

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK HIPOKOTIL *Bruguiera gymnorhiza* PADA PELARUT DAN FASE KEMATANGAN YANG BERBEDA

by Sri Handayani

Submission date: 09-Nov-2021 08:34AM (UTC+0700)

Submission ID: 1697267389

File name: 10._R-jurnal-aktivitas_antioksidan_hipokotil_B.gym-.docx (625.65K)

Word count: 4409

Character count: 28086

VOLUME 15, NOMOR 3 SEPTEMBER 2021

ISSN: 1907-8056
e-ISSN: 2527-5410

AGROINTEK

JURNAL TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN

JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
UNIVERSITAS TRUNOJOYO MADURA



AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK HIPOKOTIL *Bruguiera gymnorhiza* PADA PELARUT DAN FASE KEMATANGAN YANG BERBEDA

Sri Handayani*

Program Studi Teknologi Industri Pertanian, Universitas Tribhuwana Tunggaladewi, Malang, Indonesia

Article history

Diterima:
3 September 2020
Diperbaiki:
17 September 2020
Disetujui:
17 Februari 2021

Keyword

Bruguiera gymnorhiza;
hypocotile; extract;
antioxidant activity

ABSTRACT

*The research objective was to determine the best treatment from the results of the antioxidant test, phenol content, tannins and the yield of crude extract of hypocotyl *B. gymnorhiza* in different levels of maturity phase and vary of solvents polarity. The sample extraction was carried out using a single maceration method with organic solvents according to the experimental treatment. Soaking the simplicia powder in a suitable solvent (1:5) for 3 x 24 hours in a dark and sealed container. During maceration, the samples were placed in a dark room within solvent replacement in every 24 hours. Evaporated vacuum were used at a temperature according to the boiling point of each solvent to the filtrate. Each treatment extract was tested for its antioxidant strength (IC50), total phenol, tannin content and yield. The results showed that the best treatment was purple hypocotyl acetone extract of *B. gymnorhiza*, with an antioxidant strength (IC50) of 3.98 ppm, total phenol 21.61 mg.GAE/100 mg extract, tannin 59.20 ppm and yield 4.10% dw simplicia.*

© hak cipta dilindungi undang-undang

* Penulis korespondensi
Email : handa2308@gmail.com
DOI 10.21107/agrointek.v15i3.8477

PENDAHULUAN

Hipokotil *Bruguiera gymnorhiza*, yang dikenal dengan nama buah lindur merupakan salah satu buah mangrove yang dapat digunakan sebagai pangan alternatif, hal ini dikarenakan baik secara fisik (berbentuk padat), maupun kandungan gizinya (kadar protein sebesar 1,91%, kadar lemak sebesar 0,19%, kadar abu sebesar 1,10% dan kadar pati sebesar 18,45%) telah memenuhi persyaratan sebagai bahan pangan (Talib *et al.*, 2018; Handayani, 2018). Perkembangan hipokotil *B. gymnorhiza* selama fase kematangan mengalami perubahan warna dari hijau menjadi ungu. Pigmen alami dalam hipokotil *B. gymnorhiza* adalah pigmen berwarna hijau (klorofil) dan pigmen berwarna ungu (antosianin). Pigmen alami tersebut berperan sebagai senyawa antioksidan. Selanjutnya Handayani *et al.* (2015), melaporkan bahwa hipokotil *B. gymnorhiza* warna ungu didominasi oleh senyawa α -Tokoferol yang juga berperan sebagai antioksidan.

Pada saat ini, penggunaan obat dan suplemen herbal dari tahun ke tahun cenderung meningkat. Peningkatan tersebut mempunyai 2 dimensi korelasi, yaitu aspek medis (khususnya sebagai antioksidan) yang penggunaannya sangat luas di dunia, dan aspek ekonomi terkait dengan adanya nilai tambah perekonomian masyarakat (Dwiyantri dan Hati, 2014). Konsumsi suplemen herbal ini akan memberikan dampak kesehatan dalam tubuh. Suplemen herbal pada umumnya mengandung bahan-bahan yang mempunyai fungsi sebagai antioksidan. Keberadaan antioksidan dalam tubuh dapat berfungsi melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS). Radikal bebas tersebut berasal dari hasil metabolisme oksidatif, yaitu hasil reaksi kimiadan proses metabolik yang terjadi di dalam tubuh (Ingrid dan Santoso, 2014). Antioksidan dalam konsentrasi kecil dapat mencegah atau memperlambat laju oksidasi radikal bebas atau oksidasi lipid. Senyawa antioksidan tersebut dapat berfungsi sebagai penangkap radikal bebas, pembentuk kompleks dengan unsur logam sebagai prooksidan dan berfungsi sebagai senyawa pereduksi.

Antioksidan alami umumnya mempunyai gugus hidroksil (OH) dalam struktur molekulnya. Senyawa tersebut biasanya merupakan senyawa

fenol atau polifenolik. Beberapa senyawa alami yang memiliki aktivitas antioksidan adalah tokoferol, flavonoid, turunan asam sinamat, pospatida, dan asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan antara lain flavon, flavonol, isoflavon, katekin, flavanon dan khalkon, sedangkan yang termasuk turunan asam sinamat adalah asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat dan lain-lain. Senyawa antioksidan alami polifenolik bersifat multifungsional dan dapat bereaksi sebagai: 1) pereduksi, 2) penangkap radikal bebas, 3) pengkelat logam, 4) peredam terbentuknya oksigen singlet (Maesaroh *et al.*, 2018).

