

DAUN *HIBISCUS ROSA SINENSIS*: ANALISIS PROKSIMAT, AKTIVITI ANTIOKSIDAN DAN KANDUNGAN BAHAN INORGANIK

(*Hibiscus rosa sinensis* Leaves: Analysis of Proximate, Antioxidant Activities and Inorganic Compound)

Saiful Irwan Zubairi* & Nurul Shahreda Jaies

Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan,
Fakulti Sains & Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

*Corresponding author: saiful-z@ukm.edu.my

Abstrak

Sehingga kini, pelbagai spesies tumbuh-tumbuhan herba banyak digunakan di dalam perubatan tradisional. Kebanyakan tumbuh-tumbuhan ini mempunyai bahan bio-aktif dan kandungan nutrisi yang berpotensi untuk memberikan kesan kesihatan yang positif seperti antioksidan dan antipiretik. Bunga raya atau nama saintifiknya *Hibiscus rosa sinensis*, dikatakan mempunyai khasiat seperti teh kerana mengandungi bahan antioksidan yang dapat membantu mengawal kolesterol. Di samping itu, lendir yang terdapat di dalam daunnya boleh menurunkan suhu badan apabila ketika demam panas (berpotensi sebagai bahan antipiretik). Oleh yang demikian, kajian awalan terhadap daun *H. rosa sinensis* segar dan kering dijalankan bagi menganalisis dan mengenalpasti kandungan nutrisi penting, aktiviti antioksidan dan kandungan bahan inorganik. Kaedah penentuan kandungan jumlah fenolik (TPC) digunakan bagi sampel daun segar dan kering sebelum aktiviti antioksidan penangkapan radikal bebas DPPH dan kuasa penurunan ion ferric (FRAP) dijalankan bagi tujuan pengesanan komponen antioksidan. Manakala, komposisi logam berat dikaji menggunakan kaedah spektrometri jisim plasma berpeningkatan berganda (ICP-MS). Keputusan analisis proksimat daun segar menunjukkan terdapatnya kandungan lembapan (9.03%), protein (10.44%), lemak (6.43%), serat kasar (11.55%), abu (11.22%) dan karbohidrat (51.33%). Manakala, kandungan bahan inorganik adalah seperti berikut: kadmium (Cd), kromium (Cr), arsenik (As), nikel (Ni), plumbum (Pb), ferum (Fe) dan zink (Zn). Selain daripada itu, analisis antioksidan menunjukkan daun kering *H. rosa sinensis* mempunyai nilai DPPH dan FRAP yang tinggi berbanding daun segar ($p < 0.05$) bagi pelarut aseton dan air. Nilai korelasi positif yang tinggi di antara analisis TPC dan dua ujian aktiviti antioksidan FRAP dan DPPH ($p < 0.05$) menunjukkan kewujudan komponen penting antioksidan di dalam hasil ekstrak aseton dan air. Secara keseluruhan, keseluruhan komponen nutrisi penting, bahan antioksidan yang tinggi dan kepekatan bahan inorganik berbahaya yang rendah dalam daun *H. rosa sinensis* membolehkan ia berpotensi besar di dalam pembangunan produk perubatan semula jadi bagi merawat demam panas (piretik).

Kata kunci: *Hibiscus rosa sinensis*, proksimat, antioksidan, komponen nutrisi penting, bahan inorganik

Abstract

A variety of herbal plants species has been used in traditional medicine. Most of these plants contained several potent bio-active ingredients and nutrients that could give potential positive effects to the health such as antioxidant and antipyretic. *Hibiscus rosa sinensis*, commonly known as *Bunga raya*, have similar concoction characteristic to tea which contain antioxidants that help to control cholesterol. In addition, mucilage that was found in the leaves could help to reduce extreme body heat during fever (which potentially acts as an antipyretic). Therefore, this preliminary study on the fresh and dried *H. rosa sinensis* leaves was carried out to analyze and identify the nutrients content, anti-oxidants and inorganic material. Total phenolic content (TPC) method was used for both fresh and dried leaves prior to the antioxidant activities of DPPH free radicals scavenging and ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) as to confirm the existence of antioxidant constituents. Meanwhile, the composition of heavy metals was studied using **inductively coupled plasma mass spectrometry** (ICP-MS). The proximate analysis of the fresh leaves showed the presence of moisture content (9.03%), protein (10.44%), fat (6.43%), crude fiber (11.55%), ash (11.22%) and carbohydrate (51.33%). Meanwhile, the inorganic contents are as follows: cadmium (Cd), chromium (Cr), arsenic (As), nickel (Ni), lead (Pb), iron (Fe) and zinc (Zn). Furthermore, the antioxidant activities of FRAP and DPPH showed that dried leaves of *H. rosa sinensis* was higher than the fresh leaves ($p < 0.05$) irrespective of any solvent used. The positive

