



EVALUASI KANDUNGAN FITOKIMIA, KAPASITAS ANTIOKSIDAN, DAN TOKSISITAS EKSTRAK DAUN *Stevia rebaudiana*

Desvin Frankson¹, Siufui Hendrawan^{2*}, Frans Ferdinal³

¹Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Tarumanagara, Indonesia

^{2,3}Bagian Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Tarumanagara, Indonesia

Email: siufui@fk.untar.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v12i2.12151>

Submit: 03-07-2024; Revised: 21-07-2024; Accepted: 22-07-2024; Published: 30-12-2024

ABSTRAK: Stres oksidatif dapat menyebabkan berbagai masalah kesehatan, seperti autoimun, penyakit vaskular, gangguan respiratori, serta penyakit degeneratif lainnya. Paparan harian sinar UV, polusi udara, dan asap rokok berkontribusi besar terhadap stres oksidatif, namun antioksidan endogen seringkali tidak mampu untuk menetralkan radikal bebas dalam jumlah besar. *Stevia rebaudiana* atau “candyleaf” banyak ditemukan di Indonesia serta dikenal sebagai pemanis alami karena kandungan senyawa steviosida di dalamnya. Studi ini adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk menilai potensi ekstrak stevia sebagai suplemen antioksidan, yang hingga saat ini masih belum banyak ditelusuri. Studi *in vitro* diawali dengan ekstraksi daun stevia dalam larutan metanol melalui metode maserasi dan perkolasi sederhana. Analisis biokimia kemudian dilakukan untuk menguji kandungan fitokimia, fenolik, antioksidan, serta toksisitas ekstrak stevia tersebut. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak stevia mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin, terpenoid, dan fenolik, dengan kandungan total fenolik sebesar 86.30 ± 1.14 mg GAE/g DW. Uji kapasitas antioksidan dengan metode 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)) menunjukkan IC_{50} ekstrak stevia sebesar $20.13 \mu\text{g/mL}$, sedikit lebih tinggi dibandingkan Trolox (analog vitamin E), dengan IC_{50} sebesar $16.50 \mu\text{g/mL}$, sehingga ekstrak stevia tergolong sebagai antioksidan sangat kuat. Sedangkan untuk uji toksisitas secara *bioassay* melalui metode *Brine Shrimp Lethality Test*, ekstrak stevia memiliki nilai LC_{50} sebesar $3388.44 \mu\text{g/mL}$ sehingga dinyatakan non-toksik.

Kata Kunci: *Stevia rebaudiana*, antioksidan, fenolik, *brine shrimp lethality test*

ABSTRACT: Oxidative stress leads to numerous clinical problems, such as autoimmune, vascular and respiratory impairment, as well as many other degenerative diseases. While daily exposure to UV light, air pollution, and smoke largely contribute to oxidative stress, endogenous antioxidants mostly fail to neutralize these high amounts of free radicals. *Stevia rebaudiana* or “candyleaf” is largely found in Indonesia, known for its application as a natural sweetener, owing to its content of stevioside compound. This study is experimental research which aims to assess the potential of stevia extract as an antioxidant supplement, which has not been widely applied. *In vitro* study was performed by extracting stevia leaves in methanol through simple maceration and percolation methods. Subsequently, the stevia extract was subjected to biochemical analysis, i.e. phytochemical screening, total phenolic content assay, antioxidant capacity assay, and toxicity assay. Herein, we found that stevia extract contains flavonoid, saponin, tannin, terpenoid, and phenolic compounds, with total phenolic content of 86.30 ± 1.14 mg GAE/g DW. Moreover, antioxidant capacity assay through 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method showed that IC_{50} of stevia extract is $20.13 \mu\text{g/mL}$, slightly higher than Trolox (vitamin E analog) with IC_{50} of $16.50 \mu\text{g/mL}$, which indicated that stevia extract is a very strong antioxidant. As for toxicity bioassay, *Brine Shrimp Lethality Test* indicated that stevia extract is non-toxic with LC_{50} value of $3388.44 \mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Stevia rebaudiana*, antioxidant, phenolic, *brine shrimp lethality test*

How to Cite: Frankson, D., Hendrawan, S., & Ferdinal, F. (2024). Evaluasi Kandungan Fitokimia, Kapasitas Antioksidan, dan Toksisitas Ekstrak Daun *Stevia rebaudiana*. *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*, 12(2), 1622-1635. <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v12i2.12151>



PENDAHULUAN

Pada tahun 2023, Indonesia kembali menempati urutan pertama sebagai negara dengan tingkat polusi udara tertinggi se-Asia Tenggara dan menempati urutan ke-14 di seluruh dunia (IQAir, 2023). Akibatnya, masyarakat Indonesia terekspos terhadap paparan radikal bebas yang sangat tinggi. Radikal bebas merupakan elektron tidak berpasangan yang dapat merusak makromolekul yang menyusun struktur sel sehat, seperti karbohidrat, asam nukleat, lemak, dan protein, sehingga mengganggu fungsi dan menyebabkan kematian sel atau apoptosis (Checa & Aran, 2020). Selain paparan eksternal, radikal bebas juga dapat terbentuk dalam tubuh akibat stres, inflamasi, infeksi, maupun produk metabolik oleh mitokondria (Birben *et al.*, 2012).

Walaupun secara fisiologis tubuh memiliki antioksidan alami yang dapat menangkal senyawa radikal bebas, akumulasi radikal bebas dalam tubuh seringkali melampaui kapasitas antioksidan, sehingga menimbulkan kondisi stres oksidatif (Andarina & Djauhari, 2017; Birben *et al.*, 2012; Mendonça *et al.*, 2022). Stres oksidatif berlebih ini dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti autoimun, diabetes melitus, penyakit kardiovaskular, neurodegeneratif, pulmoner serta percepatan proses penuaan (Reddy, 2023). Dengan demikian, dibutuhkan suplementasi antioksidan tambahan yang dapat diperoleh dari makanan atau tanaman obat (Andarina & Djauhari, 2017; Mendonça *et al.*, 2022).