Ekstraksi senyawa bioaktif pada jaringan tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut organik. Pelarut organik akan terdifusi masuk ke dalam jaringan tanaman dan melarutkan senyawa yang memiliki polaritas yang sama dengan pelarut. Jumlah maupun jenis komponen senyawa yang terlarut dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti: lama ekstraksi, suhu, dan jenis pelarut. Hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan pelarut adalah daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah menguap pada suhu rendah, mudah diserap bahan, memberi aksi perlindungan, tidak menyebabkan terbentuknya senyawa kompleks dan atau mendegradasi bahan yang diekstraksi. Pelarut yang digunakan harus didasarkan pada target komponen yang akan diekstraksi (Das *et al.*, 2010).

Beberapa pelarut yang sering digunakan untuk mengambil senyawa bioaktif pada bagian tanaman disajikan pada Tabel 1.

Senyawa kimia pada bagian tanaman mudah larut pada pelarut yang relatif sama dengan tingkat kepolaran, semakin besar konstanta dielektrik maka semakin polar pelarut tersebut. Pelarut yang digunakan dapat bersifat polar, semi polar dan non-polar. Pemilihan pelarut yang digunakan tergantung pada sifat senyawa yang akan diekstrak karena setiap senyawa memiliki daya kelarutan yang berbeda dalam pelarut. Gaya yang bekerja dalam proses ekstraksi adalah perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel, sehingga menyebabkan protoplasma membengkak dan akibatnya kandungan sel berdifusi ke luar sel. Berbagai senyawa yang mempunyai fungsi sebagai senyawa antioksidan pada bahan pangan tergolong dalam senyawa polar hingga non polar.

Tabel I Jenis senyawa bioaktif yang larut dalam pelarut organik dengan berbagai tingkat kepolaran yang berbeda

Air	Etanol	Metanol	Kloroform	Eter	Aseton
Antosianin	Tanin	Antosianin	Terpenoid	Alkaloid	Fenol
Pati	Saponin	Terpenoid	Flavonoid	Kumarin	Flanonol
Tanin	Polifenol	Saponin		Asam	
Terpenoid	Flavonol	Polifenol		Lemak	
Polipeptida	Sterol	Flavonoid		Terpenoid	
Lektin	Alkaloid	Lakton			
	Poliasetilen	Santilin			
		Tanin			

Sumber : (Tiwari *et al.*, 2011)

Informasi hasil penelitian kekuatan antioksidan ekstrak berbagai pelarut pada hipokotil *B. gymnorhiza* fase kematangan sangat terbatas. Informasi ini sangat diperlukan dalam pengembangan hipokotil *B. gymnorhiza* sebagai bahan fortifikasi, pangan fungsional, bahan suplemen dan sebagainya.

Tujuan penelitian adalah untuk menganalisis aktivitas antioksidan ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* pada pelarut dan fase kematangan yang berbeda, serta menentukan perlakuan terbaik hasil uji antioksidan, kandungan fenol, tanin dan rendemen.

METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Sampel diambil dari wilayah pesisir kawasan hutan mangrove di Desa Sawohan, Kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur. Selanjutnya melakukan penelitian di Laboratorium Rekayasa Fakultas Pertanian, Universitas Tribhuwana Tunggaladewi, Laboratorium Mipa, dan Laboratorium Pengawasan Mutu dan Keamanan Pangan, Universitas Brawijaya

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan utama penelitian adalah hipokotil *B. gymnorhiza* (L) Lamk, diambil dari tanaman *B. gymnorhiza* yang tumbuh di lahan dengan salinitas air antara 8–20 ‰, dan pH air antara 7,41–7,49. Hipokotil yang digunakan dalam fase kematangan, terdiri atas tiga warna, yaitu: hijau tua dengan umur 77 HSA (hari etelah anthesis), yaitu dari ujung sampai pangkal hipokotil berwarna hijau merata, hijau-ungu dengan umur 89 HAS, yaitu bagian ujung hipokotil berwarna ungu dan bagian pangkal hipokotil berwarna hijau dengan perbandingan luasan ± 50:50), dan ungu dengan umur 107 HAS, yaitu dari ujung hipokotil sampai pangkal hipokotil berwarna ungu merata.

Bahan kimia yang digunakan untuk penelitian adalah katagori PA (Pro Analisis) meliputi: akuades, bahan kimia (Merck): H₂SO₄, KMnO₄, Na-Oksalat, Na₂C₂O₄, pelarut organik (Sigma-Aldrich): etil asetat, metanol, etanol, aseton, n-heksan, asam galat (Merck 8.42649.0025), pereaksi Folin-Ciaocalteu (Merck 109001), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil)(Sigma Aldrich).

Peralatan untuk penelitian meliputi: *shaker* (tipe Deidelp Unimax 2010), *rotary vacuum evaporator* (tipe 144 Buchi), *vacuum dryer*, timbangan analitik (Shimadzu), timbangan digital (Precia), mikro pipet, pipet ukur (10, 5 dan 1 ml), *glass ware*, seperangkat *spektrofotometer UV-Vis* (tipe Spectro 20D, Shimadzu),

Hipokotil *B. gymnorhiza*

Ekstraksi sampel dilakukan berdasarkan metode maserasi dengan pelarut organik sesuai perlakuan percobaan. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia atau sampel dalam pelarut dengan perbandingan simplisia:pelarut sebesar 1:5 b/v, selama 3 x 24 jam dalam wadah gelap dan tertutup. Selama maserasi, sampel diletakkan dalam ruangan gelap. dan penggantian pelarut dilakukan setiap 24 jam. Hasil maserasi disaring dengan penyaring hampa sehingga diperoleh filtrat dan residu. Filtrat hasil maserasi hari pertama, kedua dan ketiga dikumpulkan dan dievaporasi menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Penangas air pada alat *vacuum rotary evaporator* diatur pada suhu 40°C. Evaporasi dihentikan saat distilat sudah tidak menetes lagi pada labu penampungan (Handayani *et al.*, 2014). Hasil ekstrak kasar ditampung dalam botol kaca gelap dan disimpan pada suhu ± 4°C.

