

KARAKTERISTIK KIMIA EKSTRAK ETANOL DAUN TENGGULUN (*Protium javanicum*) BERDASARKAN TINGKAT KETUAAN DAUN

Chemical Characteristics of Ethanolic Extract of Tenggulun Leaf (Protium Javanicum) Based on Leaf Maturity Level

Ni Luh Ari Yusasrini*, Luh Putu Trisna Darmayanti

Program Studi Teknologi Pangan – Fakultas Teknologi Pertanian – Universitas Udayana
Jl. Kampus Unud, Bukit Jimbaran - Badung 80361
*Penulis Korespondensi, email: ariyusasrini@unud.ac.id

Disubmit : 10 September 2023

Direvisi : 20 Februari 2024

Diterima : 24 April 2024

ABSTRAK

Ekstrak etanol daun tenggulun mengandung sejumlah senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antioksidan. Tingkat ketuaan daun adalah salah satu komponen yang mempengaruhi jumlah dan komposisi senyawa fitokimia dalam ekstrak daun tenggulun. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan tingkat ketuaan daun yang ideal sehingga ekstrak yang dihasilkan memiliki karakteristik kimia terbaik. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan tingkat ketuaan daun tenggulun yaitu P1 (daun pucuk), P2 (daun muda), P3 (daun dewasa), dan P4 (daun tua). Perlakuan diulang sebanyak 4 kali sehingga diperoleh 16 unit percobaan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat ketuaan daun berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap rendemen, kadar total fenol, total flavonoid, total tanin dan nilai IC_{50} ekstrak etanol daun tenggulun. Perlakuan terbaik diperoleh dari ekstrak etanol daun tenggulun dewasa dengan nilai rendemen 18,812%, total fenol 22,612 mg GAE/g, total flavonoid 4,330 mg QE/g, total tanin 23,392 mg TAE/g dan IC_{50} 21,265 ppm. Terdapat hubungan korelasi negatif yang cukup antara total fenol dengan aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi (R) sebesar -0,70.

Kata kunci : Ekstrak; Fenol; Flavonoid; Tanin; Tenggulun

ABSTRACT

The ethanolic extract of tenggulun leaves contains several bioactive compounds that have the potential as antioxidants. One factor that affects the amount and composition of phytochemical compounds in tenggulun leaf extracts is the maturity level of the leaves. This research aims to get the right leaf maturity level to produce extracts with the best chemical characteristics. This study used a completely randomized design (CRD) with four treatments of the maturity level of tenggulun leaves, namely P1 (top leaves), P2 (young leaves), P3 (mature leaves), and P4 (old leaves). The treatments were repeated four times to obtain 16 experimental units. The results showed that the level of leaf maturity had a significant effect ($P < 0.05$) on yield, total phenol content, total flavonoids, total tannins, and IC_{50} value of ethanol extract of tenggulun leaves. The best treatment was obtained from mature tenggulun leaf extract with a yield value of 18.812%, total phenolic content of 22.612mg GAE/g, total flavonoid content of 4.330mgQE/g, total tannin content of 23.39 2mgTAE/g and IC_{50} of 21.265 ppm. There was a moderate negative correlation between total phenol and antioxidant activity, as shown by the correlation coefficient (R) of -0.70.

Keywords: Extract; Flavonoids; Phenols; Tannins; Tenggulun

PENDAHULUAN

Tanaman tenggulun (*Protium javanicum*) merupakan tanaman asli nusantara dari genus *Protium* yang memiliki morfologi batang berduri dan bentuk daun yang meruncing pada bagian ujung dengan ukuran tidak terlalu lebar. Masyarakat Bali memanfaatkan daun tenggulun sebagai sayuran atau pelengkap bumbu masakan. Bagian daun yang digunakan hanya bagian pucuk dan daun muda karena memberikan aroma dan cita rasa yang khas.

Uji fitokimia dari penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak daun tenggulun mengandung kuersetin dan skopoletin (Adfa *et al.*, 2013), serta senyawa golongan fenolik, steroid, terpenoid, flavonoid dan tanin (Suirta *et al.*, 2016). Senyawa fenolik diklasifikasikan menjadi beberapa golongan berdasarkan struktur kimianya, yaitu asam fenolat, flavonoid, tanin, stilben, dan lignan (Zhang *et al.*, 2022). Sejumlah studi menunjukkan bahwa senyawa fenolik memiliki efek fisiologis yang menguntungkan bagi kesehatan, diantaranya berfungsi sebagai antikarsinogenik, antitrombotik, antiarterogenik, antialergenik, antioksidan, antiinflamasi, dan antidiabetik (Zhang *et al.*, 2022 ; Durazzo *et al.*, 2019).

