

Penentuan Total Kadar Fenol dari Daun Kersen Segar, Kering dan Rontok (*Muntingia calabura L.*) serta Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Jaka Dwi Pamungkas^a, Khairul Anam^{a*}, Dewi Kusriani^a

^a Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang

* Corresponding author: k.anam@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords: Muntingia Calabura L, total phenol content, DPPH</p>	<p>Research on the determination of chemical compound content, total phenol content of fresh, dried, and fallen Cherry leaf (<i>Muntingia calabura L.</i>) and antioxidant activity test (IC_{50}) were performed. The method used in this research was the determination of total phenol content with Folin-Ciocalteu method and antioxidant activity test by DPPH method. This research consisted of three stages. The first stage was the extraction to get a the concentrated ethanol extract. The second stage was a qualitative analysis using TLC and phytochemical screening test. The last stage was a quantitative analysis, by calculating the total content of phenol and antioxidant test. The results showed that the yield obtained from fresh leaves was as much as 1.231%, the dry leaves were 0.772% and the falling leaves were 1.05%. The results of phytochemical screening test of cherry leaf are alkaloids, flavoloid, tannin, saponin, and steroid/terpenoid. The total content of phenols from fresh, dried and fallen cherry leaf extract were 6 mg equivalent of the gall/g sample acid, 14 mg equivalent of the gallic acid/g sample, and 12 mg equivalent of the gallic acid/g respectively. The antioxidant activity test on fresh, dried, and fallen cherry leaves were IC_{50} of -291187,5 mg/L -48958,9 mg/L and -235305,6 mg/L respectively.</p>
<p>Kata Kunci: Muntingia Calabura L, Total Kadar Fenol, DPPH</p>	<p>Abstrak</p> <p>Telah dilakukan penelitian tentang penentuan total kadar fenol dari daun kersen segar, kering, dan rontok (<i>Muntingia calabura L.</i>) serta uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi kandungan senyawa kimia, total kadar fenol, dan Aktivitas antioksidan (IC_{50}) dari daun kersen segar, kering, dan rontok. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah penentuan total kadar fenol dengan metode Folin-Ciocalteu dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Tahapan penelitian ini meliputi tiga tahap, tahap pertama yaitu ekstrasi untuk mendapatkan ekstrak etanol pekat. Tahap kedua analisis secara kuantitatif dengan menggunakan KLT serta uji skrining fitokimia. Tahap terakhir analisis secara kuantitatif yakni dengan menghitung kadar total fenol dan uji antioksidan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen yang didapat dari daun segar sebanyak 1,231%, daun kering sebanyak 0,772% dan daun rontok sebanyak 1,05%. Hasil uji skrining fitokimia kandungan dalam daun kersen adalah alkaloid, flavoloid, tanin, saponin, dan steroid/terpenoid. Kadar total fenol dari ekstrak daun kersen segar, kering dan rontok masing – masing 6 mg ekivalen asam galat/g sampel, 14 mg ekivalen asam galat/g sampel, dan 12 mg ekivalen asam galat/g sampel. Uji aktivitas antioksidan IC_{50} yang diperoleh dari daun kersen segar, kering, dan rontok masing – masing mengandung IC_{50} sebesar -291187,5 mg/L -48958,9 mg/L dan -235305,6 mg/L.</p>

1. Pendahuluan

Indonesia adalah merupakan negara yang sedang berkembang dalam berbagai bidang dimana mempunyai iklim tropis kaya akan sumber daya alam yang melimpah. Salah satu sumber daya alam adalah beraneka ragamnya jenis tumbuhan dimana banyak dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari oleh manusia sebagai jenis obat baik secara sintesis maupun obat tradisional yaitu jamu [1].

Salah satu tanaman yang sering dijumpai diperkebunan bahkan pada retakan tembok yakni tanaman kersen atau yang sering juga disebut dengan tanaman talok. Tanaman ini sering digunakan untuk obat penyakit asam urat, diabetes, serta sebagai anti bakteri [2]. Tanaman kersen ini mempunyai senyawa metabolit sekunder yakni flavonoid, saponin, tanin dan juga terpenoid [3].