Analisis Rendemen ekstrak

Rendemen ekstrak dihitung dari berat ekstrak dibagi berat awal sampel dikalikan 100 %.

Analisis Total Fenol

Pada awal sebelum melakukan analisis total fenol masing-masing ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza*, terlebih dahulu membuat kurva standar asam galat dari 3 kali pengulangan. Pembuatan kurva standar asam galat dilakukan dengan cara membuat konsentrasi larutan asam galat (20 hingga 200 ppm dalam akuades), kemudian dari masing-masing konsentrasi larutan asam galat tersebut diambil 0,5 ml untuk ditambahkan pereaksi *Folen-Ciaocalteu* 50% dan 7,5 ml akuades. Campuran didiamkan 10 menit, ditambahkan 1,5 ml Na_2CO_3 2% w/v, dipanaskan dalam *waterbath* suhu 40°C selama 10 menit dan segera didinginkan dalam air es. Selanjutnya diukur absorbansi menggunakan *spektrofotometer UV-Vis* dengan panjang gelombang 755 nm. Hasil absorbansi sebagai fungsi konsentrasi kadar asam galat diplotkan dalam grafik dan digunakan sebagai kurva standar asam galat. Selanjutnya mengukur masing-masing sampel dengan berbagai konsentrasi (ppm) dengan prosedur yang sama dengan asam galat. Pilih nilai absorbansi dari sampel dengan range 0,2 – 0,8 yang mempunyai nilai total fenol tertinggi. Sampel terpilih selanjutnya dihitung total fenoln dengan memasukkan dalam rumus persamaan asam galat, yaitu:

$$Y = a + bx$$

Hasil pengukuran sampel: $Y = Y_s - Y_b$
dimana:

Y_s =nilai absorbansi sampel

Y_b =nilai absorbansi blanko

$$x = Y - a / b \text{ ppm}$$

%Fenol = $[(x \cdot fp \cdot v) / \text{mg sampel}] \times 100\%$
dimana:

x =dengan satuan mg/10 ml (untuk ekuivalen asam galat)

fp =faktor pengenceran (hasil pemilihan konsentrasi)

v =volume sampel

Analisis Kadar Tanin

Uji kadar tanin dilakukan sesuai metode Lowenthal-Procter. Prinsip pengukuran kadar tanin metode ini adalah selisih volume titrasi filtrat I dan II dengan larutan KMnO_4 0,1 N. Filtrat I diperoleh dari melarutkan sampel halus dengan akuades dengan penambahan larutan indigokarmin, filtrat II diperoleh dari hasil

penyaringan filtrat I ditambah larutan gelatin, larutan garam asam dan *kaolin powder*.

Analisis Aktivitas Antioksidan

Analisis aktivitas antioksidan diukur dengan metode DPPH *radical scavenging activity* (Eveline *et al.*, 2014). Sebelum dilakukan uji aktivitas antioksidan, ditentukan terlebih dahulu panjang gelombang maksimum, *operating time* dan deret konsentrasi hasil pengenceran sampel. Serapan Panjang gelombang diukur pada 450–550nm, dan *operating time* diukur pada 0, 30, 60 dan 90 menit. Selanjutnya ekstrak sampel masing-masing perlakuan percobaan dibuat beberapa konsentrasi (20, 40, 60, 80 dan 100 ppm) pada larutan DPPH 0,2 mM (DPPH dalam pelarut metanol), ditunggu hingga *operating time* tercapai. Absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang maksimum. Aktivitas antioksidan ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* diukur sebagai setengah maksimal konsentrasi hambat (IC_{50}) yang dinyatakan sebagai konsentrasi molar.

Hasil perhitungan IC_{50} dilakukan dengan mengukur masing-masing sampel pada nilai penghambatannya (inhibisi) yang tertera pada alat spektrofotometri, selanjutnya persen penghambatan masing-masing konsentrasi sampel diplot pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan regresi linear yang diperoleh dalam bentuk persamaan $y = a + bx$. Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk mencari nilai IC_{50} (*inhibitor concentration* 50%) dari masing-masing sampel dengan menyatakan nilai y sebesar 50, dan nilai x yang diperoleh sebagai nilai IC_{50} .

Rancangan percobaan

Penelitian ini dirancang secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Faktorial (RAF), dengan perlakuan terdiri atas 2 faktor. Faktor I yaitu warna hipokotil *B. gymnorhiza* (H), terdiri 3 aras yaitu: H_1 =hipokotil *B. gymnorhiza* warna hijau (umur 77 HSA), H_2 =hipokotil *B. gymnorhiza* warna hijau-ungu (umur 89 HSA), H_3 =hipokotil *B. gymnorhiza* warna ungu (umur 107 HSA). Faktor II yaitu jenis pelarut (P), terdiri 4 aras yaitu P_1 =metanol, P_2 =etanol, P_3 =aseton, P_4 =n-heksan. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali sebagai ulangan percobaan.

Analisa data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *Analysis of Variance (Two Ways ANOVA)* dengan SPSS.17. Apabila dari pengujian menunjukkan adanya pengaruh yang nyata 95%

($p=0,05$), maka dilakukan uji lanjut *Tukey* pada taraf 5%.

Perlakuan terbaik penelitian ini berdasarkan kriteria yaitu perlakuan yang mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi (IC_{50} terendah) sebagai prioritas utama, kemudian sebagai urutan berikutnya adalah total fenol, tanin, dan terakhir adalah rendemen ekstrak tertinggi. Untuk mengetahui hubungan keeratan antara parameter, maka dilakukan analisis korelasi antara rendemen, total fenol, tanin dan IC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza*

Rata-rata rendemen ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* hasil maserasi menggunakan jenis pelarut dengan tingkat kepolaran berbeda disajikan pada Tabel 2. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa nilai rendemen ekstrak kasar terhadap warna hipokotil, penggunaan jenis pelarut, dan interaksinya berpengaruh nyata ($p<0,05$). Hubungan interaksi antara fase matang dan jenis pelarut ditunjukkan dengan notasi yang berbeda pada rata-rata rendemen ekstrak metanol dan aseton pada hipokotil warna hijau, warna hijau-ungu dan ungu (Tabel 2). Hal tersebut menunjukkan bahwa antara pelarut metanol dan

aseton dan fase matang hipokotil terdapat hubungan yang saling mempengaruhi.