correlation between TPC and two other antioxidant activities of DPPH and FRAP ($p < 0.05$) indicates the presence of antioxidant components in the acetone and water extracts. Therefore, the high availability of essential nutritional component, anti-oxidants and low concentration of hazardous inorganic matter in *H. rosa sinensis* leaves enable it to be used as one of the potential natural products to treat high fever (pyretic).

Keywords: *Hibiscus rosa sinensis*, proximate, antioxidant, essential nutrient component, inorganic materials

Pengenalan

Bunga raya atau nama saintifiknya *Hibiscus rosa sinensis* dikenali di antara tumbuhan yang mempunyai pelbagai khasiat dan telah digunakan di dalam perubatan tradisional untuk mengubati pelbagai penyakit di samping ketidakbolehpayaan kesihatan seperti demam panas. Bunga ini juga dikenali dengan pelbagai nama seperti *Japa* dalam bahasa Sanskrit, *Jasum* (Hindi), *Jaba* (Bengali), *Chinese Hibiscus* (English) dan sebagainya [1]. *Hibiscus rosa sinensis* didapati berasal daripada keluarga *Malvaceae* dan ia ditanam secara meluas sebagai tumbuhan hiasan di negara beriklim tropika dan subtropika Asia Timur, serta mempunyai pelbagai bentuk, saiz dan warna dengan sekurang-kurangnya 250 jenis spesies yang berbeza [2]. Tumbuhan hijau berbunga ini bersifat malar dan renek dengan ketinggian sekurang-kurangnya 5-8 kaki [1]. Ia juga merupakan sejenis tumbuhan renek berkayu dan sesuai ditanam atau tumbuh di tanah yang teduh dan bersifat sederhana berasid [3]. Semua bahagian tumbuhan ini seperti akar, daun, batang dan bunga mempunyai khasiat terapeutik yang tersendiri [1].

Disebabkan ianya begitu mudah diperolehi, pelbagai kegunaan secara perubatan tradisional telah dilakukan sejak turun temurun [1]. Sebagai ubatan tradisional, jus daun *H. rosa sinensis* sering kerap digunakan untuk merawat gonorea manakala serbuk akar dan air rendaman kelopak bunganya digunakan untuk merawat *menorrhagia* (haid dengan pendarahan berat) dan minuman penyejuk badan untuk demam panas [4, 5]. Selain daripada itu, hasil ekstrak daun *H. rosa sinensis* mempunyai potensi sebagai pembunuh sel kanser diperingkat awalan pembentukan sesuatu sel tumor [6]. Potensi tersebut diperkukuhkan lagi dengan kewujudan beberapa sebatian biologi aktif (seperti sterol tumbuhan) penting yang bertindak sebagai agen antioksidan, pelindung kardio dan pengawal kepada tekanan darah tinggi (kategori pra-hipertensi dan hipertensi sederhana) [6, 7, 8]. Oleh yang demikian, tumbuhan ini dilihat mampu menjadi salah satu sumber tumbuhan herba semula jadi berpotensi tinggi untuk pembangunan ubat-ubatan baru dan ianya berpotensi menyediakan rawatan efektif dalam merawat kanser [6] dan penyakit-penyakit bawaan bakteria [5].

Sebagai tambahan, apa yang lebih menarik berkenaan dengan tumbuhan ini adalah daunnya yang berlendir mempunyai bahan bioaktif yang dapat menurunkan suhu badan ketika demam panas (antipiretik). Beberapa bahan bioaktif utama yang terdapat di dalam lendir dan hasil ekstraknya seperti β -sitosterol (sterol tumbuhan semula jadi dan mempunyai struktur yang hampir sama dengan kolesterol), stigmasterol, asetat taraxeril dan tiga sebatian saiklopropan yang bersifat sukitanurut memberi kesan yang efektif dalam penurunan suhu badan yang tinggi [9, 10, 11]. Oleh yang demikian, kajian ini dilakukan untuk mengetahui secara terperinci kandungan proksimat (perbandingan dilakukan dengan beberapa tumbuhan (Rajah 1) yang mempunyai ciri-ciri aktiviti biologi antipiretik yang sama), tahap keupayaan aktiviti antioksidan dan komposisi kepekatan bahan inorganik berbahaya yang mungkin wujud di dalam daun *H. rosa sinensis* segar dan kering. Hasil analisis kajian ini dilihat penting dalam memberikan gambaran secara holistik tentang potensi besar kandungan nutrisi dan bahan bioaktif penting yang dilihat boleh dijadikan sebagai perubatan alternatif kepada *paracetamol* di dalam menurunkan suhu akibat demam panas.