Senyawa fenolik merupakan senyawa yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Senyawa ini telah diketahui strukturnya, antara lain flavonoid, fenol monosiklik sederhana, fenil propanoid, polifenol (lignin, melanin, tannin), dan kuinon fenolik [4]. Senyawa fenolik memiliki sifat farmakologi yaitu sebagai anti inflamasi [5], antioksidan [6], dan antibakteri [7].

Radikal bebas adalah senyawa kimia yang tidak stabil dan sangat reaktif yang dikarenakan mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Senyawa ini untuk mencapai kestabilan, maka bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron [8]. Reaksi ini akan berlangsung secara terus-menerus dalam tubuh hingga dapat merusak sel yang menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya [9].

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menjadi substansi untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi pembentukan radikal bebas [10, 11].

Berdasarkan hal diatas maka dilakukan penelitian penentuan total kadar fenol dari daun kersen segar, kering, dan rontok (*Muntingia calabura L.*) serta uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Metode untuk menentukan kadar total fenol menggunakan Folin-Ciocalteu dengan pembanding asam galat. Sedangkan pada pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode serapan radikal bebas DPPH.

2. Metode Penelitian

Preparasi sampel

Sampel daun kersen yang didapat yaitu berupa daun segar, kering, dan rontok. Dimana daun segar merupakan daun yang dipetik segar dari pohonnya, daun kering merupakan pembagian daun segar yang dikeringkan pada suhu ruang, sedangkan pada daun rontok merupakan daun yang jatuh dari pohon tersebut.

Uji Skrinning

Uji skrinning fitokimia terhadap daun kersen segar, kering, dan rontok untuk mengetahui kandungan senyawa kimianya, dimana meliputi uji : uji alkaloid, uji flavonoid, uji tanin, uji saponin, uji streoid, dan uji triterpen [12].

Uji Alkaloid

Sampel ekstrak pekat etanol daun kersen segar, kering, dan roktok masing-masing ditambahkan dengan kloroform 20 mL, disaring dan filtrat ditambahkan HCl 10%. Hasil ekstraksi akan terbentuk dua lapisan, kemudian lapisan HCl diambil ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 mL. Untuk tabung reaksi 1 ditambahkan pereaksi Dragendorff jika terbentuk endapan merah bata yang menunjukkan positif alkaloid, sedangkan untuk tabung reaksi 2 ditambahkan pereaksi Meyer jika terbentuk endapan putih yang menunjukkan positif alkaloid.

Uji Flavonoid

Sampel ekstrak pekat etanol daun kersen segar, kering, dan rontok yang akan diuji dididihkan terlebih dahulu dengan aquades diambil 5 mL kemudian ditambahkan potongan Mg, 1ml HCl pekat, dan 2 mL amil alkohol, dan dilakukan pengocokan. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

Uji Tanin

Sampel ekstrak pekat etanol daun kersen segar, kering, dan rontok yang akan diuji dididihkan terlebih dahulu dengan aquades diambil 5 mL kemudian ditambahkan $FeCl_3$ 1%. Jika terjadi perubahan warna coklat kehitaman maka menandakan tanin secara umum.

Uji Saponin

Sampel ekstrak pekat etanol daun kersen segar, kering, dan rontok yang akan diuji dididihkan terlebih dahulu dengan aquades diambil 5 mL, digojog dengan kuat. Jika busa yang terbentuk, kemudian ditambah HCl 1 tetes dengan masih adanya busa maka hal itu menunjukkan positif mengandung saponin.

Uji Steroid/Terpenoid

Sampel, ekstrak pekat etanol daun kersen segar, kering, dan rontok ditambahkan dengan pelarut eter yang kemudian dipisahkan. Filtrat yang didapat ditambahkan dengan 2 tetes anhidrat asam asetat dan 1 tetes H_2SO_4 . Adanya steroid terbentuk warna dari biru sampai ungu, sedangkan triterpen terbentuknya warna merah.