Rata-rata nilai rendemen berkisar antara 0,82% (b/b) (ekstrak n-heksan hipokotil warna hijau) hingga 27,89% (ekstrak etanol hipokotil warna hijau-ungu). Berdasarkan jenis pelarut, rendemen terbesar terdapat pada ekstrak etanol, selanjutnya ekstrak metanol, aseton dan n-heksan. Besarnya rendemen ekstrak etanol dan metanol dikarenakan senyawa polar seperti tanin dan saponin alkaloid kuartener, komponen fenolik, karoten, tanin, gula, asam amino, glikosida, dan garam mineral larut sempurna dalam pelarut metanol dan etanol. Senyawa tersebut mempunyai bobot molekul relatif besar. Besarnya bobot molekul tanin dan saponin, serta sifat koloid tanin mempunyai peranan terhadap besarnya rendemen ekstrak metanol dan etanol. (Harborne, 1987).

Rata-rata rendemen pada penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Sudirman *et al.* (2014), yang menginformasikan bahwa rendemen ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* terbesar adalah hasil ekstraksi dengan pelarut polar (metanol sebesar 78,46 mg/g bahan, kemudian pelarut semi-polar (etilasetat sebesar 1,25 mg/g bahan), dan pelarut non-polar (n-heksan sebesar 0,47 mg/g bahan).

Tabel 2 Rata-rata rendemen, total fenol, kadar tannin dan IC_{50} pada ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* fase kematangan dan jenis pelarut dengan tingkat polaritas berbeda

Perlakuan		Parameter penelitian			
Warna hipokotil	Jenis pelarut	Rendemen (% bk)	Total fenol (mg GAE/100 mg ekstrak)	Kadar tanin (ppm)	IC_{50} (ppm)
Hijau	Metanol	20,66 e	13,18 de	95,46 g	11,79 c
	Etanol	26,18 g	7,12 b	86,99 f	12,74 c
	Aseton	3,25 b	14,21 e	60,18 bc	9,00 ab
	n-Heksan	0,82 a	0,00 a	0,00 a	57,31 b
Hijau-ungu	Metanol	24,17 f	11,68 ed	104,98 h	11,58 bc
	Etanol	27,89 g	10,94 e	95,93 g	21,01 d
	Aseton	4,41 d	19,70 f	81,83 d	5,25 ab
	n-Heksan	0,89 ab	0,00 a	0,00 a	43,76 fg
Ungu	Metanol	18,25 a	17,92 f	84,83 ef	10,30 abc
	Etanol	26,73 g	11,44 cd	77,35 c	35,93 a
	Aseton	4,10 c	21,61 g	59,29 b	3,98 a
	n-Heksan	0,89 ab	0,00 a	0,00 a	43,76 g
Vitamin C					3,57

Keterangan :

^{*)} Huruf berbeda dibelakang angka menunjukkan pengaruh nyata pada uji *Tukey* dengan $p < 0,05$

Total fenol ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza*

Rata-rata total fenol ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* dan jenis pelarut dengan tingkat kepolaran berbeda disajikan pada Tabel 2. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa total fenol ekstrak kasar warna hipokotil, penggunaan jenis pelarut, dan interaksinya berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap total fenol *B. gymnorhiza*. Hubungan interaksi antara fase matang dan penggunaan jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, ditunjukkan dengan notasi yang berbeda.

Rata-rata total fenol ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* (Tabel 2) berkisar antara 7,12 mg GAE/100 mg ekstrak (ekstrak etanol hipokotil warna hijau) hingga 21,6 mg GAE/100 mg ekstrak (ekstrak aseton hipokotil warna ungu). Ekstrak n-heksan dalam analisis total fenol tidak menunjukkan perubahan warna setelah ditambah pereaksi Follen-Ciaocalteu 50%, ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa fenol ekstrak n-heksan diduga sangat kecil, sehingga tidak terdeteksi.

Berdasarkan jenis pelarut yang digunakan, maka hasil analisis menunjukkan kadar total fenol tertinggi pada ekstrak aseton, kemudian diikuti oleh ekstrak metanol dan etanol. Sedangkan berdasarkan fase kematangan hipokotil, maka urutan kadar total fenol tertinggi pada hipokotil *B. gymnorhiza* adalah warna ungu, selanjutnya diikuti hipokotil warna hijau-ungu dan hijau. Tingginya total fenol dalam ekstrak aseton *B. gymnorhiza* didominasi oleh senyawa golongan fenol dan flavonol (Tiwari *et al.*, 2011). Hasil penelitian serupa menginformasikan bahwa kandungan fenol biji alpukat tertinggi terdapat pada ekstrak yang dilarutkan dengan aseton. Hipokotil dan biji merupakan bagian tanaman yang mempunyai fungsi yang sama, yaitu sebagai benih tanaman (Rifai *et al.*, 2018).

