Total Flavanoid (Meda *et al.*, 2005)**

Sebanyak 1 mL larutan ekstrak 10.000 mg/mL dimasukkan dalam tabung

reaksi, kemudian ditambah dengan 2 mL AlCl<sub>3</sub> 2% yang telah dilarutkan dalam metanol, kemudian divortex. Absorbansi ekstrak dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 415 nm. Kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai mg ekuivalen kuesertin / g ekstrak.

### **Penentuan Kandungan Total Tanin Terkondensasi (Julkunen-Titto, 1985)**

Sebanyak 0,1 mL larutan sampel dimasukkan dalam tabung reaksi yang dibungkus aluminium foil, lalu ditambahkan 2 mL larutan vanillin 4% dalam metanol dan divortex. Kemudian ditambahkan 1 mL HCl pekat dan divortex lagi. Absorbansi sampel dibaca pada panjang gelombang 500 nm setelah campuran diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar. Kandungan tanin terkondensasi dinyatakan sebagai ekuivalen katekin dalam mg/kg ekstrak. Kurva kalibrasi dipersiapkan pada cara yang sama menggunakan katekin sebagai standar.

### **Uji Larva Udang *A. salina* (Brine Shrimp Lethality Test)**

#### **Penetasan Larva Udang *A. salina***

Telur udang *A. salina* ditetaskan dalam wadah bening dengan menggunakan media air garam. Sebelumnya telur udang *A. salina* ditimbang dan direndam dalam 75 mL air biasa kemudian dibiarkan selama 2 jam. Selanjutnya telur udang *A. salina* dipindahkan ke dalam air garam dengan konsentrasi 20 g/L yang sudah disediakan untuk proses penetasan. Selama proses penetasan diberi penerangan dengan cahaya lampu pijar 40 watt agar suhu penetasan 25°C - 40°C tetap terjaga (Indrayani *et al.*, 2006).

### **Pembuatan larutan stok hasil partisi daun liwas**

Larutan stok hasil partisi daun liwas 2000 mg/L dengan cara, 200 mg ekstrak dilarutkan dengan konsentrasi 20

g/L. Selanjutnya diencerkan menjadi 100, 10, 1, 0.1 mg/L untuk pengujian toksisitas. Untuk kontrol-1 (0 mg/L) tanpa penambahan ekstrak sedangkan kontrol-2 (0 mg/L) dengan penambahan 5 tetes metanol, apabila ekstrak tidak larut di dalam air garam (Sirait, 2001).

### Uji Toksisitas (Mayer *et al.*, 1982)

Pengujian dilakukan dengan memasukan 10 ekor udang *A. salina* yang berumur 48 jam di dalam gelas yang berisi 100 mL larutan ekstrak. Setiap konsentrasi dilakukan 2 kali pengulangan dan dibandingkan dengan kontrol. Pengamatan dilakukan selama 24 jam. Perhitungan kematian udang *A. salina* dihitung sesuai dengan rumus berikut:

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Apabila pada kontrol ada udang yang mati, prosentase kematian udang *A. salina* ditentukan dengan rumus Abbot's, sebagai berikut:

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\% \text{Kematian pada uji} - \% \text{Kematian pada kontrol}}{100 - \% \text{Kematian pada kontrol}} \times 100\%$$

### Analisis Data

Analisis data untuk menentukan nilai LC<sub>50</sub> menggunakan SPSS 15.0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji Kadar Air

Pengujian kadar air dilakukan bertujuan untuk menentukan kadar air dari simplisia (serbuk kering). Setelah dilakukan 3 kali perlakuan, kadar air dari simplisia adalah kurang dari 10%. Hasil pada pengujian bahwa daun liwas memiliki kandungan kadar air yang baik yaitu dibawah 10%, sehingga akan tahan dalam

penyimpanan (Winarno, 1997). Kadar air rata-rata daun liwas adalah 7,04%.

### Ekstraksi Maserasi

Sebanyak 300 g simplisia (serbuk kering) daun Liwas diekstraksi dengan cara maserasi selama 3 x 24 jam menggunakan pelarut metanol sebanyak 2 L. Digunakan metode maserasi ini karena memiliki keuntungan yaitu prosedur dan peralatannya sederhana (Agoes, 2007), serta dapat menghindarkan perubahan kimia terhadap senyawa-senyawa tertentu oleh karena pemanasan, namun proses ini membutuhkan waktu yang relatif lama. Maserasi yang dilakukan pengadukan secara terus-menerus disebut maserasi kinetik sedangkan yang dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan terhadap maserat pertama dan seterusnya disebut remaserasi (Afriani *et al.*, 2013).