Tanaman obat merupakan sumber antioksidan dan berbagai nutrisi tambahan yang sejak lama dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional. Melalui penelitian empiris, pembuktian terhadap pengobatan tradisional dengan tanaman obat telah banyak dilakukan untuk penyembuhan berbagai penyakit kronis (Michiels *et al.*, 2012). Berbagai ekstrak tanaman telah terbukti memiliki kapasitas antioksidan tinggi sehingga diolah sebagai suplemen komersial, di antaranya adalah kunyit (*Curcuma longa*), ekstrak biji kopi (*Coffea arabica*), fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) (Sathisha *et al.*, 2011), dan rosemary (*Rosmarinus officinalis*) (Klančnik *et al.*, 2009). Selain sebagai suplemen kesehatan, tambahan antioksidan pada produk makanan juga berperan untuk mencegah dan menghambat kerusakan produk akibat oksidasi (Klančnik *et al.*, 2009).

Pada pencarian dan identifikasi ekstrak tanaman dengan kapasitas antioksidan, *Stevia rebaudiana* hadir sebagai agen potensial. *Stevia rebaudiana* merupakan tanaman herbal endemik asal Paraguay dan Brazil yang juga banyak dibudidayakan di Indonesia pada ketinggian 800-2,000 m di atas permukaan laut (Faramayuda *et al.*, 2022). Selama berabad-abad, stevia telah dimanfaatkan secara luas oleh penduduk asli Indian Guarani sebagai pemanis alami. Namun, hanya hingga awal tahun 1970, stevia pertama kali diperkenalkan secara luas sebagai pemanis alami pengganti sakarin (Ramesh *et al.*, 2006; Tanaka, 1982). Dengan tingkat kemanisan hingga 300 kali melebihi gula tebu, stevia memiliki kandungan nol-kalori sehingga banyak dimanfaatkan sebagai pengganti gula pasir bagi penderita diabetes (Ramesh *et al.*, 2006).

Rasa manis yang dihasilkan oleh daun stevia dikarenakan adanya kandungan senyawa glikosida steviol, seperti steviosida dan rebaudiosida (Oehme *et al.*, 2017). Namun di samping glikosida steviol sendiri, ekstrak daun stevia diketahui mengandung senyawa fenol, kumarin, flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan terpenoid yang memiliki peran sebagai antioksidan. Selain itu, stevia juga mengandung vitamin seperti asam folat, vitamin B₁₂, vitamin C, serta asam amino esensial (Mlambo *et al.*, 2022). Dikarenakan kandungan metabolit sekunder yang luas serta mudah ditemukan di Indonesia, stevia memiliki potensi tambahan sebagai suplemen antioksidan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi ekstrak stevia sebagai suplemen antioksidan, yang hingga saat ini, pemanfaatannya masih terbatas sebagai pemanis alami. Skrining fitokimia dan penentuan kadar fenolik dilakukan untuk melihat kandungan metabolit sekunder dari ekstrak stevia. Setelah itu, kapasitas antioksidan ekstrak stevia ditentukan melalui metode 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), dengan melihat kemampuan ekstrak dalam menghambat ABTS sebagai senyawa radikal bebas. Pada akhir studi, uji toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) untuk melihat tingkat toksisitas ekstrak stevia.

METODE

Penelitian ini merupakan uji eksperimental secara *in vitro* yang dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Tarumanagara. Daun *Stevia rebaudiana* sebagai bahan uji diperoleh dari Bogor, Indonesia sebagaimana disajikan pada Gambar 1. Analisis kualitatif dan semi-kuantitatif dilakukan untuk mengetahui kandungan fitokimia, kadar fenolik, kapasitas antioksidan, serta toksisitas dari ekstrak stevia.

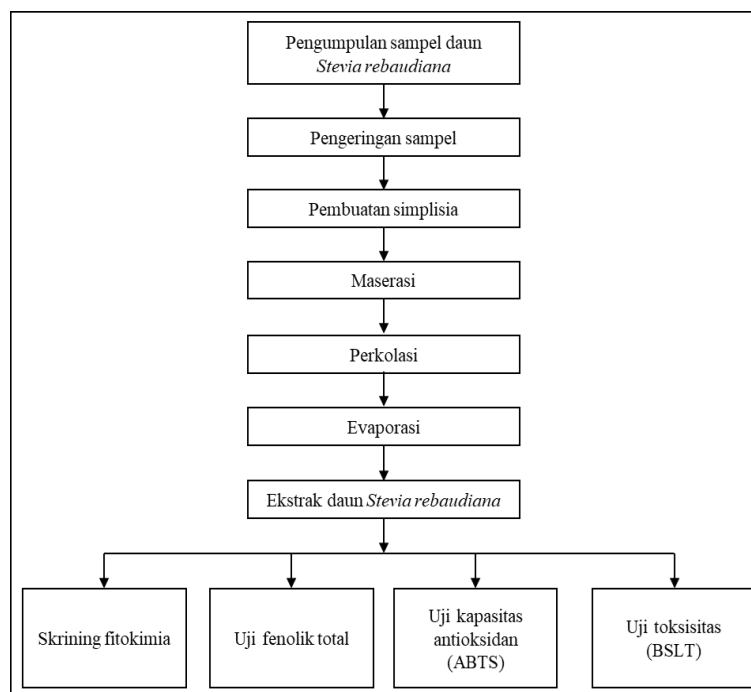


Gambar 1. Daun *Stevia rebaudiana* Kering sebagai Sampel Uji

Ekstraksi Daun Stevia rebaudiana

Daun *Stevia rebaudiana* dikeringkan pada suhu ruang terhindar dari cahaya matahari. Daun stevia kering lalu dihaluskan dengan blender hingga didapatkan simplisia. Maserasi dilakukan dengan melarutkan 50 gram simplisia daun stevia dengan 100 mL metanol hingga merata. Kemudian, ekstrak dipindahkan ke dalam tabung perkolator dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu, hasil perkolasi ditampung dengan kecepatan 1 mL/menit dengan penambahan metanol secara berkala untuk mencegah ekstrak menjadi kering. Hasil perkolasi kemudian dievaporasi sehingga didapatkan ekstrak daun stevia untuk uji lanjutan (Fauziah *et*

al., 2021; Usman *et al.*, 2022). Adapun alur pembuatan ekstrak dan analisis biokimia disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Alur Pembuatan Ekstrak dan Analisis Biokimia Ekstrak Daun *Stevia rebaudiana*