Selanjutnya hasil penelitian Haq *et al.* (2011) menginformasikan bahwa total fenol ekstrak metanol daun *B. gymnorhiza* sebesar 17,87 mg GAE/100 mg ekstrak, ekstrak etanol sebesar 18,94 mg GAE/100 mg ekstrak, ekstrak kloroform sebesar 1,31 mg GAE/100 mg ekstrak. Selanjutnya total fenol ekstrak metanol kulit batang *B. gymnorhiza* sebesar 26,847 mg GAE/100 mg ekstrak, ekstrak etanol sebesar 28,493 mg GAE/100 mg ekstrak, dan ekstrak kloroform sebesar 2,88 mg GAE/100 mg ekstrak. Sedangkan kadar total fenol hipokotil tidak

dilaporkan. Kadar total fenol daun dan kulit batang *B. gymnorhiza* relatif lebih tinggi dibandingkan total fenol hipokotil hasil penelitian ini dengan menggunakan pelarut yang sama (metanol dan etanol). Penggunaan pelarut aseton untuk ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* warna hijau-ungu (19,70 mg GAE/100 mg ekstrak) dan ungu (21,61 mg GAE/100 mg ekstrak) pada Tabel 2, menghasilkan total fenol lebih tinggi dibandingkan total fenol daun *B. gymnorhiza* (18,94 mg GAE/100 mg ekstrak) hasil penelitian Haq *et al.* (2011).

Senyawa fenolat pada tanaman terdapat dalam berbagai jenis senyawa dengan struktur bervariasi dan berbeda satu dengan yang lain. Senyawa fenolat tersebut dalam bentuk aglikon, ester, glikosida dan atau terikat sebagai senyawa kompleks. Kelarutan senyawa fenolat terkait dengan struktur senyawa fenolat dan susunan dari cincin aromatik dan jumlah gugus hidroksil yang terikat sehingga membentuk senyawa fenolat sederhana atau senyawa fenolat polimer. Bila senyawa fenolat berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen membentuk senyawa kompleks, maka akan menyebabkan senyawa fenolat menjadi sukar larut dalam air. Senyawa fenolat semakin sukar larut dan lebih sulit diekstraksi apabila terjadi perubahan pada strukturnya akibat pemanasan atau pengeringan.

Kadar tanin ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza*

Rata-rata kadar tanin ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* fase matang hasil maserasi jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda disajikan pada Tabel 2. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa kadar tanin ekstrak kasar terhadap warna hipokotil, penggunaan jenis pelarut, dan interaksinya berpengaruh nyata ($p < 0,05$).

Berdasarkan analisis kadar tanin (Tabel 2), menunjukkan bahwa kadar tanin ekstrak aseton pada warna hipokotil ungu, tidak sejalan dengan hasil analisis total fenolnya. Nilai total fenol ekstrak aseton pada warna hipokotil ungu menempati urutan tertinggi (21,61 mg GAE/100 mg ekstrak) sedangkan kadar taninnya menempati urutan terendah (59,29 ppm). Hal tersebut menunjukkan bahwa keberadaan senyawa golongan fenol pada ekstrak aseton tidak didominasi oleh senyawa tanin, melainkan senyawa lain yang masih tergolong fenol, misalkan golongan flavonoid, triterpenoid, dan sebagainya. Senyawa tanin merupakan senyawa

yang cenderung larut dalam pelarut polar, tetapi masih larut dalam pelarut semi-polar (Das et al., 2010) sedangkan keberadaan senyawa tanin semakin kecil dengan semakin tua umur hipokotil (warna ungu). Handayani (2016) melaporkan bahwa berdasarkan uji histokimia, senyawa tanin tersebar pada seluruh bagian hipokotil, dengan konsentrasi tertinggi pada bagian eksokarp, kemudian mesokarp dan endokarp.

Rata-rata kadar tanin ekstrak *B. gymnorhiza* berkisar antara 59,29 ppm (ekstrak aseton hipokotil warna ungu) hingga 104,98 ppm (ekstrak metanol hipokotil warna hijau-ungu). Ekstrak n-heksan hipokotil *B. gymnorhiza* pada analisis kadar tanin terdeteksi tidak mengandung tanin. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa golongan tanin tidak larut dalam pelarut non-polar seperti n-heksan.

Berdasarkan jenis pelarut yang digunakan, hasil analisis menunjukkan bahwa kadar tanin tertinggi adalah ekstrak metanol, selanjutnya diikuti oleh ekstrak etanol dan aseton. Sedangkan berdasarkan fase kematangan hipokotil, kadar tanin tertinggi pada hipokotil *B. gymnorhiza* warna hijau-ungu, selanjutnya hipokotil warna hijau dan ungu.

Kandungan senyawa tanin yang ditemukan pada *B. gymnorhiza* jumlahnya sangat besar, terutama pada bagian kulit, daun dan batang tanaman. Tanin tergolong kelompok senyawa fenolik kompleks, kelarutan tanin pada pelarut organik polar sampai batas kepolaran tertentu, sedangkan kelarutannya pada pelarut non polar seperti benzena, kloroform, n-heksan, tanin tidak larut. Keberadaan tanin cukup besar pada buah-buahan yang belum masak dan berangsur hilang selama proses pematangan buah (Harborne, 1987).

Nilai IC_{50} dalam DPPH ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza*.

Sampel dan blanko dalam penelitian ini, diukur pada panjang gelombang (λ) 517 nm dan *operating time* 30 menit. Besarnya aktivitas antioksidan dihitung sebagai *Inhibition Concentration 50%* (IC_{50}), yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai IC_{50} sampel, menunjukkan aktivitas antioksidannya semakin tinggi. Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen yang

menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning yang dapat diukur pada λ 517 nm (Waksman De Torres et al., 2011)

Rata-rata IC_{50} ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* hasil maserasi dengan ragam jenis pelarut yang polaritasnya berbeda disajikan pada Tabel 2. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis pelarut, dan interaksi antara warna dan jenis pelarut berpengaruh nyata terhadap IC_{50} ekstrak ($p < 0,05$). Hubungan interaksi antara fase matang dan jenis pelarut ditunjukkan dengan notasi yang berbeda pada rata-rata IC_{50} ekstrak etanol pada hipokotil warna hijau, hijau-ungu dan ungu, ekstrak aseton pada hipokotil warna ungu, dan ekstrak n-heksan pada hipokotil warna hijau dan ungu. Hal tersebut menunjukkan bahwa antara pelarut etanol, aseton, dan n-heksan terdapat hubungan yang saling mempengaruhi terhadap fase matang hipokotil.