Jumlah dan komposisi senyawa kimia pada daun suatu tanaman dipengaruhi oleh sejumlah variabel. Salah satunya adalah tingkat ketuaan daun. Penuaan daun (*leaf senescence*) adalah tahap terakhir perkembangan daun, yang merupakan jenis penuaan postmitosis dan dicirikan oleh transisi fungsional dari asimilasi nutrisi ke remobilisasi nutrisi yang penting untuk kesegaran tanaman (Guo *et al.*, 2021). Senyawa makromolekul seperti protein, lipid, dan asam nukleat akan dipecah menjadi molekul yang lebih sederhana selama proses penuaan daun. Nutrien yang dibebaskan dari proses katabolisme tersebut akan didistribusikan ke bagian tanaman yang membutuhkan, seperti bagian tunas baru, daun muda, buah dan biji yang sedang tumbuh (Ali *et al.*, 2018).

Perubahan fase kehidupan pada daun akan berpengaruh pada kandungan komponen bioaktifnya sehingga akan

berpengaruh juga terhadap aktivitas antioksidannya. Jolkili *et al.*, (2018) melaporkan bahwa kandungan senyawa fenolik dari ekstrak *Cassia alata* mengalami peningkatan seiring dengan bertambahnya ketuaan daun. Hal serupa juga dilaporkan pada ekstrak daun kopi (Chen *et al.*, 2018), ekstrak (*loloh*) daun sembung (Kusumawati *et al.*, 2019) dan ekstrak *Clausena lansium* (Chang *et al.*, 2018). Peneliti lain menerangkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara aktivitas antioksidan daun *Wikstroemia tenuiramis* tua dan muda (Batubara *et al.*, 2020), sementara hasil penelitian Thi dan Hwang (2014) mengindikasikan bahwa daun aronia muda mengandung senyawa polifenol yang lebih banyak dibandingkan dengan daun tua.

Senyawa fenolik yang terdapat dalam daun tenggulun dapat diisolasi menggunakan metode ekstraksi yang sesuai sehingga memperoleh ekstrak dengan karakteristik yang diharapkan. Salah satu metode ekstraksi yang umum digunakan adalah maserasi, yaitu perendaman bahan dengan pelarut yang sesuai, tanpa adanya proses pemanasan atau melibatkan pemanasan suhu rendah. Etanol merupakan salah satu pelarut yang sangat efektif untuk mengekstrak senyawa bioaktif pada daun tenggulun (Yolanda *et al.*, 2021). Etanol bersifat polar, universal, mudah didapat dan toksisitasnya lebih rendah dibandingkan dengan metanol.

Sampai saat ini, signifikansi perbedaan kandungan senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan ekstrak daun tenggulun berdasarkan klasifikasi umur daun belum dikaji sepenuhnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan tingkat ketuaan daun yang ideal agar ekstrak yang dihasilkan memiliki karakteristik kimia terbaik.

METODE

Alat dan Bahan

Dalam penelitian ini, sampel utama yang digunakan adalah daun tenggulun dengan tingkat ketuaan yang berbeda, yaitu daun pucuk (berwarna merah muda), daun muda (berwarna hijau muda), daun dewasa (berwarna hijau) dan daun tua (berwarna

hijau gelap). Keseluruhan sampel dikumpulkan dari wilayah Bukit Jimbaran, Kabupaten Badung. Sejumlah reagen kimia yang diperlukan yaitu: aquades, metanol *pro analysis* (p.a), etanol teknis 96%, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) p.a. (Himedia), standar asam galat p.a. (Sigma-Aldrich), Folin-ciocalteu p.a. (Merck), standar asam tanat p.a. (Sigma-Aldrich), standar kuersetin p.a. (Sigma-Aldrich), AlCl_3 p.a. (Merck), Na_2CO_3 p.a. (Merck), dan reagen Folin Denis p.a. (Merck).

Peralatan analisis yang diperlukan dalam penelitian ini adalah *rotary vacuum evaporator* (IKA RV 10 Basic), spektrofotometer UV-Vis Genesis 10 UV, timbangan analitik (Shimadzu ATY224), oven, blender (Cosmos), sentrifuse (800D), vortex (Maxi Mix II Type 367000, kertas saring Whatman No. 1, aluminium foil (Klin Pack), ayakan 60 mesh, alat-alat dari gelas (Iwaki), pipet volume (Iwaki), dan pipet mikro (Dragon Lab).

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menerapkan Rancangan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 taraf perlakuan dan 4 kali ulangan sehingga mendapatkan 16 unit percobaan. Empat tingkat ketuaan daun yang dipilih sebagai variabel bebas terdiri dari P1 (daun pucuk), P2 (daun muda), P3 (daun dewasa) dan P4 (daun tua). Data dianalisis secara statistik

dengan ANOVA menggunakan bantuan *software* IBM SPSS Statistik Versi 25. Jika terdapat pengaruh antara perlakuan dengan variabel yang diamati, maka analisis dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) (Harsojuwono *et al.*, 2021).