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia pada daun stevia dilakukan secara kualitatif untuk melihat ada tidaknya kandungan flavonoid, saponin, kuinon, kumarin, fenolik, tanin, dan terpenoid (Dauda *et al.*, 2020; Dhurhanian & Novianto, 2019; Rajkumar *et al.*, 2022; Rao *et al.*, 2016). Uji flavonoid dilakukan dengan mencampurkan 3 mL ekstrak stevia dengan 4 mL NaOH 1N; hasil positif apabila terbentuk warna kuning gelap. Uji saponin dilakukan dengan menambahkan 2 mL akuades panas ke dalam ekstrak stevia, kemudian dicampurkan setelah dingin; hasil positif apabila terbentuk busa. Penentuan kandungan kuinon dilakukan dengan menambahkan H₂SO₄ pada ekstrak stevia; hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah. Untuk uji kumarin, NaOH ditetaskan pada kertas saring dan dikeringkan, lalu ditetaskan dengan ekstrak stevia. Hasil positif terhadap kumarin ditandai dengan fluoresensi berwarna kekuningan di bawah sinar UV (Firdouse & Alam, 2011). Uji tanin dilakukan dengan meneteskan FeCl₃ 5% ke dalam ekstrak daun stevia; ekstrak mengandung tanin jika ada perubahan warna menjadi hijau kehitaman. Terakhir, uji kandungan senyawa terpenoid dilakukan dengan metode Liebermann-Burchard cara mencampurkan ekstrak daun stevia, kloroform, dan H₂SO₄. Ekstrak stevia mengandung senyawa terpenoid apabila terjadi perubahan warna menjadi coklat kemerahan (Babini & Reena, 2023). Skrining fenolik dilakukan dengan melarutkan 1 mL ekstrak stevia dalam 2 mL akuades, lalu ditambahkan dengan 0.5 mL Na₂CO₃ dan 0.5 mL reagen Folin-Ciocalteu. Ekstrak stevia memiliki kandungan fenolik apabila terbentuk warna biru atau hijau.



Uji Kadar Fenolik Total

Penentuan kadar fenolik total mengacu pada metode Singleton & Rossi dengan modifikasi (Dhurhanian & Novianto, 2019). Secara singkat, ekstrak stevia dilarutkan dengan metanol hingga homogen. Kemudian, reagen Folin-Ciocalteu ditambahkan ke dalam campuran ekstrak stevia dan diinkubasi selama 8 menit dalam keadaan gelap. Selanjutnya, Na_2CO_3 ditambahkan dan diinkubasi kembali selama 2 jam untuk kemudian dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm. Kandungan fenolik total yang diperoleh kemudian dikonversi ke dalam mg GAE/g DW dengan rumus berikut (Fadly *et al.*, 2020):

$$\text{mg GAE/g} = \text{Kadar fenolik (mg/mL)} \times \frac{\text{Volume pelarut (mL)}}{\text{Massa ekstrak (g)}}$$

Penentuan konsentrasi fenolik dilakukan berdasarkan kurva standar asam galat dengan konsentrasi 200, 300, 400, 500, 600, dan 700 $\mu\text{g/mL}$. Asam galat digunakan karena memiliki struktur fenol yang dapat berperan sebagai antioksidan, serta stabil dalam bentuk kering (Bastola *et al.*, 2017; Junaidi & Anwar, 2018).

Penentuan Kapasitas Antioksidan (ABTS)

Penentuan kapasitas antioksidan ekstrak stevia dilakukan dengan metode ABTS (Setiawan *et al.*, 2018). Pembuatan larutan kontrol dilakukan dengan pencampuran ABTS dengan kalium persulfat yang masing-masing telah dilarutkan dalam etanol selama 12 jam dalam keadaan gelap sebelumnya. Setelah pencampuran, larutan kontrol kembali ditambahkan dengan etanol dan diinkubasi selama 6 menit untuk dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm. Absorbansi yang didapatkan kemudian dijadikan sebagai absorbansi kontrol.

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan pada ekstrak stevia dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak stevia kemudian dicampurkan dengan larutan ABTS (perbandingan 1:1) dan dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm. Sebagai pembanding, analisis aktivitas antioksidan terhadap larutan Trolox® juga dilakukan dengan konsentrasi yang sama dengan ekstrak stevia. Persentase inhibisi radikal bebas dikalkulasi dengan rumus:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Nilai IC_{50} (*inhibitory concentration 50*) merepresentasikan konsentrasi senyawa atau bahan uji untuk menginhibisi 50% radikal bebas, yang dalam uji ini merupakan ABTS. IC_{50} ditentukan melalui persamaan linear dari kurva antara %inhibisi terhadap konsentrasi senyawa. Semakin rendah nilai IC_{50} maka semakin tinggi kapasitas antioksidan suatu senyawa (Garcia-Molina *et al.*, 2022).