Rajah 1. Daun-daun tumbuhan yang mempunyai ciri-ciri aktiviti biologi antipiretik yang sama dengan daun *H. rosa sinensis*. (a) *H. rosa sinensis*, (b) *Hypericum perforatum*, (c) *Moringa oleifera* dan (d) *Verbena officinalis*.

Bahan dan Kaedah

Pengumpulan daun

Daun *H. rosa sinensis* segar diperolehi di Hutan Pendidikan Alam (HPA) kampus Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), Bangi, Selangor. Hanya satu lokasi dipilih bagi mengurangkan ralat dalam analisis komponen hasil ekstrak. Penetapan spesies dijalankan dengan menggunakan kaedah visual dan kemudiannya dibandingkan dengan ciri-ciri morfologi daun *H. rosa sinensis* seperti mana yang dilaporkan di dalam kajian Nwachukwu dan Mbagwu (2008) [2].

Penyediaan sampel

Sebanyak 100 g daun *H. rosa sinensis* segar yang telah dibasuh dimasukkan ke dalam oven untuk pengeringan pada 60 °C selama 6 jam (sampel segar tidak melalui proses pengeringan di dalam oven dan ia dikeringkan menggunakan suhu bilik). Daun yang telah kering dikisar dengan menggunakan pengisar *Waring Commercial Blender* bagi penyediaan dalam bentuk seratan halus. Seratan daun halus kering dan segar seterusnya dimasukkan ke dalam botol universal dan di simpan di dalam bilik sejuk (15 °C) sebelum analisis jumlah kandungan fenolik dan aktiviti antioksidan.

Analisis proksimat

Kaedah piawaian AOAC (1990) [12] digunakan untuk menentukan kandungan nutrisi penting yang terdapat di dalam sampel daun *H. rosa sinensis* segar. Kandungan lembapan (basis basah) bagi daun segar yang dikisar halus ditentukan dengan menggunakan pengeringan ketuhar (*Thermo Scientific Heratherm GP*) pada suhu 105 °C selama 24 jam atau sehingga tiada perubahan berat (mg) berlaku. Kandungan lemak ditentukan dengan menggunakan

pengekstrakan berterusan *soxhlet*. Pelarut organik heksana digunakan di dalam proses pengekstrakan tersebut. Manakala, kandungan abu pula ditentukan dengan memasukkan sampel daun ke dalam relau pada suhu 550 °C dan kandungan serat kasar ditentukan dengan melalui proses penghadaman panas berurutan dengan larutan asid dan alkali yang dicairkan. Kandungan karbohidrat ditentukan secara teori iaitu dengan menggunakan kaedah perbezaan bagi semua jumlah komponen-komponen nutrisi penting seperti di dalam persamaan (1):

$$\text{Kandungan karbohidrat (\%)} = 100 - (\text{Jumlah kandungan protein} + \text{lemak} + \text{air} + \text{abu} + \text{serat kasar}) \quad (1)$$

Proses pengekstrakan

Sebanyak 1 g seratan halus kering dan segar daun *H. rosa sinensis* ditimbang dan dimasukkan ke dalam botol universal yang mengandungi 10 ml pelarut organik aseton dan air suling sebelum proses pengekstrakan celuran normal (*normal soaking extraction*) dijalankan pada suhu 30 ± 2 °C selama 1 jam. Hasil ekstrak yang telah ditapis, diperah, diempar (10 minit masa pengemparan pada kelajuan 1000 rpm) dan disimpan di dalam peti sejuk pada suhu 4 °C sebelum analisis kandungan fenolik dan aktiviti antioksidan dijalankan.