Ekstraksi Daun Tenggulun

Daun tenggulun dipetik pada pagi hari dan disortasi sesuai dengan tingkat ketuaan daunnya, yaitu daun pucuk (berwarna merah muda), daun muda (berwarna hijau muda), daun dewasa (berwarna hijau) dan daun tua (berwarna hijau gelap) seperti disajikan pada Gambar 1. Daun pucuk diambil dari bagian pucuk dan berwarna merah kecoklatan. Daun muda diambil pada bagian setelah daun pucuk, berwarna hijau muda, daun dan tulang daun masih lemas. Daun dewasa diambil dari bagian tengah dari cabang, berwarna hijau, ukuran daun lebih lebar. Daun tua diambil dari bagian bawah cabang, berwarna hijau tua, tekstur kaku, kasar dan menunjukkan tanda-tanda penuaan. Keseluruhan sampel daun tenggulun dibersihkan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 5 jam. Daun tenggulun kering dihaluskan dengan blender dan diayak menggunakan ayakan 60 mesh (Mei *et al.*, 2021).



Gambar 1. Daun Tenggulun Pucuk, Daun Muda, Daun Dewasa dan Daun Tua

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Perbandingan bahan dengan pelarut adalah 1:10 (b/v). Bubuk daun tenggulun ditimbang sebanyak 10 g dan direndam dengan 100 mL etanol 96%, kemudian

dimaserasi dalam rentang waktu 30 jam pada suhu ruang dengan intensitas pengadukan setiap 5 jam. Ekstrak disaring dengan kertas saring Whatman no 1. Pelarut diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* selama 30 menit pada temperatur 40°C , 200

mBar, dengan kecepatan 60 rpm, hingga diperoleh ekstrak pekat (Yolanda *et al.*, 2021).

Prosedur Analisis

Analisis dilakukan terhadap bahan baku dan ekstrak etanol daun tenggulun. Analisis bahan baku meliputi kadar air dengan metode pengeringan (AOAC 2005), sedangkan analisis ekstrak etanol daun tenggulun meliputi rendemen ekstrak (AOAC, 2005), total fenolik dengan metode Folin-Ciocalteu (Baba dan Malik, 2015), total flavonoid dengan metode spektrofotometri (Baba dan Malik, 2015), total tanin dengan metode spektrofotometri (Nair *et al.*, 2015), dan aktivitas antioksidan berdasarkan IC₅₀ dengan metode DPPH (Molyneux, 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Air Bahan Baku

Kadar air merupakan persentase banyaknya air yang terdapat di dalam bahan. Hasil analisis kadar air bubuk daun tenggulun pada berbagai tingkat ketuaan daun tertera pada Tabel 1. Hasil analisis ragam menunjukkan pengaruh yang nyata dari tingkat ketuaan daun terhadap kadar air bubuk daun tenggulun ($P < 0,05$). Bubuk dari daun pucuk (P1) memiliki kadar air tertinggi sebesar 9,58%, sementara bubuk dari daun tua (P4) memiliki kadar air terendah yaitu sebesar 7,40%.

Tabel 1. Kadar air bubuk daun tenggulun pada berbagai tingkat ketuaan daun

Perlakuan	Kadar air (%)
P1 (daun pucuk)	9,58 ± 0,05 a
P2 (daun muda)	8,91 ± 0,04 b
P3 (daun dewasa)	7,86 ± 0,05 c
P4 (daun tua)	7,40 ± 0,03 d

Keterangan: Nilai rata-rata ± standar deviasi (n=4). Huruf yang berbeda dibelakang nilai rata-rata pada kolom yang sama, menunjukkan perlakuan yang berbeda nyata ($P < 0,05$).

Data dari Tabel 1 menunjukkan bahwa kadar air daun tenggulun menurun seiring dengan bertambahnya ketuaan daun. Lakitan (1993) melaporkan bahwa daun yang muda mengandung lebih banyak sel-sel tanaman yang bersifat aktif

dibandingkan dengan daun yang tua. Bagian sel tanaman yang sudah rusak/tidak aktif lebih banyak ditemukan pada daun tua sehingga mengganggu transportasi air dari akar ke daun. Hasil penelitian serupa pernah dilaporkan oleh Rohiqi *et al.*, (2021) bahwa kadar air bubuk teh herbal *matcha* daun tenggulun muda lebih tinggi dibandingkan daun tenggulun tua.

Karakteristik Kimia Ekstrak Etanol Daun Tenggulun

Selama pertumbuhan daun, terjadi perubahan metabolisme oksidatif pada jaringan tanaman. Akumulasi dan degradasi senyawa akan terjadi sepanjang fase perkembangan daun (Thi dan Hwang, 2014). Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan dari tingkat ketuaan daun terhadap kandungan senyawa bioaktif ekstrak etanol daun tenggulun.