Proses ekstraksi dengan metode maserasi dikombinasikan dengan alat *vaccum rotary evaporator* yang bertujuan untuk mendapat hasil pemisahan yang maksimal. *Vaccum rotary evaporator* merupakan alat yang dirancang untuk memindahkan pelarut yang mudah menguap dalam jumlah yang besar dari larutan pada penurunan tekanan, meninggalkan komponen yang tidak mudah menguap. Perbedaan utama pekerjaan ini dengan kerja distilasi adalah dilakukannya pemutaran labu distilasi selama penguapan pelarut. Pemutaran memiliki fungsi penting yakni dapat menghindari resiko *bumping* dan meningkatkan kecepatan pemindahan pelarut.

Hasil evaporasi di pindahkan pada wadah dan dimasukan kedalam oven dengan suhu maksimal 40<sup>0</sup>C agar tidak merusak senyawa yang terkandung dalam ekstrak, hingga diperoleh ekstrak kental.

Berdasarkan hasil ekstraksi 300 gram daun liwas maka diketahui jumlah rendemen yaitu 15,62 %

### **Partisi**

Dalam ekstrak metanol masih terdapat berbagai kelompok senyawa

metabolit sekunder sehingga perlu dilakukan pemisahan senyawa melalui proses partisi. Dalam proses partisi ekstrak metanol daun liwas dilakukan dengan menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan air. Hasil partisi yang diperoleh dapat dilihat dalam Tabel 2.

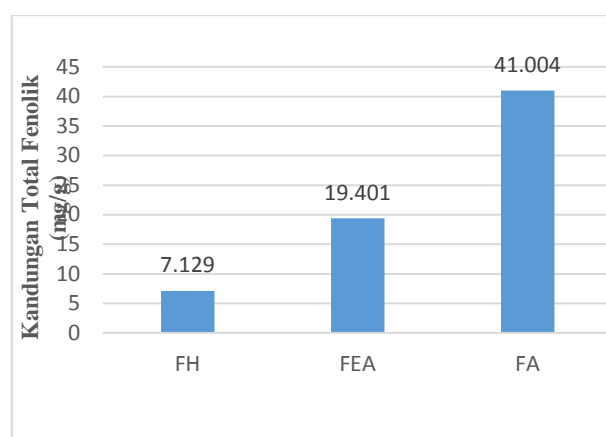
**Tabel 2.** Rendemen partisi daun liwas

Partisi	Rendemen (%)	Warna
<i>n</i> -heksan	26.732	Hijau Kehitaman
etil asetat	11.223	Merah Kekuningan
Air	52.045	Hijau Kehitaman

Berdasarkan data tersebut hasil partisi air rendemen tertinggi kemudian diikuti partisi etil asetat dan partisi *n*-heksan. Tingginya rendemen partisi air disebabkan banyaknya jumlah senyawa polar yang terkandung dalam daun liwas tersebut. Firdausi *et al.*, (2015) menyatakan bahwa penggunaan pelarut yang berbeda tingkat kepolaran mempengaruhi jenis senyawa yang terekstrak.

### Penentuan Kandungan Total Fenolik

Penentuan kandungan total fenolik dilakukan untuk mengetahui total kandungan senyawa fenolik yang terdapat dalam hasil partisi *n*-heksan, etil asetat dan air. Penentuan kandungan fenolik dinyatakan sebagai mg ekivalen asam galat/g ekstrak. Hasil total kandungan fenolik hasil partisi *n*-heksan, etil asetat dan air ditunjukkan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Kandungan total fenolik (FH= Partisi *n*-Heksan; FEA= Partisi Etil Asetat; dan FA= Partisi Air)

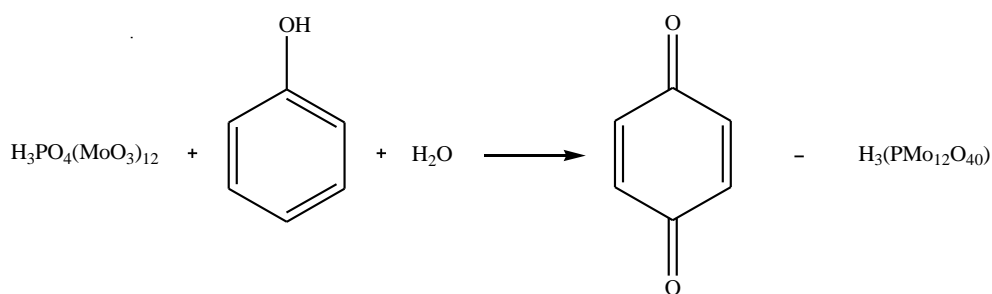
Berdasarkan Gambar 2. dapat diketahui bahwa partisi air daun liwas ini memiliki kandungan fenolik yang paling tinggi yaitu 78,286 mg/g, diikuti partisi etil asetat yaitu 41,142 mg/g dan partisi *n*-heksan yaitu 29,713 mg/g. Kandungan total fenol yang tinggi pada partisi air menunjukkan bahwa senyawa fenol merupakan senyawa yang bersifat polar yang cenderung larut dalam pelarut polar (Harbone, 1987).