Penentuan jumlah kandungan fenolik (TPC)

Prosedur analisis Musa et al. (2011) [13] digunakan bagi menentukan jumlah kandungan fenolik di dalam sampel sebelum aktiviti antioksidan dijalankan. Penentuan aktiviti antioksidan menggunakan TPC dimulakan dengan penambahan 100 µl sampel hasil ekstrak segar dan kering ke dalam larutan khas yang mengandungi 0.4 ml air suling dan 0.5 ml reagen *Folin-Ciocalteu*. Larutan tersebut dibiarkan selama 5 minit. Kemudian, 1 ml 7.5% sodium karbonat ditambah kepada larutan tersebut disimpan selama 2 jam. Nilai bacaan *absorbance* (abs) diambil dengan menggunakan spektrofotometer sinar tampak (UV-Vis) pada nilai panjang gelombang 765 nm. Pembacaan *absorbance* dilakukan sebanyak 3 kali bagi mendapatkan purata nilai bacaan $\pm$ sisihan piawai ($n = 3$).

Aktiviti antioksidan

Aktiviti antioksidan dijalankan dengan menggunakan sampel ekstrak air dan aseton setelah penentuan jumlah kandungan fenolik (TPC) memberikan nilai bacaan folin positif. Pelarut aseton digunapakai kerana hasil ekstrak yang menggunakan pelarut tersebut terbukti menghasilkan tahap aktiviti antioksidan tertinggi [34]. Nilai aktiviti antioksidan pelarut aseton dijadikan sebagai *baseline* kepada hasil ekstrak yang menggunakan pelarut air. Dua ujian antioksidan tersebut adalah pemerangkapan radikal bebas DPPH dan kuasa penurunan ion ferik (FRAP) berdasarkan kepada prosedur Musa et al. (2011) [13]. Prosedur dua ujian aktiviti antioksidan adalah seperti berikut:

Pemerangkapan radikal bebas DPPH

Larutan stok disediakan dengan penambahan 40 mg 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ke dalam 100 ml metanol dan disimpan pada suhu -20 °C. Sebanyak 350 ml larutan stok ditambah kepada 350 ml metanol untuk memastikan nilai bacaan *absorbance* berada diantara 0.70 ± 0.01 unit pada panjang gelombang 516 nm. Pembacaan *absorbance* dilakukan sebanyak 3 kali bagi mendapatkan purata nilai bacaan $\pm$ sisihan piawai ($n = 3$). Campuran 100 µl sampel dan 1 ml metanol ke DPPH disediakan dan disimpan semalaman di dalam ruang gelap. Nilai aktiviti pemerangkapan radikal bebas (%) dikira mengikut formula persamaan 2 berikut:

$$\% \text{ Aktiviti pemerangkapan radikal bebas} = \frac{(\text{Daya serapan awal} - \text{Daya serapan sampel})}{\text{Daya serapan awal}} \times 100\% \quad (2)$$

Kuasa penurunan ion ferik (FRAP)

Reagen FRAP disediakan dengan penyediaan 300 mM penimbil asetat, pH 3.6 (3.1 g sodium asetat trihidrat) ditambah ke dalam 16 ml asid glasial dengan nisbah pencampuran air suling 1:1) + 10 mM TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine) + 40 mM HCl + 20 mM FeCl₃·6H₂O mengikut nisbah 10:1:1. Sebanyak 100 µl hasil ekstrak dicampur bersama 1 ml reagen FRAP dan disimpan selama 30 minit sebelum bacaan *absorbance* (abs) diambil pada panjang gelombang 595 nm. Pembacaan *absorbance* dilakukan sebanyak 3 kali bagi mendapatkan purata nilai bacaan $\pm$ sisihan piawai ($n = 3$).

Penentuan kandungan bahan inorganik

Radas kaca yang digunakan dalam penentuan kandungan bahan inorganik direndam semalaman di dalam larutan asid nitrik 5% (v/v) dan dikeringkan di dalam relau. Kaedah piawai AOAC (1990) [12] digunakan bagi analisis ini. Pengekstrakan daun *H. rosa sinensis* segar dilakukan dengan menggunakan kaedah penghadaman berasid. Sebanyak 2 g sampel yang telah dikeringkan (setelah dibasuh) dimasukkan ke dalam kelalang kon berserta dengan 25 ml larutan 65% (v/v) asid nitrik pekat. Campuran tersebut dipanaskan di atas kukus pasir pada suhu 120 °C sehingga wasap perang asid nitrik tersejat. Kemudian, 15 ml larutan 70% (v/v) asid perklorik ditambahkan dan dipanaskan sehingga warna kuning jernih terhasil. Larutan tersebut disejukkan pada suhu bilik dan kemudian dituras dengan kertas turas Whatman No. 6. Hasil turasan tersebut dicairkan dengan air suling sehingga ke paras 50 ml. Akhir sekali, 1 ml hasil turasan yang telah dicairkan digunakan bagi analisis logam berat menggunakan instrumentasi spektrometri jisim plasma berpeningkatan berganda (ICP-MS). Analisis kandungan dilakukan sebanyak 3 kali bagi mendapatkan purata nilai bacaan $\pm$ sisihan piawai ($n = 3$).