Rendemen Ekstrak

Rendemen ekstrak adalah rasio antara berat ekstrak yang diperoleh dengan berat bahan baku yang digunakan yang dinyatakan dengan persen. Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perbedaan tingkat ketuaan daun mempengaruhi rendemen ekstrak daun tenggulun secara signifikan.

Rendemen ekstrak terendah diperoleh dari ekstrak daun tenggulun pucuk (P1) sebesar 12,61%, sedangkan rendemen ekstrak tertinggi diperoleh dari ekstrak daun tenggulun tua sebesar (P4) 19,87%. Rendemen ekstrak yang diperoleh semakin meningkat seiring dengan perkembangan ketuaan daun. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kandungan biomolekul yang tinggi pada daun seperti makromolekul, polifenol, vitamin, dan mikromolekul lainnya (Lee dan Hwang, 2017). Seiring bertambahnya usia daun, kloroplas mengalami degenerasi dan terjadi katabolisme makromolekul, seperti asam nukleat, protein dan lipid (Guo *et al.*, 2021). Senyawa-senyawa tersebut kemungkinan ikut dibebaskan ke dalam ekstrak dan terhitung sebagai rendemen ekstrak.

Hasil dari penelitian ini mendukung temuan yang dilaporkan oleh Chen *et al.* (2022) bahwa ekstrak daun murbei muda

memiliki rendemen yang lebih rendah dibandingkan ekstrak daun murbei tua. Data yang serupa dengan penelitian ini pernah dilaporkan oleh Batubara *et al.* (2020)

bahwa rendemen ekstrak etanol daun *Wikstroemia tenuiramis* tua lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak daun muda.

Tabel 2. Nilai rata-rata rendemen, total fenol, total flavonoid, total tanin dan IC₅₀ ekstrak etanol daun tenggulun berdasarkan tingkat ketuaan daun.

Komposisi Kimia	Perlakuan			
	P1	P2	P3	P4
Rendemen (%)	12,61 ± 0,05a	17,79 ± 0,07b	18,81 ± 0,06c	19,87 ± 0,08d
Total fenol (mg GAE/g)	1,82 ± 0,009a	17,38 ± 0,07c	22,612 ± 0,01d	3,44 ± 0,008b
Total flavonoid (mg QE/g)	1,24 ± 0,009a	2,04 ± 0,001c	4,33 ± 0,02d	1,978 ± 0,005b
Total tanin (mg TAE/g)	2,12 ± 0,007a	19,28 ± 0,01c	23,39 ± 0,05d	3,79 ± 0,01b
IC 50 (ppm)	2.796,83 ± 34,62c	25,13 ± 0,01a	21,26 ± 0,10a	364,18 ± 1,05b

Keterangan: Nilai rata-rata ± standar deviasi (n= 4). Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perlakuan yang berbeda nyata (P < 0,05). P1 (daun pucuk), P2 (daun muda), P3 (daun dewasa), P4 (daun tua).

Total Fenol

Hasil sidik ragam mengindikasikan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan dari tingkat ketuaan daun tenggulun terhadap total fenol ekstrak etanol daun tenggulun. Total fenol terendah diperoleh dari ekstrak daun pucuk (P1) sebesar 1,822 mg GAE/g, sementara sampel P3 (daun tenggulun dewasa) mengandung total fenol tertinggi sebesar 22,612 mg GAE/g. Berdasarkan data pada Tabel 2 terlihat bahwa seiring meningkatnya fase kematangan daun, hingga daun menjadi dewasa maka terjadi peningkatan kandungan senyawa fenolik. Hal ini tercermin dari kandungan total senyawa fenolik yang terekstrak dalam pelarut etanol. Namun, ketika daun memasuki fase penuaan terjadi penurunan kandungan senyawa fenolik pada ekstrak.

Senyawa fitokimia pada daun secara kualitatif dan kuantitatif sangat bervariasi tergantung pada tahap perkembangan daun. Campa *et al.* (2017) melaporkan bahwa seiring dengan tahapan perkembangan daun maka kadar senyawa fenolik seperti alkaloid, asam-asam hidroksisinasamat, xantonoid, dan flavonoid disintesis dalam jumlah berbeda pada daun muda, dewasa dan daun tua. Berbagai faktor yang mempengaruhi diantaranya bertambahnya usia daun, morfologi daun (Aziz dan Jack, 2015) dan kondisi lingkungan (Alba *et al.*, 2021).

Pada penelitian ini, kadar total senyawa fenolik yang rendah pada ekstrak dari daun pucuk (perlakuan P1) kemungkinan disebabkan karena proses biosintesis senyawa bioaktif pada daun masih belum mencapai tingkat yang optimal dan baru optimum tercapai saat daun menjadi dewasa. Dengan demikian total senyawa fenolik yang terdeteksi pada ekstrak daun pucuk juga rendah. Hasil dalam penelitian ini tidak berbeda jauh dengan yang dilaporkan oleh Yu *et al.* (2015), bahwa total senyawa fenolik dalam daun lobak mengalami penurunan signifikan seiring meningkatnya usia daun. Deng *et al.* (2014) dalam penelitiannya juga menuliskan bahwa daun blueberry dewasa menunjukkan kandungan fenolik yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang muda.