Pembuatan Ekstrak Etanol

Daun kersen sebanyak 6,6 kg. Masing – masing 4.1 kg daun segar, dimana 2,1 kg dikeringkan pada suhu ruang dan 2,4 kg daun rontok dihaluskan menjadi serbuk. Ekstrak etanol dibuat dengan mengekstraksi masing-masing daun kersen segar, kering, dan rontok dengan menggunakan metode maserasi. Maserasi

pertama yang dilakukan yaitu perendaman dengan menggunakan larutan n-heksana selama 3 x 24 jam sampai pelarut menjadi berwarna bening. Setelah itu dilakukan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ampas sampel yang akan digunakan pada tahap kedua dengan perendaman menggunakan etanol 96%. Dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak etanol.

Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat dengan Reagen Fenol Folin- Ciocalteu

Larutan asam galat (dalam metanol) dibuat dengan konsentrasi 300, 400, 500, 600, dan 700 mg/L. Dari masing-masing konsentrasi tersebut, dipipet 0,2 mL ditambahkan 15,8 mL akuades dan 1 mL reagen *Folin-Ciocalteu* lalu dikocok hingga homogen akan terbentuk larutan berwarna jernih kekuningan. Larutan didiamkan selama 8 menit, ditambahkan 3 mL larutan Na_2CO_3 20%, lalu dikocok hingga homogen. Larutan kembali didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar hingga terbentuk warna biru. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer *Vis* pada panjang gelombang 765 nm, lalu dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (mg/L) dengan absorbansi .

Penetapan Kandungan Fenol Total dengan Metoda Folin-Ciocalteu

Ekstrak etanol daun kersen segar, kering, dan rontok (dalam metanol) sebanyak 0,2 mL dari masing-masing larutan ekstrak ditambahkan dengan 15,8 mL akuades dan 1 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, dikocok hingga homogen. Setelah homogen akan terbentuk larutan berwarna jernih kekuningan. Larutan didiamkan selama 8 menit, selanjutnya ditambahkan 3 mL larutan Na_2CO_3 20% lalu dikocok hingga homogen. Larutan kembali didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar hingga terbentuk warna biru. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer *Vis* pada panjang gelombang 765 nm. Kadar fenol yang diperoleh merupakan mg ekuivalen asam galat/gram sampel [13].

Aktivitas Antioksidan (IC_{50})

Ekstrak sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol sampai 100 mL dalam labu ukur maka didapatkan konsentrasi 1 mg/mL. Dari larutan induk, dilakukan pengenceran dengan menambahkan metanol dengan perbandingan yang telah ditetapkan, sehingga diperoleh sampel dengan konsentrasi (100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$). Untuk penentuan aktivitas antioksidan masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,2 mL larutan sampel dengan pipet mikro dan masukan ke dalam vial, kemudian ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 50 μM . Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap, absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-*Vis* pada panjang gelombang 515 nm dengan perbandingan kuersetin.

3. Hasil dan Pembahasan

Preparasi Sampel dan Ekstrak Etanol

Daun kersen sebanyak 6,6 kg. Masing-masing 4.1 kg daun segar, dimana 2,1 kg dikeringkan pada suhu

ruang dan 2,4 kg daun rontok, kemudian dilakukan penyotiran untuk menghilangkan pengotor dan pemotongan pada ukuran kecil hingga serbuk. Ekstrak etanol pekat sebanyak 17,059 gram ekstrak daun segar, 25,89 gram ekstrak daun kering, dan 21,89 ekstrak daun rontok. Dimana rendeman hasil ekstrak etanol masing-masing adalah 1.231% daun segar, 0,772% daun kering, dan 1,05% daun rontok.

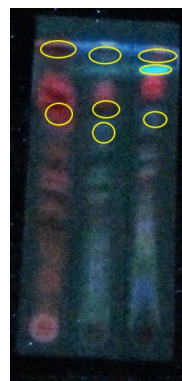
Skrinning Fitokimia dan KLT

Daun kersen segar, kering, dan rontok terdapat senyawa alkaloid, senyawa tanin, senyawa flavonoid, senyawa saponin, dan senyawa steroid/Terpenoid.