Hasil pengamatan (Tabel 2) menunjukkan bahwa rata-rata IC_{50} ekstrak *B. gymnorhiza* berkisar antara 3,98 ppm (ekstrak aseton hipokotil warna ungu) hingga 57,30 ppm (ekstrak n-heksan hipokotil warna hijau). Sebagai kontrol positif adalah vitamin C (dalam metanol). Hasil analisis menunjukkan bahwa IC_{50} vitamin C sebesar $3,57 \pm 0,06$ ppm, nilai ini sedikit lebih rendah dibandingkan IC_{50} ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* hasil pengamatan. Oleh karena itu ekstrak aseton hipokotil warna ungu dapat direkomendasikan sebagai sumber antioksidan alami.

Berdasarkan ragam jenis pelarut yang digunakan, hasil analisis menunjukkan bahwa IC_{50} terendah ke tertinggi berturut-turut adalah ekstrak aseton, metanol, etanol, dan n-heksan. Sedangkan berdasarkan fase matang hipokotil, IC_{50} terendah ke tertinggi berturut-turut adalah hipokotil *B. gymnorhiza* warna ungu, hijau-ungu dan hijau. Rendahnya IC_{50} dalam ekstrak aseton menunjukkan bahwa *B. gymnorhiza* didominasi oleh senyawa golongan fenol dan flavononol dimana kedua golongan senyawa ini merupakan senyawa yang mempunyai kekuatan antioksidan. (Tiwari et al., 2011). Data hasil pengamatan IC_{50} tersebut bila dihubungkan dengan data total fenol menunjukkan, bahwa makin besar total fenol ekstrak hipokotil, maka makin rendah nilai IC_{50} (Tabel 2), dalam hal ini menunjukkan korelasi antar variabel tersebut. Rendahnya nilai IC_{50} ekstrak aseton hipokotil ungu dibandingkan ekstrak aseton hipokotil warna hijau-ungu dan hijau, diduga karena pada ekstrak aseton hipokotil

warna ungu terdapat beberapa senyawa yang mempunyai kekuatan antioksidan. Berdasarkan analisis FTIR, gugus fungsional yang mendominasi ekstrak aseton hipokotil ungu adalah gugus fungsional asam karboksilat (R-COOH) dan senyawa aromatik (senyawa fenolat rantai pendek), sedangkan hasil analisis LCMS menunjukkan adanya puncak relatif berturut-turut 802,70; 604,87; 428,90 m/z untuk hipokotil ungu dan yang tidak muncul di hipokotil warna hijau dan hijau-ungu. Diduga senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa bioaktif yang mempunyai kekuatan antioksidan, dan saling berinteraksi (sinergisme) untuk meningkatkan aktivitas antioksidan (Handayani, 2017). Aktivitas antioksidan suatu ekstrak ditentukan oleh komponen fenolik dan komponen non-fenolik. Kombinasi antara senyawa antioksidan akan memberikan pengaruh sinergisme yang positif, dan lebih tinggi dibanding aktivitas antioksidan tunggal. Hasil penelitian Pujimulyani *et al.* (2010) menyatakan bahwa hasil kombinasi senyawa antioksidan akan meningkatkan pengaruh yang lebih efektif terhadap efek neuroprotektif, aktivitas antioksidan dan anti inflamasi daripada penggunaan senyawa tunggalnya.

Rendahnya IC₅₀ ekstrak hipokotil warna ungu, juga diduga ada hubungannya dengan keberadaan senyawa antosianin pada hipokotil tersebut. Antosianin merupakan senyawa organik dari keluarga flavonoid, dan beberapa senyawa antosianin yang paling banyak ditemukan di alam adalah pelargonidin (pigmen oranye), peonidin (merah), sianidin (merah keunguan), malvidin (merah lembayung), petunidin (merah lembayung), dan delphinidin (merah lembayung). Berdasarkan hasil kromatogram LCMS keberadaan senyawa antosianin, seperti sianidin (massa=287,24 m/z), malvidin (massa=331,30 m/z), petudinin (massa=358,00 m/z), dan delvinidin (massa=303,00 m/z), dalam ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* tersebut sangatlah sedikit, hal ini dibuktikan dengan tidak muncul/terdeteksinya senyawa-senyawa tersebut sebagai puncak relatif dalam ekstrak hipokotil warna ungu dalam penelitian Handayani (2017).

Laporan penelitian Sudirman *et al.* (2014), menunjukkan bahwa kekuatan aktivitas antioksidan buah (hipokotil) *B. gymnorhiza* tua (berwarna ungu) adalah 3 kali lebih besar dibandingkan buah muda. Senyawa flavonol, flavon, dan glikosil flavon yang tergolong

senyawa flavonoid, dianggap memiliki peran penting sebagai antioksidan yang ditemukan pada buah *B. gymnorhiza*. Demikian pula hasil penelitian Lestario *et al.* (2005) melaporkan bahwa buah duwet masak (warna ungu) mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi dibanding buah duwet belum masak (warna merah dan hijau). Buah-buahan berwarna ungu seperti anggur, *blueberry* dan *strawberry* menunjukkan aktivitas antioksidan yang relatif tinggi, karena kandungan antosianinnya (Guerrero *et al.*, 2010). Terdapat korelasi positif antara aktivitas antioksidan dengan kadar beberapa jenis antosianin (sianidin, delphinidin, malvidin, peonidin dan pelargonidin). Aktivitas antioksidatif antosianidin mencapai 2–6 kali senyawa antioksidan lain seperti asam askorbat dan glutathion.