Total Flavonoid

Berdasarkan data pada Tabel 2 menerangkan bahwa kadar total flavonoid ekstrak daun tenggulun secara signifikan dipengaruhi oleh tingkat ketuaan daun. Ekstrak yang diperoleh dari daun tenggulun dewasa (P3) mengandung total flavonoid tertinggi sebesar 4,330 mg QE/g, sementara ekstrak dari daun pucuk (P1) mengandung total flavonoid terendah sebesar 1,243 mg QE/g. Variasi kandungan senyawa flavonoid pada daun bisa disebabkan oleh usia perkembangan daun yang berbeda, morfologi daun dan tingkat penyerapan daun dewasa terhadap sinar matahari

(Bhakta dan Ganjewala, 2009; Uddin *et al.*, 2012). Daun dewasa memiliki luas permukaan yang lebih luas dan memiliki tingkat penyerapan sinar matahari yang lebih tinggi sehingga memicu sintesis senyawa bioaktif seperti flavonoid lebih banyak dibandingkan dengan daun muda dan daun tua (Uddin *et al.*, 2012). Selain itu, faktor musim, genetik, dan agronomi juga mempengaruhi kandungan flavonoid pada tanaman.

Data yang diperoleh pada penelitian ini memiliki kesamaan dengan yang dilaporkan oleh Kusumawati *et al.* (2019) bahwa kadar senyawa flavonoid pada *loloh* sembung (ekstrak daun sembung/ *Blumea balsamifera* dalam air) dari daun dewasa lebih tinggi dibandingkan dengan daun muda dan daun tua. Anwar *et al.* (2017) juga melaporkan bahwa kadar senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun *Aquilaria beccariana* lebih tinggi pada daun dewasa daripada daun muda.

Total Tanin

Tingkat ketuaan daun memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kadar tanin total ekstrak etanol daun tenggulun, seperti yang ditunjukkan oleh data pada Tabel 2. Ekstrak dari daun tenggulun bagian pucuk (P1) memiliki kadar tanin terendah sebesar 2,129 mg TAE/g, sedangkan ekstrak dari daun tenggulun dewasa (P3) memiliki kadar tanin tertinggi sebesar 23,392 mg TAE/g. Kandungan total tanin pada ekstrak semakin meningkat seiring meningkatnya usia daun dan mencapai kadar maksimal ketika terbentuk daun dewasa. Pada ekstrak daun tenggulun tua terjadi penurunan kadar tanin yang signifikan.

Liu *et al.*, (2020) melaporkan bahwa sepanjang tahapan perkembangan daun, biosintesis tanin terkondensasi menggunakan jalur metabolisme dan prekursor yang sama dengan jalur biosintesis senyawa fenolik yang bersifat larut, oleh karena itu proses biosintesis fenolat akan dialihkan pada biosintesis tanin terkondensasi dan lignin. Polimer tersebut akan terakumulasi pada dinding sel tanaman selama tahapan perkembangan tanaman. Semakin bertambah tingkat ketuaan daun, akumulasi tanin dan lignin akan semakin banyak hingga mencapai

batas optimum pada daun dewasa. Tanin dan metabolit sekunder baru lainnya akan berkurang atau berhenti disintesis apabila daun sudah tua, dengan demikian kadarnya pada daun tua akan lebih rendah dibandingkan dengan pada daun dewasa.

Pada penelitian ini, total tanin yang terdapat pada ekstrak daun tenggulun dewasa (P3) paling tinggi dibandingkan perlakuan yang lainnya. Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda seperti yang dilaporkan oleh Pratama *et al.* (2021) bahwa kadar tanin ekstrak daun salam tua lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak daun salam muda.