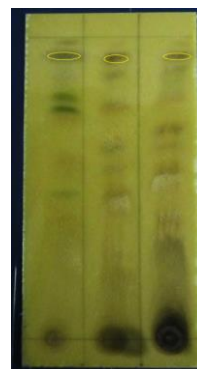
Tabel 1: Kandungan Senyawa

Uji	Daun Segar	Daun Kering	Daun Rontok
Alkaloid	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Tanin	+	+	+
Saponin	+	+	+
Steroid/ Terpenoid	+	+	+

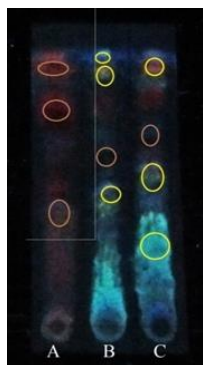
KLT dilakukan penampak bercak yang beragam serta untuk mengetahui senyawa kandungan dari tiap daun segar, kering, dan rontok dengan penampak bercak FeCl_3 , H_2SO_4 , dragendorff, liebermann burchard, uap Amoniak, AlCl_3 , dan menggunakan larutan DPPH. Keterangan A = daun segar, B = daun kering, C = daun rontok



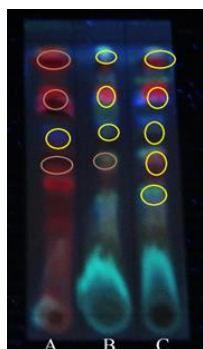
Gambar 1. KLT Ekstrak Daun Kersen Penampak Bercak H_2SO_4 dengan Eluen Kloroform Pada Silika GF_{254}



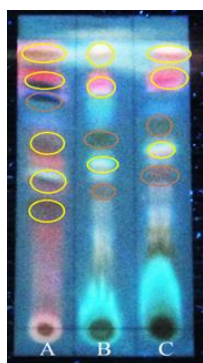
Gambar 2. KLT Ekstrak Daun Kersen Penampak Bercak FeCl_3 dengan Eluen Kloroform Pada Silika GF_{254}



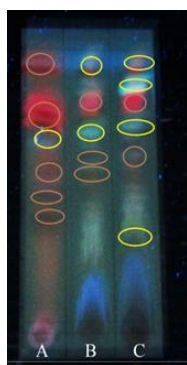
Gambar 3. KLT Ekstrak Daun Kersen Penampak Bercak $AlCl_3$ dengan Eluen Kloroform Pada Silika GF₂₅₄



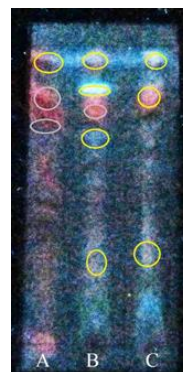
Gambar 4. KLT Ekstrak Daun Kersen Penampak Bercak Liebermann Burchard dengan Eluen Kloroform Pada Silika GF₂₅₄



Gambar 5. Ekstrak Daun Kersen Penampak Bercak Dragendorff dengan Eluen Kloroform Pada Silika GF₂₅₄



Gambar 6. KLT Ekstrak Daun Kersen Penampak Bercak Uap Amoniak dengan Eluen Kloroform Pada Silika GF₂₅₄



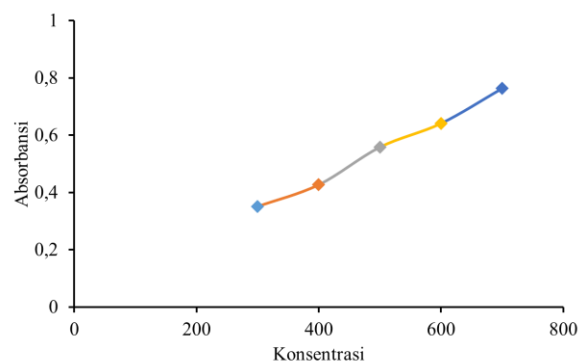
Gambar 7. KLT Ekstrak Daun Kersen Penampak Bercak DPPH dengan Eluen Kloroform Pada Silika GF₂₅₄

Kurva Kalibrasi Asam Galat

Kurva kalibrasi asam galat merupakan analisis kalibrasi spektrofotometer UV-Vis dengan menggunakan asam galat sebagai pembanding.