Uji Toksisitas Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Uji sitotoksisitas ekstrak daun stevia dilakukan dengan metode *bioassay* BSLT menggunakan larva *Artemia salina*, dengan konsentrasi ekstrak sebesar 2500, 3000, 3500, dan 4000 $\mu\text{g/mL}$ (Nofita *et al.*, 2021). Ekstrak stevia yang telah dicampurkan dengan DMSO, ragi, dan air laut kemudian dimasukkan ke dalam

tabung berisi 10 ekor larva hidup dan diinkubasi selama 24 jam di bawah sinar lampu. Persentase mortalitas dihitung dengan rumus (Kurniawan & Ropiqa, 2021):

$$\%Mortalitas = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva hidup dan mati}} \times 100\%$$




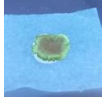


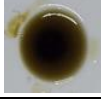
Nilai LC_{50} (*lethal concentration 50*) menunjukkan konsentrasi senyawa yang menyebabkan kematian pada 50% larva *A. salina*; yang kemudian ditentukan berdasarkan persamaan linear dari kurva antara %mortalitas terhadap log konsentrasi senyawa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Stevia rebaudiana

Meskipun telah banyak digunakan sebagai alternatif pengganti gula tebu, pemanfaatan ekstrak daun *Stevia rebaudiana* sebagai suplemen antioksidan masih cukup terbatas (Mlambo *et al.*, 2022). Untuk mengidentifikasi kandungan *crude extract* daun *Stevia rebaudiana*, skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak stevia. *Crude extract* daun stevia diperoleh melalui maserasi dan perkolasi sederhana dengan rendemen sebesar 46.24%. Hasil skrining secara kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak stevia mengandung flavonoid, saponin, kuinon, kumarin, fenolik, tanin, dan terpenoid sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Skrining Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun *Stevia rebaudiana*

| Kandungan Fitokimia | Interpretasi | Hasil |
|---------------------|---------------------------------|---|
| Flavonoid | Kuning gelap (Positif) |  |
| Saponin | Busa (Positif) |  |
| Kuinon | Merah (Positif) |  |
| Kumarin | Fluoresensi kuning (Positif) |  |
| Fenolik | Hijau gelap (Positif) |  |
| Tanin | Hijau kehitaman (Positif) |  |
| Terpenoid | Cokelat (Positif) |  |



Sejalan dengan penelitian lain, ekstrak daun *Stevia rebaudiana* mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder masing-masing memiliki manfaat kesehatan (Faramayuda *et al.*, 2022; Siddique *et al.*, 2014). Flavonoid sendiri terbukti memiliki aktivitas anti-inflamasi, antidiabetes, kardio- dan neuro-protektif, serta memperlambat proses penuaan (Dias *et al.*, 2021). Saponin memiliki efek imunomodulator, anti-inflamasi, dan antitumor (Yang *et al.*, 2021). Sedangkan tanin dan terpenoid banyak dimanfaatkan sebagai alternatif obat dikarenakan aktivitas antivirus dan antiparasit yang dimilikinya (Tong *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2020). Pada studi ini juga ditemukan untuk pertama kalinya bahwa ekstrak stevia mengandung kuinon dan kumarin, dimana keduanya memiliki aktivitas farmakologi yang luas, seperti antibakteri, antikanker, antimalaria, antimikroba, anti-inflamasi, dan antitumor (Junior *et al.*, 2022; Stasi, 2023).

Berdasarkan hasil uji tersebut dapat diketahui bahwa perbedaan kandungan fitokimia dalam ekstrak stevia dapat terjadi dikarenakan berbagai faktor. Dari segi bahan uji yang digunakan, aspek geografis asal tanaman dapat mempengaruhi kandungan dan nutrisi dalam daun stevia, sehingga perbedaan lokasi kultivasi ini dapat menghasilkan jenis dan jumlah senyawa metabolit sekunder yang beragam (Das *et al.*, 2022). Dengan demikian, melihat banyaknya kandungan fitokimia pada ekstrak daun *Stevia rebaudiana*, ekstrak stevia ini memiliki potensi yang jauh lebih luas untuk dimanfaatkan sebagai suplemen atau obat.

Fenolik Total Ekstrak Daun Stevia rebaudiana

Kadar fenolik total diukur setelah diketahui ekstrak stevia mengandung senyawa fenolik. Fenolik merupakan metabolit sekunder yang terdiri dari cincin benzena dengan substituen hidroksil, yang mampu berperan sebagai antioksidan (Kristanti, 2008). Pada uji fenolik total, didapatkan kurva standar dari konsentrasi asam galat dengan persamaan $y=0.0009x+0.0053$, sehingga diperoleh kandungan fenolik ekstrak stevia sebesar $2589.1 \pm 34.21 \mu\text{g/mL}$ atau setara dengan $86.30 \pm 1.14 \text{ mg GAE/g DW}$. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menemukan bahwa daun stevia mengandung kadar fenolik yang bervariasi, yakni 26.29 hingga 98.99 mg GAE/g DW (Ali *et al.*, 2022; Covarrubias-Cárdenas *et al.*, 2018). Dengan kandungan fenolik lebih besar dari 1 mg GAE/g DW (Vasco *et al.*, 2008), maka dapat dikatakan bahwa ekstrak daun stevia memiliki kandungan fenolik yang tergolong tinggi. Senyawa fenolik ini memiliki berbagai manfaat, seperti proteksi terhadap kanker, penyakit kardiovaskular, diabetes, osteoporosis, dan kelainan neurologis (Rahman *et al.*, 2021).