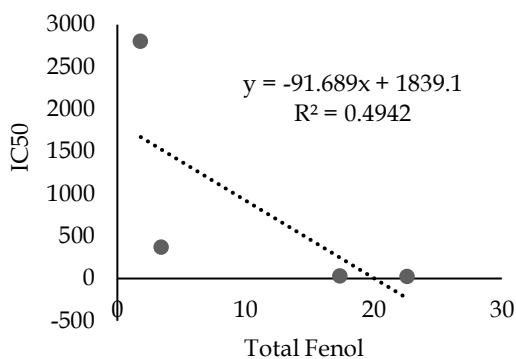
Aktivitas Antioksidan

Perbedaan tingkat ketuaan daun memberikan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun tenggulun. Data yang disajikan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan terendah diperoleh dari ekstrak daun tenggulun pucuk (P1) sebesar 2.796,83 ppm, sedangkan aktivitas antioksidan tertinggi didapatkan dari ekstrak daun tenggulun dewasa sebesar (P3) sebesar 21,265 ppm. Terdapat kecenderungan peningkatan aktivitas antioksidan seiring dengan tahapan perkembangan daun hingga menjadi daun dewasa. Namun demikian, aktivitas antioksidan ekstrak daun tenggulun muda dan dewasa tidak berbeda secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari daun tenggulun muda ataupun dewasa, sama-sama memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Peneliti lain juga melaporkan hal yang serupa dengan hasil penelitian ini yaitu daun gaharu (*Wikstroemia tenuiramis*) muda dan dewasa memiliki aktivitas antioksidan yang sama-sama kuat (Batubara *et al.*, 2020).

Proses penuaan daun berakibat pada penurunan aktivitas antioksidan ekstrak. Hal ini terlihat dari aktivitas antioksidan ekstrak daun tenggulun tua yang lebih rendah dari ekstrak daun tenggulun dewasa. Zhang *et al.* (2023) melaporkan bahwa saat penuaan daun, terjadi penurunan kapasitas antioksidan sementara level *reactive oxygen species* (ROS) mengalami peningkatan. Produksi ROS yang berlebihan dapat menimbulkan stres oksidatif dan memicu penuaan dini pada

daun dan seluruh tanaman (Zimmermann dan Zentgraf, 2005). Terdapat beberapa faktor yang dapat menstimulasi peningkatan produksi ROS pada tanaman diantaranya kondisi tekanan lingkungan seperti kekeringan, salinitas, kondisi panas atau dingin, toksisitas logam, radiasi UV-B dan serangan patogen (Sharma *et al.*, 2012).

Aktivitas antioksidan pada ekstrak daun tenggulun berhubungan dengan kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak. Maieves *et al.* (2015) melaporkan bahwa kapasitas antioksidan sangat erat hubungannya dengan kandungan fenolik total. Jika dilihat dari kadar total senyawa fenolik yang terkandung pada ekstrak, maka ekstrak daun tenggulun dewasa memiliki kadar total fenol yang paling tinggi, sehingga aktivitas antioksidannya juga paling tinggi. Hubungan antara kadar total fenol dengan nilai IC₅₀ ekstrak daun tenggulun disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Grafik Korelasi Antara Kadar Total Fenol dengan Aktivitas Antioksidan (IC₅₀) Ekstrak Daun Tenggulun

Berdasarkan grafik korelasi pada Gambar 2 dapat ditarik kesimpulan bahwa terdapat korelasi negatif yang cukup antara total fenol dengan aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi (R) sebesar -0,70. Nilai koefisien determinasi (R²) sebesar 49% menunjukkan bahwa peran senyawa fenolik pada ekstrak daun tenggulun dalam menentukan aktivitas antioksidan sebesar 49% sementara 51% ditentukan oleh keberadaan senyawa lainnya.

SIMPULAN

Tingkat ketuaan daun memberikan pengaruh yang signifikan terhadap rendemen, kandungan senyawa bioaktif (total fenol, total flavonoid total tanin) dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun tenggulun. Ekstrak etanol daun tenggulun dewasa (daun berwarna hijau) memiliki karakteristik kimia terbaik berdasarkan kadar total fenol (22,61%), total flavonoid (4,33 %), total tanin (23,39 %) dan aktivitas antioksidan berdasarkan IC₅₀ (21,265 ppm).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Udayana yang telah mendanai penelitian ini melalui DIPA PNPB Universitas Udayana TA-2022 Sesuai dengan Surat Perjanjian Kerja Penelitian Nomor: B/78.444/UN14.4.A/PT.01.03/2022, tanggal 19 April 2022.

DAFTAR PUSTAKA

- Adfa, -M., Hattori, -Y., Ninomiya, -M., Funahashi, -Y., Yoshimura, -T., Koketsu, -M., 2013. Chemical constituents of Indonesian plant *Protium Javanicum* Burm. F. and their antifeedant activities against *Coptotermes Formosanus* shiraki. *Natural Product Research*. 27(3), 270-273. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.665917>
- Alba, T, -M., Tessaro, -E., Sobottka, A, -M., 2024. Seasonal effect on phenolic content and antioxidant activity of young, mature and senescent leaves from *Anredera Cordifolia* (Ten.) steenis (basellaceae). *Brazilian Journal Of Biology*. 84, 1-8. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.254174>
- Ali, -A., Gao, -X., Guo, -Y., 2018. Initiation, progression, and genetic manipulation of leaf senescence. *Methods In Molecular Biology*. 1744, 9-31. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7672-0_2