Penggunaan asam galat sebagai standar dikarenakan senyawa ini sangat

efektif untuk membentuk senyawa kompleks dengan reagen Folin-Ciocalteu (Julkunen-Tiito,1985). Uji kandungan total fenolik dengan metode Folin-Ciocalteu bertujuan untuk mengetahui jumlah fenol yang terkandung dalam partisi air, partisi etil asetat dan partisi *n*-heksan. Metode ini didasarkan pada kemampuan ekstrak untuk mereduksi reagen Folin-Ciocalteu yang mengandung senyawa fosfomolibdat dan asam fosfotungstat. Adapun kandungan total fenolik ditunjukkan pada Gambar 2.

Rendahnya kandungan total fenolik pada partisi *n*-heksan dikarenakan pelarut ini bersifat non polar dan juga dapat dilihat dari intensitas warna yang terbentuk (Lampiran. 18), dimana partisi *n*-heksan terjadi perubahan warna menjadi biru namun tidak sepekat perubahan warna pada partisi air. Intensitas warna biru digunakan sebagai indikator keberadaan senyawa fenolik dalam sampel, dimana semakin pekat intensitas warna menunjukkan kandungan total fenol semakin besar. Metode Folin-Ciocalteu ditunjukkan dengan berubahnya warna

larutan dari kuning menjadi biru, hal ini dikarenakan pada reagen Folin-Ciocalteu yang mengandung senyawa asam fosfomolibdat-fosfotungstat yang direduksi oleh sampel sehingga membentuk senyawa kompleks molybdenum tungstate berwarna biru. Warna biru yang terbentuk akan semakin pekat setara dengan konsentrasi ion fenolat yang terbentuk. Semakin besar intensitas warna yang ditunjukkan maka akan semakin besar pula kandungan fenolik yang terkandung (Julkenen-Titto, 1985).

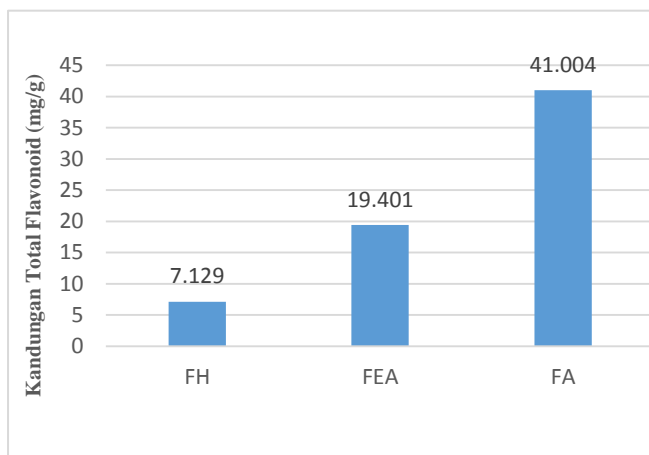


**Gambar 3.** Reaksi senyawa fenol dengan reagen Folin-Ciocalteu (Hardiana *et al.*, 2012)

Menurut Nely (2007) penambahan  $Na_2CO_3$  pada uji fenolik bertujuan untuk membentuk suasana basa karena cenderung reagen Folin-Ciocalteu lebih mudah bereaksi dengan sampel dalam keadaan basa oleh gugus hidroksil dari fenolik di dalam sampel.

#### Penentuan Kandungan Total Flavonoid

Penentuan kandungan flavonoid dinyatakan sebagai mg ekvalen kuersetin/g ekstrak. Hasil total kandungan flavonoid hasil partisi *n*-heksan, etil asetat dan air ditunjukkan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Kandungan total flavonoid (FH= Partisi *n*-Heksan; FEA= Partisi Etil Asetat; dan FA= Partisi Air)

Dari Gambar 4. kandungan flavonoid daun liwas yang tertinggi diperoleh pada partisi air yaitu 41,004 mg/g dimana pengujian flavonoid pada partisi air ini memiliki warna yang lebih kuning dibandingkan dengan partisi etil asetat dan n-heksan. Sehingga kandungan total flavonoid pada daun liwas ini banyak terdapat pada partisi air.