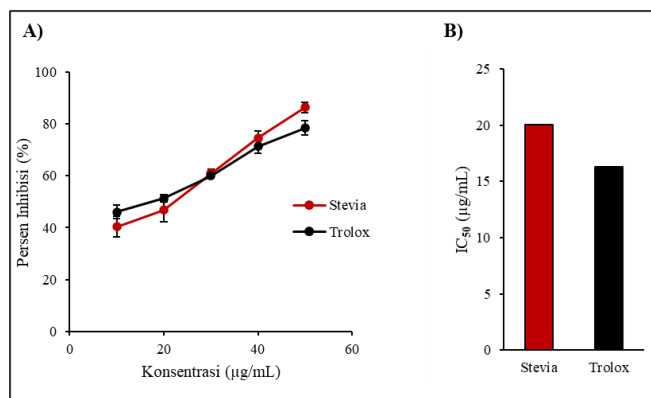
Kapasitas Antioksidan Ekstrak Daun Stevia rebaudiana

Berdasarkan hasil pengukuran kadar fenolik yang cukup tinggi, selanjutnya kapasitas antioksidan ekstrak stevia diukur melalui metode ABTS, dengan melihat kemampuan ekstrak dalam menghambat reaksi oksidasi ABTS sebagai senyawa radikal bebas (*free radical scavenging*). Berdasarkan hasil absorbansi yang ada, diperoleh persamaan garis $y=1.198x+25.89$ untuk uji terhadap ekstrak stevia dan persamaan garis $y=0.8502x+35.97$ untuk uji terhadap Trolox. Dari persamaan tersebut, didapatkan nilai %inhibisi bahan uji terhadap senyawa ABTS dalam konsentrasi bahan uji yang telah ditentukan sebagaimana disajikan di Tabel 2.

Tabel 2. Kapasitas Antioksidan Ekstrak Daun Stevia dan Trolox

| Konsentrasi (µg/mL) | Ekstrak stevia | | Trolox | |
|---------------------|----------------|--------------------------|------------|--------------------------|
| | %Inhibisi | IC ₅₀ (µg/mL) | %Inhibisi | IC ₅₀ (µg/mL) |
| 10 | 40.53±4.02 | | 46.05±2.63 | |
| 20 | 46.87±4.53 | | 51.32±1.32 | |
| 30 | 60.96±1.52 | 20.13 | 60.09±0.76 | 16.50 |
| 40 | 74.56±2.74 | | 71.42±2.66 | |
| 50 | 86.40±2.01 | | 78.51±2.74 | |

Konsentrasi IC₅₀ dan kapasitas antioksidan memiliki nilai yang berbanding terbalik. Dari persamaan sebelumnya, diperoleh nilai IC₅₀ ekstrak stevia sebesar 20.13 µg/mL, sedikit lebih tinggi dibandingkan Trolox dengan IC₅₀ sebesar 16.50 µg/mL sebagaimana disajikan pada Gambar 3. Nilai IC₅₀ ekstrak stevia yang diperoleh pada studi ini sedikit lebih rendah dibandingkan dengan studi lainnya yang bervariasi dari 26.78 µg/mL hingga 86.16 µg/mL. Sedangkan untuk Trolox, nilai IC₅₀ pada studi ini sesuai dengan literatur lain yang berkisar antara 12.55 µg/mL hingga 63.69 µg/mL (Matuszewska *et al.*, 2018; Musdalipah *et al.*, 2021; Wangswat *et al.*, 2021).



Gambar 3. Kapasitas Antioksidan Ekstrak Stevia dan Trolox dalam Inhibisi Radikal Bebas ABTS: (A) Kurva Hubungan Persen Inhibisi terhadap Konsentrasi dan (B) Konsentrasi IC₅₀ Ekstrak Daun Stevia dan Trolox dengan uji ABTS.

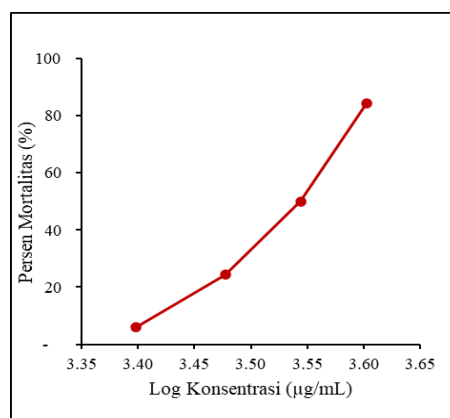
Perbedaan sumber bahan uji yang diperoleh dapat mempengaruhi jenis dan konten senyawa metabolit yang terkandung dalam daun stevia (Das *et al.*, 2022). Dari segi perolehan ekstrak, metode pengeringan, ekstraksi, dan jenis pelarut yang digunakan juga dapat mempengaruhi komposisi kimia, antioksidan, bahkan aktivitas antimikrobal dari ekstrak daun stevia (Özyiğit *et al.*, 2023). Selain metode ABTS, terdapat berbagai jenis metode pengukuran kapasitas antioksidan yang tersedia, seperti DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) sebagai alternatif ABTS, yang dapat menghasilkan nilai IC₅₀ bervariasi (Özyiğit *et al.*, 2023).

Senyawa dengan nilai IC₅₀ <50 µg/mL dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat (Kusumawati *et al.*, 2021); dengan demikian, ekstrak stevia dapat dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat. Trolox sendiri merupakan

antioksidan poten yang disintesis dari vitamin E sehingga digunakan sebagai kontrol positif (Kusumorini *et al.*, 2022). Dengan IC_{50} yang tidak berbeda jauh dari Trolox, kapasitas antioksidan ekstrak stevia dapat dikatakan cukup poten dan mampu bersaing dengan suplemen antioksidan yang ada, walaupun dibutuhkan studi lanjut untuk melihat mekanisme kinerja ekstrak stevia secara lebih detail. Selain itu, ekstrak stevia bersifat alami dengan berbagai kandungan senyawa metabolit yang memiliki potensi untuk kesehatan lebih luas.