Tabel 2: Hasil Absorbansi Asam Galat

Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi
300	0,351
400	0,427
500	0,558
600	0,641
700	0,763



Gambar 8. Kurva Kalibrasi Asam Galat

Dari kurva kalibrasi tersebut didapatkan persamaan regresi $y = 0,001x + 0,029$ dan harga koefisien korelasi (R^2) yaitu 0,993. Persamaan regresi linier ini menyatakan hubungan matematis antara konsentrasi asam galat dan absorbansinya pada pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Harga koefisien korelasi (R^2) menyatakan hubungan / korelasi antara konsentrasi (sumbu x) dan absorbansi (sumbu y).

Persamaan regresi asam galat tersebut digunakan dalam penentuan total kadar fenol dengan memasukkan absorbansi yang didapat pada setiap sampel ke y dan akan didapatkan x sebagai mg/L kadar asam galat. Kadar asam galat tersebut (mg/L) digunakan untuk menghitung total kadar fenol yaitu banyaknya kadar asam galat (mg/L) per kadar sampel (g/L).

Penentuan Total Kadar Fenol

total kadar fenol bahwa hasil dari ekstrak daun segar mengandung fenol total sebesar 6 mg ekivalen asam galat/g sampel kering. Pada ekstrak daun kering mengandung fenol total sebesar 14 mg ekivalen asam galat/g sampel kering. Pada ekstrak daun rontok mengandung total fenol sebesar 12 mg ekivalen asam galat/g sampel kering.

Tabel 3: Hasil Kadar Fenol

Sampel	Absorbansi	Kadar Total Fenol (mg ekivalen asam galat/g sampel)
Segar	0,032	6
Kering	0,036	14
Rontok	0,035	12

Penentuan Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan persentase inhibisi. Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga *Inhibition Concentration* (IC₅₀) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan persentase penghambatan sebesar 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, memiliki harga IC₅₀ yang rendah.

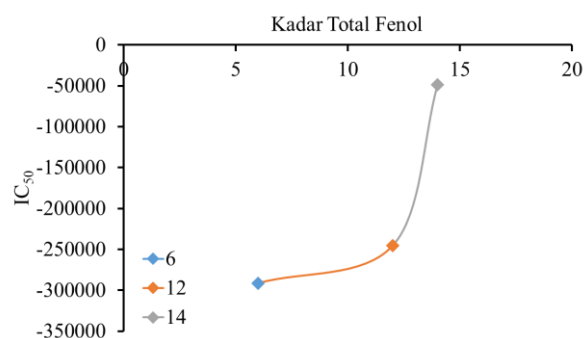
Tabel 4: Hasil IC₅₀

Sampel	IC ₅₀ (mg/L)
Kuersetin	-9423,8
Segar	-291187,5
Kering	-48958,9
Rontok	-245305,6

Hal tersebut menunjukkan bahwa memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah dari ekstrak daun kering. Ini disebabkan karena di dalam ekstrak daun segar dan ekstrak daun rontok meliputi senyawa non fenolik dan senyawa fenolik. Senyawa-senyawa tersebut mengakibatkan terjadi penurunan aktivitas antioksidan karena terdapat senyawa non fenolik yang tidak memiliki aktivitas antioksidan yang ditunjukkan pada harga IC₅₀ yang paling besar.

Hubungan Total Kadar Fenol dengan Aktivitas Antioksidan (IC₅₀)

Untuk mengetahui hubungan total kadar fenol dengan aktivitas antioksidan yang dinyatakan dalam IC₅₀ dilakukan dengan pembuatan kurva.