IC₅₀ ekstrak aseton hipokotil warna ungu dalam penelitian ini sedikit lebih rendah dibandingkan dengan IC₅₀ ekstrak metanol, hasil penelitian (Jacob *et al.*, 2013) melaporkan bahwa IC₅₀ hipokotil muda *B. gymnorhiza* dalam metanol sebesar 11,67 ppm. Ekstrak metanol hipokotil warna ungu tanpa kulit sebesar 26,69 ppm. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan IC₅₀ daun dan batangnya (Sudirman *et al.*, 2014), selanjutnya ekstrak metanol hipokotil tanpa kulit sebesar 9,42 ppm (Jacob *et al.*, 2013). Walaupun demikian terdapat pula nilai IC₅₀ yang jauh lebih rendah dari penelitian ini, yaitu IC₅₀ ekstrak daun *B. Gymnorhiza*, yaitu sebesar 0,04 ppm (ekstrak dalam methanol), 0,03 ppm (ekstrak dalam etanol), 0,27 ppm (ekstrak dalam kloroform), dan kulit batang *B. gymnorhiza* sebesar 0,04 ppm (ekstrak dalam metanol), 0,02 ppm (ekstrak dalam etanol), dan 0,02 ppm (ekstrak dalam kloroform) (Haq *et al.*, 2011)

Kisaran IC₅₀ ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* hasil penelitian ini (3,98–43,76 ppm), menurut (Molyneux, 2004) tergolong sangat kuat, yaitu kurang dari 50 ppm), kecuali pada ekstrak n-heksan hipokotil warna hijau (57,30 ppm) tergolong kuat, yaitu 50–100 ppm.

Kekuatan daya serang (*scavenger*) antioksidan berkaitan dengan strukturnya. Pada senyawa fenolik, gugus hidroksil fenolik merupakan gugus utama yang memberikan sifat antioksidan suatu senyawa. Sifat antioksidan yang tinggi ditentukan oleh jumlah gugus hidroksil fenolik yang bertetangga, sedikitnya 2 gugus atau 3 gugus. Pada senyawa flavonoid, terdapat 3 struktur gugus yang sangat penting dalam

kemampuan meredam radikal bebas, yaitu (1) o-dihidroksi (katekol) pada cincin B, (2) ikatan ganda pada atom C-2 dan C-3 yang berkonjugasi dengan gugus fungsi 4 okso yang akan bertanggung jawab pada delokalisasi elektron dari cincin B, dan (3) gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang keduanya mempunyai ikatan hidrogen dengan gugus keto. Kehadiran gugus hidroksil pada C-3 dalam cincin C juga diperlukan untuk aktivitas peredaman radikal bebas, namun posisi ini kurang dapat teroksidasi dibandingkan gugus hidroksil pada cincin B, dan masih lebih mudah teroksidasi daripada gugus hidroksil pada cincin A.

Penentuan perlakuan terbaik penelitian tahap II

Penentuan perlakuan terbaik pada penelitian tahap II adalah hasil kombinasi perlakuan yang berturut-turut mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi (IC_{50} terendah), total fenol, tanin dan rendemen ekstrak tertinggi.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa IC_{50} terendah 3,98 ppm, dan total fenol tertinggi 21,61 mg GAE/100 mg ekstrak, didapatkan pada ekstrak aseton hipokotil warna ungu, sedangkan tanin tertinggi 104,98 ppm pada ekstrak metanol hipokotil warna hijau-ungu, dan rendemen tertinggi 27,89 % dihasilkan oleh ekstrak etanol hipokotil warna hijau-ungu.

Berdasarkan uraian diatas, dengan demikian maka ekstrak aseton hipokotil *B. gymnorhiza* warna ungu dipilih sebagai hasil perlakuan terbaik.

KESIMPULAN

Perlakuan percobaan aktivitas antioksidan ekstrak hipokotil *B. gymnorhiza* fase matang dan jenis pelarut dengan tingkat kepolaran berbeda yang terbaik adalah ekstrak aseton hipokotil *B. gymnorhiza* warna ungu, yang ditandai oleh IC_{50} 3,98 ppm, total fenol 21,61 mg GAE/100 mg ekstrak, tanin 59,20 ppm dan rendemen 4,10 % bk simplisia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada :

1. Para Laboran di Lab. Mipa, dan Lab. Pengawasan Mutu dan Keamanan Pangan, Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. Ir. Eddy Suprayitno, MS. atas koreksi dan bimbingannya

3. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc. atas izin menggunakan fasilitas laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Abed, S. A., Sirat, H. M., Taher, M. 2013. Total Phenolic, Antioxidant, Antimicrobial Activities and Toxicity Study of *Gynotroches Axillaris* Blume (Rhizophoraceae). *EXCLI Journal*, 12, 404–412.
- Das, K., Tiwari, R. K. S., Shrivastava, D. K. 2010. Techniques for Evaluation of Medicinal Plant Products as Antimicrobial Agent: Current Methods and Future Trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 104–111. <https://doi.org/10.5897/JMPR09.030>
- Dwiyanti, G., Hati, N. K. 2014. *Aktivitas Antioksidan Teh Rosela (Hibiscus sabdariffa) Selama penyimpanan Pada Suhu Ruang* (pp. 2087–0922).
- Eveline, Siregar, T. M., Sanny. 2014. Studi Aktivitas Antioksidan pada Tomat (*Lycopersicon esculentum*) Konvensional dan Organik Selama Penyimpanan. *Prosiding SNST*, 22–28.
- Guerrero, J. C., Luigi, C. P., Andrea, C. C., Fernando, M. S., Heidi, S. S., Emilio, H. U., Emma, B. T. 2010. Antioxidant Capacity, Anthocyanins, and Total Phenol of Wild and Cultivated Berries in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(December), 537–544.
- Handayani, S. 2016. Analisa Histokimia dan Kimia Terhadap Hipokotil *Bruguiera Gymnorhiza* (L) Lamk. Selama Fase Matang (Mature). *J.Rekapangan*, 11(2), 73–80. <http://ejournal.upnjatim.ac.id/index.php/teknologi-pangan/article/viewFile/681/561>
- Handayani, S. 2017. Profil Gugus Fungsional Dan Masa Molekul Ekstrak Kasar Hipokotil *Bruguiera gymnorhiza* (L) Lamk. Fase Matang (mature phase). *Reka Pangan*, 11(L), 1–12.
- Handayani, S. 2018. Identifikasi Jenis Tanaman Mangrove Sebagai Bahan Pangan Alternatif Di Kabupaten Sidoarjo Jawa Timur. *Jurnal Teknologi Pangan*, 12(2). <https://doi.org/10.33005/jtp.v12i2.1287>