Uji Toksisitas Ekstrak Daun Stevia rebaudiana

Metode *bioassay* BSLT digunakan untuk mengetahui potensi sitotoksitas ekstrak metanol daun stevia terhadap hewan uji, yaitu larva udang *Artemia salina*, yang ditentukan melalui jumlah larva yang mati. Metode ini banyak digunakan sebagai uji toksisitas awal karena sederhana dan cepat (Kurniawan & Ropiqa, 2021). Pada konsentrasi rendah, ekstrak stevia tidak dapat menyebabkan kematian pada larva *A. salina* (0% mortalitas). Sedangkan pada konsentrasi ekstrak stevia yang cukup besar, yakni 2500 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak stevia baru dapat menyebabkan kematian dalam jumlah kecil (5% mortalitas) (Gambar 4).



Gambar 4. Tingkat Mortalitas Ekstrak Daun Stevia dengan uji *Brine Shrimp Lethality Test* dalam Berbagai Konsentrasi Uji.

Berdasarkan persentase mortalitas dan log konsentrasi, didapatkan persamaan garis $y=378.17x-1284.5$ untuk penentuan nilai LC_{50} . Dari persamaan tersebut, LC_{50} untuk ekstrak stevia diperoleh sebesar 3388.44 $\mu\text{g/mL}$ sebagaimana disajikan pada Tabel 3. Dikarenakan nilai LC_{50} melebihi 1000 $\mu\text{g/mL}$, maka ekstrak stevia ini dikategorikan bersifat non-toksik (Surya *et al.*, 2022) dan tidak memiliki aktivitas antimetabolik dan sitotoksik (F. Fauziah *et al.*, 2021).

Tabel 3. Toksisitas Ekstrak Daun Stevia terhadap Larva *Artemia salina*

| Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) | %Mortalitas | LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|----------------------------------|-------------|--------------------------------|
| 2500 | 5.88 | |
| 3000 | 24.39 | |
| 3500 | 50.00 | 3388.44 |
| 4000 | 84.21 | |



Pada studi lain, ekstrak stevia dengan beberapa jenis pelarut menghasilkan nilai LC_{50} yang bervariasi. Pada fraksi kloroform atau heksana, ekstrak stevia memiliki LC_{50} 700 $\mu\text{g/mL}$ hingga 882 $\mu\text{g/mL}$, sehingga memiliki tingkat toksisitas moderat. Sedangkan pada fraksi air, tingkat toksisitas ekstrak stevia sangat rendah dengan LC_{50} sebesar 3391 $\mu\text{g/mL}$. Terlepas dari tingkat toksisitas yang rendah, ekstrak stevia dalam fraksi air memiliki kapasitas antioksidan yang juga rendah, dengan nilai IC_{50} 641 $\mu\text{g/mL}$ (Nuryandani et al., 2024). Dengan demikian, ekstrak stevia dalam metanol pada penelitian ini memiliki kombinasi hasil yang cukup memuaskan, yakni memiliki kandungan fenolik dan kapasitas antioksidan yang sangat tinggi dengan tingkat toksisitas yang sangat rendah.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun *Stevia rebaudiana* memiliki kandungan fitokimia yang besar dengan berbagai manfaat yang masih dapat dieksplorasi. Terlebih lagi, kapasitas antioksidan ekstrak stevia sangat tinggi dengan aktivitas yang hampir sama dengan Trolox, analog vitamin E. Uji awal keamanan ekstrak stevia menunjukkan bahwa ekstrak ini bersifat non-toksik sehingga dapat dikatakan cukup aman. Akhir kata, studi ini menyimpulkan potensi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* sebagai suplemen antioksidan alamiah.

SARAN

Walaupun selama ini daun *Stevia rebaudiana* banyak diaplikasikan sebagai alternatif pengganti gula pasir bagi penderita diabetes, pemanfaatan ekstrak daun stevia masih dapat dieksplorasi lebih luas, seperti sebagai suplemen antioksidan. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai formulasi konsentrasi sediaan, efek toksisitas, serta potensi antioksidan daun stevia secara *in vivo* untuk mengetahui lebih lanjut mekanisme kerja ekstrak stevia dalam tubuh, serta efek jangka panjang yang mungkin dapat timbul.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Staf Laboratorium Tarumanagara Human Cell Technology dan Ibu Eny Yulianti sebagai bagian Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Tarumanagara atas bantuannya selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A., Shahu, R., Balyan, P., Kumari, S., Ghodmare, R., Jobby, R., & Jha, P. (2022). Antioxidation and Antiglycation Properties of a Natural Sweetener: *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech*, 24(2), 563–575. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-01023-0>
- Andarina, R., & Djauhari, T. (2017). Antioksidan dalam dermatologi. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, 4(1), 39–48.
- Babini, C. K., & Reena, A. (2023). Comparative Analysis of Phytochemical and Antioxidative Properties of Different Solvent Extracts of *Codium tomentosum* Stackhouse for Therapeutic Application. *Journal of Drug Delivery and*