- Anwar, -K., Rahmanto, -B., Triyasmono, -L., Rizki, M, -I., Halwany, -W., Lestari, -F., 2017. The influence of leaf age on total phenolic, flavonoids, and free radical scavenging capacity of *Aquilaria Beccariana*. *Research Journal Of Pharmaceutical, Biological And Chemical Sciences*. 8(1), 129-133. [https://www.rjpbcs.com/pdf/2017_8\(1S\)/\[20\].pdf](https://www.rjpbcs.com/pdf/2017_8(1S)/[20].pdf)
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis Association of Official Analytical*. AOAC International, Washington
- Aziz, -A., Jack, -R., 2015. Total phenolic content and antioxidant activity in *Nypa fruticans* extracts. *Journal Of Sustainability Science And Management*. 10(1), 87-91. <https://jssm.umt.edu.my/wp-content/uploads/2015/06/8.pdf>
- Baba, S, -A., Malik, S, -A., 2015. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema Jacquemontii* Blume. *Journal Of Taibah University For Science*. 9(4), 449-454. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.11.001>
- Batubara, -R., Hanum, T, -I., Affandi, -O., Wahyuni, H, -S., 2020. Chemical compounds contained in young and mature leaves of agarwood species *Wikstroemia Tenuiramis* and its antioxidant properties. *Biodiversitas*. 21(10), 4616-4622. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211020>
- Bhakta, -D., Ganjewala, -D., 2009. Effect of leaf positions on total phenolics, flavonoids and proanthocyanidins content and antioxidant activities in *Lantana Camara* (L). *Journal Of Scientific Research*. 1(2), 363-369. <https://doi.org/10.3329/jsr.v1i2.1873>
- Campa, -C., Urban, -L., Mondolot, -L., Fabre, -D., Roques, -S., Lizzi, -Y., Aarrouf, -J., Doulebeau, -S., Breitler, J, -C., Letrez, -C., Toniutti, -L., Bertrand, -B., La Fisca, -P., Bidel, L, P, -R., Etienne, -H., 2017. Juvenile coffee leaves acclimated to low light are unable to cope with a moderate light increase. *Frontiers In Plant Science*. 8, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01126>
- Chang, -X., Lu, -Y., Lin, -Z., Qiu, -J., Guo, -X., Pan, -J., Abbasi, A, -M., 2018. Impact of leaf development stages on polyphenolics profile and antioxidant activity in *Clausena Lansium* (Lour.) skeels. *Biomed Research International*. 2018, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2018/7093691>
- Chen, -C., Mokhtar, R, A, -M., Sani, M, S, -A., Noor, N, Q, I, -M., 2022. The effect of maturity and extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant activity of mulberry (*Morus Alba*) fruits and leaves. *Molecules*. 27(8), 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules27082406>
- Chen, X, -M., Ma, -Z., Kitts, D, -D., 2018. Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves. *Food Chemistry*. 249, 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.073>
- Deng, -Y., Yang, -G., Yue, -J., Qian, -B., Liu, -Z., Wang, -D., Zhong, -Y., Zhao, -Y., 2014. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control*. 38(1), 184-191. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.023>
- Durazzo, -A., Lucarini, -M., Souto, E, -B., Cicala, -C., Caiazzo, -E., Izzo, A, -A., Novellino, -E., Santini, -A., 2019. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*. 33(9), 2221-2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- Guo, -Y., Ren, -G., Zhang, -K., Li, -Z., Miao, -Y., Guo, -H., 2021. Leaf senescence: progression, regulation, and application. *Molecular Horticulture*. 1(1), 1-25. <https://doi.org/10.1186/s43897-021-00006-9>