- Handayani, S., Yuwono, S. S., Aulanni'am, Suprayitno, E. 2015. Isolation and identification structure antioxidant active compounds of ethyl acetate fraction hypokotil *Bruguiera gymnorrhiza* (L) Lamk. *International Journal of ChemTech Research*, 8(4), 1858–1867.
- Handayani, V., Ahmad, A. R., Sudir, M., Elingera, P., Sam, R. M. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga dan Daun Patikala (*Etingera elatior* (Jack) R.M.Sm) Menggunakan Metode DPPH. *Jurnal Pharmaceutical Sciences & Research*, 1(2), 86–93.
- Haq, M., Sani, W., Hossain, A. B. M. S., Taha, R. M., Monneruzzaman, K. M. 2011. Total Phenolic Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Bruguiera Gymnorrhiza*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(17), 4112–4118.
- Harborne, J. 1987. *Metode fitokimia : penuntun cara modern menganalisis tumbuhan / J.B. Harborne; penerjemah Kosasih Padmawinata, Iwang Soediro; penyunting Sofia Niksolihin :*
- Ingrid, M., Santoso, H. 2014. Ekstraksi Antioksidan dan Senyawa Aktif dari Buah Kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat*, III(3), 43.
- Jacob, A. M., Suptijah, P., Zahidah. 2013. Komposisi Kimia, Komponen Bioaktif dan Aktivitas Antioksidan Buha Lindur (*Bruguiera gymnorrhiza*). *Jphpi 2013*, 16(1), 86–94.
- Lestario, L. N., Suparmo, Raharjo, S., Tranggono. 2005. Perubahan Aktivitas Antioksidan, Kadar Antosianin Dan Polifenol Pada Beberapa Tingkat Kemasakan Buah Duwet (*Syzygium Cumini*). In *Agritech: Jurnal Fakultas Teknologi Pertanian UGM* (Vol. 25, Issue 4, pp. 169–172). <https://doi.org/10.22146/agritech.9444>
- Maesaroh, K., Kurnia, D., Anshori, J. Al. 2018. Perbandingan Metode Uji Aktivitas Antioksidan DPPH, FRAP dan FIC Terhadap Asam Askrobat, Asam Galat dan Kuersetin. *Chemica et Natura Acta*, 6(2), 93–100.
- Pujimulyani, D., Raharjo, S., Marsono, Y., Santoso, U. 2010. Pengaruh Blanching Terhadap Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenol, Flavonoid, Dan Tanin Terkondensasi Kunir Putih (*Curcuma Mangga Val.*). *Agritech: Jurnal Fakultas Teknologi Pertanian UGM*, 30(3), 141–147. <https://doi.org/10.22146/agritech.9665>
- Rifai, G., Widarta, I. W. R., Nocianitri, K. A. 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>
- Sudirman, S., Nurjanah, Jacob, A. M. 2014. Proximate Compositions, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity from Large-Leafed Mangrove (*Bruguiera gymnorrhiza*) fruit. *International Food Research Journal*, 21(6), 2387–2391.
- Talib, A., Tamrin, A., Deni, S. 2018. Study about potential fruit mangrove as a food alterternatif in the future. *International Journal of Agronomy and Tropical Plants*, 1(1), 1–8.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review Abstract. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98–106. <https://doi.org/10.1002/hep.29375>
- Waksman De Torres, N., Salazar-Aranda, R., Pérez-López, L. A., López-Arroyo, J., Alanis-Garza, B. A. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep127>

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK HIPOKOTIL *Bruguiera gymnorhiza* PADA PELARUT DAN FASE KEMATANGAN YANG BERBEDA

ORIGINALITY REPORT

11 %	10 %	1 %	2 %
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	ejournal.upnjatim.ac.id Internet Source	4 %
2	www.scribd.com Internet Source	1 %
3	docobook.com Internet Source	1 %
4	text-id.123dok.com Internet Source	<1 %
5	Submitted to Universitas Pendidikan Indonesia Student Paper	<1 %
6	www.neliti.com Internet Source	<1 %
7	Submitted to Universitas Jenderal Soedirman Student Paper	<1 %
8	journal.uin-alauddin.ac.id Internet Source	<1 %

9	repository.upnyk.ac.id Internet Source	<1%
10	jurnal.unpad.ac.id Internet Source	<1%
11	es.scribd.com Internet Source	<1%
12	repository.ipb.ac.id Internet Source	<1%
13	Submitted to Syiah Kuala University Student Paper	<1%
14	digilib.unimus.ac.id Internet Source	<1%
15	mutiara-mulhidin.blogspot.com Internet Source	<1%
16	pt.slideshare.net Internet Source	<1%
17	ml.scribd.com Internet Source	<1%
18	id.scribd.com Internet Source	<1%
19	muhammadnormansyah.blogspot.com Internet Source	<1%
20	id.123dok.com Internet Source	<1%