Analisis senyawa flavonoid diukur berdasarkan membentuk kompleks dengan logam  $Al^{3+}$  pada gugus hidroksi (cincin A) dan keton (cincin C) yang bertangga dan orto-hidroksi (cincin B) yang dapat menghasilkan warna kuning, sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin kuat

intensitas warna kuning maka kandungan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak akan semakin tinggi (Meda *et al*, 2005).

### Penentuan Kandungan Total Tanin Terkondensasi

Hasil analisis kandungan total tannin terkondensasi terhadap air, partisi etil asetat dan partisi n-heksan ini dikatakan tidak aktif dikarenakan tidak terjadi perubahan warna.

### Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test)

Hasil toksisitas partisi air, partisi etil asetat, dan partisi n-heksan terhadap udang *A. salina* dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Nilai  $LC_{50}$  dari hasil partisi daun liwas

Sampel	Nilai $LC_{50}$ (mg/L)
n-heksan	207,625
Etil asetat	3,393
Air	2,219

Data hasil toksisitas pada Tabel 3 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi suatu ekstrak kematian hewan uji akan semakin besar. Nilai  $LC_{50}$  diperoleh menggunakan SPSS 15.0 dengan cara analisis probit. Tingkat kematian larva *A. salina* dipengaruhi dari banyaknya kandungan flavonoid pada ekstrak uji. Hal ini dapat dilihat pada hasil uji total flavonoid partisi air,  $LC_{50}$  pada partisi air yaitu 2,219 mg/L,  $LC_{50}$  pada partisi etil asetat yaitu 3,393 mg/L, dan  $LC_{50}$  pada partisi n-heksan yaitu 207,625 mg/L. Semakin kecil nilai  $LC_{50}$  dari suatu sampel maka semakin tinggi senyawa bioaktifnya. Tingginya aktivitas bioaktif dari partisi air daun liwas terhadap udang *A. salina* disebabkan adanya kandungan senyawa saponin dan fenolik yang cukup tinggi (Harbone, 1996). Adanya flavonoid dalam lingkungan sel dapat menyebabkan

pecahnya membran sel. Hal ini disebabkan gugus  $OH^-$  pada flavonoid berikatan dengan protein integral membran sel sehingga terbedungnya transport aktif  $Na^+$  dan  $K^+$ . Transpor aktif yang berhenti menyebabkan pemasukan ion  $Na^+$  yang tidak terkendali ke dalam sel, yang menyebabkan pecahnya membran sel. Pecahnya membran sel inilah yang menyebabkan kematian sel (Scheuer, 1994). Hal ini dibuktikan juga pada uji toksisitas partisi n-heksan yang memiliki kandungan flavonoid yang rendah juga memiliki tingkat toksisitas yang rendah.

### KESIMPULAN

Kandungan total fenolik dan total flavonoid paling tinggi terdapat pada ekstrak partisi air diikuti partisi etil asetat dan n-heksan. Daun liwas tidak memiliki kandungan tanin terkondensasi.  $LC_{50}$  pada partisi air paling tinggi diikuti partisi partisi etil asetat, dan n-heksan.