Gambar 9. Kurva total Kadar Fenol dengan Aktivitas Antioksidan (IC₅₀)

Nilai R² sama dengan 0,657 menunjukkan persamaan tersebut linier sehingga dapat diterima sebagai persamaan hubungan total fenol dengan IC₅₀. Hal ini membuktikan bahwa ada hubungan antara kandungan senyawa total fenol pada ekstrak daun kersen segar, kering, dan rontok dengan kemampuannya menangkal radikal bebas pada uji DPPH atau uji aktifitas antioksidan. Hubungan antara kandungan senyawa total kadar fenol pada ekstrak daun kersen segar, kering, dan rontok berbanding lurus dengan kemampuannya meredam radikal DPPH (aktivitas antioksidan). Kurva tersebut dapat menunjukkan bahwa semakin banyak kandungan senyawa fenolik dalam ekstrak daun kersen segar, kering, dan rontok maka semakin besar aktivitas antioksidan.

4. Kesimpulan

Kandungan senyawa kimia dari daun segar, kering, dan rontok mempunyai kandungan senyawa yang berbeda. Total kadar fenol yang diperoleh dari ekstrak daun kersen segar, kering, dan rontok masing-masing didapat 6 mg ekivalen asam galat/g sampel segar, 14 mg ekivalen asam galat/g sampel kering, dan 12 mg ekivalen asam galat/g sampel rontok. Aktivitas antioksidan IC₅₀ yang diperoleh dari ekstrak daun kersen segar, kering, dan rontok masing-masing sebesar -291187,5 mg/L - 48958,9 mg/L dan -245305,6 mg/L.

5. Daftar Pustaka

- [1] Fajar Budi Laksono, Enny Fachriyah, Dewi Kusriani, Isolasi dan Uji Antibakteri Senyawa Terpenoid Ekstrak N-Heksana Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*), *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 17, 2, (2014) 37-42
- [2] Pramono, Posisi dan Kontribusi Kimia dalam Mencari Bahan baku Obat Dari Bahan Alam, in: *Seminar Obat Tradisional Anti Rematik*, Semarang, 1998.
- [3] MH Sani, ZA Zakaria, T Balan, LK Teh, MZ Salleh, Antinociceptive activity of methanol extract of *Muntingia calabura* leaves and the mechanisms of action involved, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, (2012)
- [4] Jeffrey Barry Harborne, Metode fitokimia, Padmawinata K, S. I, Institut Teknologi Bandung, Bandung, 1987.

- [5] Tavamani Balan, Mohd Hijaz Mohd Sani, Salahuddin Haji Mumtaz Ahmad, Velan Suppaiah, Norhafizah Mohtarrudin, Zainul Amiruddin Zakaria, Antioxidant and anti-inflammatory activities contribute to the prophylactic effect of semi-purified fractions obtained from the crude methanol extract of *Muntingia calabura* leaves against gastric ulceration in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 164, (2015) 1-15 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.017>
- [6] Mhd Riza Marjoni, Afrinaldi Afrinaldi, Ari Devi Novita, Kandungan Total Fenol Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia Calabura* L.), *YARSI medical Journal*, 23, 3, 187-196
- [7] William Patrick Cruiz Buhian, Raquel Orejudos Rubio, Demetrio Lim Valle, Juliana Janet Martin-Puzon, Bioactive metabolite profiles and antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Muntingia calabura* L. leaves and stems, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6, 8, (2016) 682-685 <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.006>
- [8] J. Javanmardi, C. Stushnoff, E. Locke, J. M. Vivanco, Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions, *Food Chemistry*, 83, 4, (2003) 547-550 [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00151-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00151-1)
- [9] Hiroe Kikuzaki, Masashi Hisamoto, Kanae Hirose, Kayo Akiyama, Hisaji Taniguchi, Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7, (2002) 2161-2168 <http://dx.doi.org/10.1021/jf011348w>
- [10] Philip Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2, (2004) 211-219
- [11] Buyung Rukmantara Susena Putra, Dewi Kusriani, Enny Fachriyah, Isolasi Senyawa Antioksidan dari Fraksi Etil Asetat Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L), *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 16, 3, (2013) 69-72
- [12] Norman R. Farnsworth, Biological and phytochemical screening of plants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 3, (1966) 225-276 <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600550302>
- [13] H. Hülya Orak, Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations, *Scientia Horticulturae*, 111, 3, (2007) 235-241 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.019>