- Harsojuwono, BA., Arnata, IW., Puspawati, D., Pratiwi, IDPK. 2021. *Rancangan Percobaan : Teori dan Aplikasinya*. Inteligensia Media, Malang
- Jolkili, -M., Shaari, A, -R., Razak, N, -A., 2018. Effect of leaf maturity and drying temperature on total phenolic content of *Cassia Alata*. *AIP Conference Proceedings*, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1063/1.5066762>
- Kusumawati, I, G, A, -W., Reyunika, I, -N., Yogeswara, I, B, -A., Mustika, I, -G., Adi Putra, I, M, -W., Santoso, -U., Marsono, -Y., 2019. Effect of loloh sembung (*Blumea Balsamifera*) maturity stage on antioxidant activity. *Indonesian Journal Of Nutrition And Dietetics*. 6(1), 1-6. [https://doi.org/10.21927/ijnd.2018.6\(1\).1-6](https://doi.org/10.21927/ijnd.2018.6(1).1-6)
- Lakitan, B. 1993. *Dasar-Dasar Fisiologi Tumbuhan*. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lee, -Y., Hwang, K, -T., 2017. Changes in physicochemical properties of mulberry fruits (*Morus Alba* L.) during ripening. *Scientia Horticulturae*. 217, 189-196. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.01.042>
- Liu, -Z., Bruins, M, -E., de Bruijn, W, J, -C., Vincken, J, -P., 2020. A comparison of the phenolic composition of old and young tea leaves reveals a decrease in flavanols and phenolic acids and an increase in flavonols upon tea leaf maturation. *Journal of Food Composition and Analysis*. 86, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103385>
- Maieves, H, -A., López-Froilán, -R., Morales, -P., Pérez-Rodríguez, M, -L., Hoffmann Ribani, -R., Cámara, -M., Sánchez-Mata, M, -C., 2015. Antioxidant phytochemicals of *hovenia dulcis* thunb. peduncles in different maturity stages. *Journal Of Functional Foods*. 18, 1117-1124. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.044>
- Mei, S, P, -Y., Yusasrini, N, L, -A., Nocianitri, K, -A., 2021. Pengaruh suhu dan lama pengeringan terhadap karakteristik teh herbal matcha daun tenggulun (*Protium Javanicum* Burm.F.). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*. 10(3), 400-412. <https://doi.org/10.24843/itepa.2021.v10.i03.p08>
- Molyneux, -P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Of Science And Technology*. 26(2), 211-219. <https://sjst.psu.ac.th/journal/26-2.pdf/07-DPPH.pdf>
- Nair, -R., Ghakker, -N., Sharma, -A., 2015. Spectrophotometric estimation of tannins in raw and processed form (*Paan Masala*) of areca nut. *International Journal Of Education And Science Research Review*. 1, 51-56. <https://ijesrr.org/publication/17/IJESRR%20V-2-1-9E.pdf>
- Pratama, B, -P., Supriyadi., Swasono, R, -T., Pranoto, -Y., 2021. Different leaf maturities and withering durations affect the antioxidant potential and aroma compound of indonesian bay leaf [*Syzygium Polyanthum* (Wight) Walp.]. *International Food Research Journal*. 28(6), 1196-1203. <https://doi.org/10.47836/ifrj.28.6.11>
- Rohiqi, -H., Yusasrini, N, L, -A., Puspawati, G, -D., 2021. Pengaruh tingkat ketuaan daun terhadap karakteristik teh herbal matcha tenggulun (*Protium Javanicum* Burm.F.). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*. 10(3), 345-356. <https://doi.org/10.24843/itepa.2021.v10.i03.p03>
- Suirta, -I., Puspawati, N, -M., Asih, I, R, -A., 2016. Aktifitas antiinflamasi topikal minyak atsiri dan ekstrak eter tumbuhan tenggulun, (*Protium Javanicum*, Burm) terhadap model inflamasi kulit pada tikus. *Cakra Kimia*, 4(1), 8-17. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/cakra/article/download/21410/14143/>
- Sharma, -P., Jha, A, -B., Dubey, R, -S., Pessarakli, -M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal Of Botany*. 2012, 1-26.

- <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Thi, N, -D., Hwang, E, -S., 2014. Bioactive compound contents and antioxidant activity in aronia (*Aronia Melanocarpa*) leaves collected at different growth stages. *Preventive Nutrition And Food Science*. 19(3), 204-212. <https://doi.org/10.3746/pnf.2014.19.3.204>
- Uddin, M, -K., Juraimi, A, -S., Ali, M, -E., Ismail, M, -R., 2012. Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of purslane (*Portulaca Oleracea* L.) at different growth stages. *International Journal Of Molecular Sciences*. 13(8), 10257-10267. <https://doi.org/10.3390/ijms130810257>
- Yolanda, S, A, -C., Yusasrini, N, L, -A., Kencana, P, I, -N., 2021. Pengaruh jenis pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun tenggulun (*Protium Javanicum* Burm. F) menggunakan metode maserasi. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*. 10(4), 681-689. <https://doi.org/10.24843/itepa.2021.v10.i04.p13>
- Yu, -X., Bals, -O., Grimi, -N., Vorobiev, -E. 2015. A new way for the oil plant biomass valorization: Polyphenols and proteins extraction from rapeseed stems and leaves assisted by pulsed electric fields. *Industrial Crops And Products*. 74, 309-318. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.045>
- Zhang, -M., Choe, -J., Bu, -T., Liu, -S., Kim, -S., 2023. Comparison of antioxidant properties and metabolite profiling of *Acer Pseudoplatanus* leaves of different colors. *Antioxidants*. 12(1), 1-19. <https://doi.org/10.3390/antiox12010065>
- Zhang, -Y., Cai, -P., Cheng, -G., Zhang, -Y., 2022. A brief review of phenolic compounds identified from plants: their extraction, analysis, and biological activity. *Natural Product Communications*. 17(1), 1-14. <https://doi.org/10.1177/1934578x211069721>
- Zimmermann, -P., Zentgraf, -U., 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 10(3), 515-534. http://www.cmbl.org.pl/pdf/Vol10_p515.pdf