**DAFTAR PUSTAKA**

- Afriani, S., Idiawati, N., Destiarti, L., dan Arianie, L. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Daging Buah Asam Paya (*Eleiodoxa conferta* Burret) dengan Metode DPPH dan Tiosianat. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. **3** : 49-56
- Ansel, H.C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Conde, E.F., Cadahia, M.C., Garcia-Vallejo, B.F.D., Simon and Adrabos, J.R.G. 1997. Low Molecular Weight Polyphenol in Cork of Quercus Suber. *J. Agric. Food. Chem.* **45**: 2695-2700.
- Damanik, D.P.D., Surbakti, P., dan Hasibuan, R. 2014. Ekstraksi Katekin dari Daun Gambir (*Uncaria gambir roxb*) dengan Metode Maserasi. *Jurnal Teknik Kimia*. **2(3)**.
- Firdausi, I., Retnowati, R., dan Sutrisno. 2015. Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Mangga Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) dengan Pelarut n-Butanol. *Kimia Student Journal*. **1(1)** : 785-790
- Fowler, L.Z., Mattheos, A., dan Koffas. 2009. Biosynthesis and Biotechnological Production of Flavanones: current state and perspectives. *J. App. Microbial. Biotechnol.* **83**:799-808
- Gali-Muhtasib, H.U., Yamout, S.Z. and Sidani, M.M. 1999. Plants Tannin as Inhibitors of Hydroperoxide Production and Tumor Promotion Induced by Ultraviolet B Radiation in Mouse Skin in vivo. *Oncol Rep.* **6**: 547-553.
- Harbone, J. B. 1987. *Uji Fitokimia*. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Harbone, J.B. 1996. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Moderen Menganalisa Tumbuhan*. Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. ITB, Bandung
- Hardiana, R., Rudiyanasyah., dan Zaharah, T. A. 2012. Aktivitas Antioksidan Senyawa Golongan Fenol dari Beberapa Jenis Tumbuhan Famili Malvaceae. *JKK*. **1(1)** : 8-13
- Harjadi, W. 1993. *Ilmu Kimia Analitik Dasar*. Erlangga, Jakarta
- Indrayani, L., Soetjipto, H., Sihasale, L. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamacensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach. *Fakultas Sains dan Matematika Universitas Kristen satya Wacana, Salatiga. Journal*. **12** : 57-61.
- Julkunen-Titto, R. 1985. Phenolic Constituents in Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **33(2)** : 213-217
- Katzung. B.G. 1987. *Basic and Clinical Pharmacology*. 3<sup>rd</sup> Edition. Penerbit Buku Kedokteran. EGC, Jakarta.
- Klaassen, C. D., Aqmdur, M. O., Doull, J, 1986. *Toxicology, The Basic Science of Poisons*. Mc Millan Publishing Compene, New York.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida dan Alkaloida*. Departemen Kimia Kimia FMIPA USU, Medan.
- Liu, K. 1999. *Soybeans : Chemistry, Technology, and Utilization*. New York : Chapman and Hall

- Loomis. T.A. 1978. *Essential of Toxicology*. Edisi ke-4. IKIP, Semarang.
- Lu, F.C. 1995. *Toksikologi Dasar: Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Resiko*. Edisi ke-2. Terjemahan Koensoenmardiyah. IKIP Semarang Press, Semarang.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavanoid*. Divisi kelima Departemen Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Industri, Petone Selandia Baru. Penerbit ITB, Bandung.
- Mayer, B.N., N.R. Ferrigni., J.E. Putnam.,L.B. Jacobsen., D. E. Nichols., and J.L. Mc Laughlin. 1982. Brine shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *J. Planta Medica*. **45(5)**: 31-45.
- Meda, A., C. E. Lamein, M. Romito, J. Milliogo, dan O. G. Nacoulina. 2005. Determination of the Total Phenolic, Flavonoid and Proline Content in Burkina Fasan Honey, as well as Their Radical Scavenging Activity. *Journal of Food Chemistry*. **91**: 571-577.
- Nely F. 2007. *Aktivitas Antioksidan Rempah Pasar dan Bubuk Rempah Pabrik dengan Metode Polifenol dan Uji AOM (Active Oxygen Method)* [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian IPB. Bogor.
- Scheuer, J.S. 1994. *Produk Alami Lautan*. IKIP Semarang Press, Semarang.
- Shahidi, F. and M. Naczk. 1995. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Application*. Technomic Publishsing Co. Inc., Lancaster-Basel.
- Sirait, M. 2001. *Pengembangan Obat Bahan Alam*. Edisi ke-4. Perhimpunan Peneliti Bahan Obat, Jakarta.
- Soemirat, J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Sumihe, G., Runtuwene, M. R. J., dan Rorong, J. A. 2014. Analisis Fitokimia dan Penentuan Nilai LC<sub>50</sub> Ekstrak Metanol Daun Liwas. *Jurnal Ilmiah Sains*. **14(2)** : 125-128
- Suryanto, E. 2012. *Fitokimia Antioksidan*. Surabaya : CV. Putra Media Nusantara (PMN).
- Voigt, R, 1994, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi edisi 5*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, hal 170.
- Winarno, F.G. 2007. *Kimia Pangan dan Gizi*. M-Biro Press, Bogor.
- Winarno, M. W. 1997. *Efek Daun Katu (Saurophus androgenus Merr.) terhadap Diare Tikus Putih*. *J. Cermin Dunia Farmasi*. **33**:31-35.
- Wungkana, I. 2013. *Aktivitas Antioksidan dan Tabir Surya Fraksi Fenolik Limbah Tongkol Jagung (Zea mays L) pada Fotooksidasi Kulit Kelinci* [Skripsi]. FMIPA UNSRAT, Manado.
- Yussuf, A.Z., A. Zakir., Z. Shenan., M. Abdullahi., & S.A. Halima. 2014. Phytochemical Analysis of The Mehanol Leaves Extract of *Paullinia Pinnata Linn.* *Journal of Pharmacognosy and Phtotherapy*. **6(2)**: 10-16.