- Therapeutics*, 13(8), 72–80. <https://doi.org/10.22270/jddt.v13i8.6169>
- Bastola, K. P., Guragain, Y. N., Bhadriraju, V., & Vadlani, P. V. (2017). Evaluation of Standards and Interfering Compounds in the Determination of Phenolics by Folin-Ciocalteu Assay Method for Effective Bioprocessing of Biomass. *American Journal of Analytical Chemistry*, 08(06), 416–431. <https://doi.org/10.4236/ajac.2017.86032>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Checa, J., & Aran, J. M. (2020). Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *Journal of Inflammation Research*, 13, 1057–1073. <https://doi.org/10.2147/JIR.S275595>
- Covarrubias-Cárdenas, A. G., Martínez-Castillo, J. I., Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., García-Cruz, N. U., & Pacheco, N. (2018). Antioxidant Capacity and UPLC-PDA ESI-MS Phenolic Profile of Stevia rebaudiana Dry Powder Extracts Obtained by Ultrasound Assisted Extraction. *Agronomy*, 8(9), 170. <https://doi.org/10.3390/agronomy8090170>
- Dahlem Junior, M. A., Nguema Edzang, R. W., Catto, A. L., & Raimundo, J.-M. (2022). Quinones as an Efficient Molecular Scaffold in the Antibacterial/Antifungal or Antitumoral Arsenal. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14108. <https://doi.org/10.3390/ijms232214108>
- Das, K., Mohammed Basheeruddin Asdaq, S., Saifulla Khan, M., Singirikonda, S., S. Alamri, A., F. Alsanie, W., Alhomrani, M., Nagaraja, S., & N. Venugopala, K. (2022). Phytochemical Analysis, Estimation of Quercetin, and in Vitro Anti-Diabetic Potential of Stevia Leaves Samples Procured from Two Geographical Origins. *Phyton*, 91(10), 2349–2365. <https://doi.org/10.32604/phyton.2022.022379>
- Dauda, H., Uba, G., & Ali, U. (2020). Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Analysis of Flavonoids from the Stem Bark Extract of Commiphora africana (Burseraceae). *Bulletin of Environmental Science and Sustainable Management*, 4(1), 25–27. <https://doi.org/10.54987/bessm.v4i1.529>
- Dhurhania, C. E., & Novianto, A. (2019). Uji Kandungan Fenolik Total dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Bentuk Sediaan Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*). *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 5(2), 62. <https://doi.org/10.20473/jfiki.v5i22018.62-68>
- Di Stasi, L. C. (2023). Natural Coumarin Derivatives Activating Nrf2 Signaling Pathway as Lead Compounds for the Design and Synthesis of Intestinal Anti-Inflammatory Drugs. *Pharmaceuticals*, 16(4), 511. <https://doi.org/10.3390/ph16040511>
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17), 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- Fadly, D., Purwayantie, S., & Arundhana, A. I. (2020). Total Phenolic Content, Antioxidant Activity and Glycemic Values of Non-Meat Burger Patties. *Canrea Journal: Food Technology, Nutritions, and Culinary Journal*, 1–9.



<https://doi.org/10.20956/canrea.v3i1.246>

- Faramayuda, F., Oktavianus, R., & Elfahmi, E. (2022). Stevia rebaudiana: Phytochemical, Pharmacological Activities, and Plant Tissue Culture. *Jurnal Natural*, 22(3), 198–208. <https://doi.org/10.24815/jn.v22i3.19477>
- Fauziah, A., Sudirga, S. K., & Parwanayoni, N. M. S. (2021). Uji Antioksidan Ekstrak Daun Tanaman Leunca (*Solanum nigrum* L.). *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 8(1), 28. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2021.v08.i01.p03>
- Fauziah, F., Maulinasari, Harnelly, E., Ismail, Y. S., & Fitri, L. (2021). Toxicity test of rose periwinkle (*Catharanthus roseus*) leaves endophytic bacteria using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(1). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230122>
- Firdouse, S., & Parwez Alam. (2011). Phytochemical Investigation of Extract of *Amorphophallus campanulatus* Tubers. *International Journal of Phytomedicine*, 3, 32–35.
- Garcia-Molina, P., Garcia-Molina, F., Teruel-Puche, J. A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canovas, F., & Muñoz-Muñoz, J. L. (2022). The Relationship between the IC50 Values and the Apparent Inhibition Constant in the Study of Inhibitors of Tyrosinase Diphenolase Activity Helps Confirm the Mechanism of Inhibition. *Molecules*, 27(10), 3141. <https://doi.org/10.3390/molecules27103141>
- IQAir. (2023). World Air Quality Report 2023. In *IQAir*.
- Junaidi, E., & Anwar, Y. A. S. (2018). Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Asam Galat dari Kulit Buah Lokal yang Diproduksi dengan Tanase. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 14(1), 131. <https://doi.org/10.20961/alchemy.14.1.11300.131-142>
- Klančnik, A., Guzej, B., Kolar, M. H., Abramovič, H., & Možina, S. S. (2009). In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Commercial Rosemary Extract Formulations. *Journal of Food Protection*, 72(8), 1744–1752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1744>
- Kristanti, A. N. (2008). *Buku Ajar Fitokimia* (1st ed.). Airlangga University Press.
- Kurniawan, H., & Ropiqa, M. (2021). Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Ekor Kucing (*Acalypha hispida* Burm.f.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 3(2), 52–62. <https://doi.org/10.37311/jsscr.v3i2.11398>
- Kusumawati, A. H., Farhamzah, F., Alkandahri, M. Y., Sadino, A., Agustina, L. S., & Apriana, S. D. (2021). Antioxidant Activity and Sun Protection Factor of Black Glutinous Rice (*Oryza sativa* var. *glutinosa*). *Tropical Journal of Natural Product Research*, 5(11), 1958–1961. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v5i11.11>
- Kusumorini, N., Nugroho, A. K., Pramono, S., & Martien, R. (2022). Determination of The Potential Antioxidant Activity of Isolated Piperine from White Pepper Using DPPH, ABTS, and FRAP Methods. *Majalah Farmaseutik*, 18(4), 454. <https://doi.org/10.22146/farmaseutik.v18i4.70246>
- Matuszewski, A., Jaszek, M., Stefaniuk, D., Ciszewski, T., & Matuszewski, Ł. (2018). Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular



- weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor*. *PLOS ONE*, 13(6), e0197044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197044>
- Mendonça, J. da S., Guimarães, R. de C. A., Zorgetto-Pinheiro, V. A., Fernandes, C. D. Pietro, Marcelino, G., Bogo, D., Freitas, K. de C., Hiane, P. A., de Pádua Melo, E. S., Vilela, M. L. B., & Nascimento, V. A. do. (2022). Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. *Molecules*, 27(11), 3563. <https://doi.org/10.3390/molecules27113563>
- Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130(4), 986–993. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.117>
- Mlambo, R., Wang, J., & Chen, C. (2022). Stevia rebaudiana, a Versatile Food Ingredient: The Chemical Composition and Medicinal Properties. *Journal of Nanomaterials*, 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/3573005>
- Musdalipah, Karmilah, Tee, S. A., Yodha, A. W. M., Sahidin, I., & Fristiohady, A. (2021). In vitro antioxidant assay and qualitative phytochemical estimation of *Meistera chinensis* from Southeast Sulawesi. *Journal of Physics: Conference Series*, 1763(1), 012093. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1763/1/012093>
- Nofita, N., Maria Ulfa, A., & Delima, M. (2021). Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji Australia (*Psidium guajava* L) dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). *JFL: Jurnal Farmasi Lampung*, 9(1), 10–17. <https://doi.org/10.37090/jfl.v9i1.326>
- Nuryandani, E., Kurnianto, D., Jasmadi, J., Sefrienda, A. R., Novitasari, E., Apriyati, E., Wanita, Y. P., Indrasari, S. D., Sunaryanto, R., Tjokrokusumo, D., Yani, A., Suryaningtyas, I. T., & Andriana, Y. (2024). Phytotoxic and Cytotoxic Effects, Antioxidant Potentials, and Phytochemical Constituents of *Stevia rebaudiana* Leaves. *Scientifica*, 2024(1). <https://doi.org/10.1155/2024/2200993>
- Oehme, A., Wüst, M., & Wölwer-Rieck, U. (2017). Steviol glycosides are not altered during commercial extraction and purification processes. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(10), 2156–2162. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13494>
- Özyiğit, Y., Uçar, E., Eruygur, N., Ataş, M., İnanir, M., Bal, H., Kahrizi, D., & Turgut, K. (2023). Comparison of Different Drying Methods for Phytochemical Quality of *Stevia (Stevia rebaudiana Bert.)*. *Notulae Scientia Biologicae*, 15(3), 11527. <https://doi.org/10.55779/nsb15311527>
- Rahman, M. M., Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., Almikhlaifi, M. A., Alghamdi, S. Q., Alruwaili, A. S., Hossain, M. S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. Bin, & Uddin, M. S. (2021). Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules*, 27(1), 233. <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>
- Rajkumar, G., Panambara, P. A. H. R., & Sanmugarajah, V. (2022). Comparative Analysis of Qualitative and Quantitative Phytochemical Evaluation of Selected Leaves of Medicinal Plants in Jaffna, Sri Lanka. *Borneo Journal of Pharmacy*, 5(2), 93–103. <https://doi.org/10.33084/bjop.v5i2.3091>



- Ramesh, K., Singh, V., & Megeji, N. W. (2006). Cultivation of Stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A Comprehensive Review. *Advances in Agronomy*, 89, 137–177. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)89003-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)89003-0)
- Rao, U. M., Abdurrazak, M., & Mohd, K. S. (2016). Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Phenolic Content Assays of Various Solvent Extracts of Tepal of *Musa paradisiaca*. *Malaysian Journal of Analytical Science*, 20(5), 1181–1190. <https://doi.org/10.17576/mjas-2016-2005-25>
- Reddy, V. P. (2023). Oxidative Stress in Health and Disease. *Biomedicines*, 11(11), 2925. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112925>
- Sathisha, A. D., Lingaraju, H. B., & Prasad, K. S. (2011). Evaluation of Antioxidant Activity of Medicinal Plant Extracts Produced for Commercial Purpose. *E-Journal of Chemistry*, 8(2), 882–886. <https://doi.org/10.1155/2011/693417>
- Setiawan, F., Yunita, O., & Kurniawan, A. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan*) Menggunakan Metode DPPH, ABTS, dan FRAP. *Media Pharmaceutica Indonesiana*, 2(2), 82–89.
- Siddique, A. B., Rahman, S. M. M., Hossain, M. A., Hossain, M. A., & Rashid, M. A. (2014). Phytochemical Screening and Comparative Antimicrobial Potential of Different Extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(4), 275–280. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60572-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60572-7)
- Surya, S., Pringgenies, D., Setyati, W. A., & Bahry, M. S. (2022). Investigation of leaves of *Xylocarpus granatum* as a larvicide agent against *Aedes aegypti* and its associated anti-bacterial properties. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 15(1), 635–640. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.15.1.0709>
- Tanaka, O. (1982). Steviol-glycosides: New natural sweeteners. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1(11), 246–248. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(82\)80079-4](https://doi.org/10.1016/0165-9936(82)80079-4)
- Tong, Z., He, W., Fan, X., & Guo, A. (2022). Biological Function of Plant Tannin and Its Application in Animal Health. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.803657>
- Usman, U., Fildzania, D., & Fauzi, I. (2022). Uji Aktivitas Antioksidan dan Antidiabetes Ekstrak Daun Mangrove *Rhizophora mucronata*. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 4(1), 28–35. <https://doi.org/10.25026/jsk.v4i1.724>
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total Phenolic Compounds and Antioxidant Capacities of Major Fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111(4), 816–823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.054>
- Wangsawat, N., Nahar, L., Sarker, S. D., Phosri, C., Evans, A. R., Whalley, A. J. S., Choowongkamon, K., & Suwannasai, N. (2021). Antioxidant Activity and Cytotoxicity against Cancer Cell Lines of the Extracts from Novel *Xylaria* Species Associated with Termite Nests and LC-MS Analysis. *Antioxidants*, 10(10), 1557. <https://doi.org/10.3390/antiox10101557>
- Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., & Yu, X. (2020). Advances in Pharmacological Activities of Terpenoids. *Natural Product Communications*, 15(3), 1934578X2090355. <https://doi.org/10.1177/1934578X20903555>
- Yang, Y., Laval, S., & Yu, B. (2021). *Chemical Synthesis of Saponins*. 63–150. <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2021.10.001>