Analisis statistik

Kesemua data hasil ujikaji dianalisa dengan menggunakan perisian MINITAB versi 17.0. Ujian T-tak bersandar atau 'Student T-test' dijalankan pada aras kebarangkalian signifikan 95% ($p < 0.05$) bagi penentuan perbezaan signifikan di antara sampel.

Keputusan dan Perbincangan

Kandungan proksimat

Kebanyakan tumbuh-tumbuhan herba mempunyai potensi untuk dijadikan sebagai sumber makanan berkhasiat dan juga untuk kegunaan perubatan. Kandungan nutrisi tertentu yang disintesis semasa metabolik primer seperti karbohidrat dan lemak banyak memainkan peranan yang penting dalam penghasilan bahan bioaktif fitokimia yang berkualiti dan berfungsi pada peringkat metabolik sekunder. Oleh yang demikian, bagi menentukan kandungan nutrisi utama sesuatu tumbuhan, analisis kandungan proksimat perlu dilakukan. Bahagian yang dianalisa adalah daun *H. rosa sinensis* segar. Sehingga kini, tiada analisis awam diperolehi dalam menentukan komposisi nutrisi yang terdapat di dalam daun *H. rosa sinensis*. Kebanyakan analisa kandungan proksimat yang dijalankan bagi tumbuhan ini hanya tertumpu kepada bahagian akar, benih dan kelopak bunganya. Oleh yang demikian, analisis komposisi nutrisi penting yang terdapat di dalam daun *H. rosa sinensis* dijalankan dan perbandingan secara tidak langsung komposisi nutrisi penting di antara tumbuh-tumbuhan lain yang dikatakan mempunyai ciri-ciri antipiretik (secara penyediaan tradisional) yang sama ditunjukkan di dalam Jadual 1.

Jadual 1. Komposisi kandungan nutrisi penting (%) bagi daun segar *H. rosa sinensis*, *Moringa oleifera*, *Hypericum perforatum* dan *Verbena officinalis*.

Komposisi kandungan (%)	<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	<i>Moringa oleifera</i> ^a	<i>Hypericum perforatum</i> ^b	<i>Verbena officinalis</i> ^c
Lembapan	3.00 $\pm$ 0.04	3.21 $\pm$ 0.10	8.31 $\pm$ 0.06	6.82 $\pm$ 0.09
Protein	10.44 $\pm$ 0.32	17.01 $\pm$ 0.10	9.54 $\pm$ 0.16	4.39 $\pm$ 0.09
Lemak	6.43 $\pm$ 0.03	2.11 $\pm$ 0.11	5.06 $\pm$ 0.08	4.14 $\pm$ 0.09
Serat kasar	11.55 $\pm$ 0.26	7.09 $\pm$ 0.11	13.0 $\pm$ 0.00	16.78 $\pm$ 0.09
Abu	11.22 $\pm$ 0.26	7.93 $\pm$ 0.12	4.54 $\pm$ 0.014	17.10 $\pm$ 0.08
Karbohidrat	51.33 $\pm$ 0.25	63.11 $\pm$ 0.09	72.2 $\pm$ 0.09	67.52 $\pm$ 0.07

a - c: Komposisi kandungan nutrisi tumbuhan yang mempunyai ciri-ciri aktiviti biologi antipiretik [14, 15].

Tumbuhan ini digunakan dalam penyediaan ubatan tradisional. Tiada kajian saintifik diperolehi berkenaan dengan aktiviti antipiretik. Tiada analisis statistik dijalankan kerana nilai yang diperolehi bukan daripada data mentah

kajian. Sebagai permulaan, analisis kandungan kelembapan daun *H. rosa sinensis* menunjukkan tahap kelembapan yang tinggi ($9.00 \pm 0.04\%$) berbanding daun *Moringa oleifera*, *Hypericum perforatum* dan *Verbena officinalis*. Perbezaan nilai kelembapan dilihat boleh berpunca dari lokasi pensampelan daun *H. rosa sinensis* di dalam kawasan hutan yang agak lembap. Di samping itu, jenis-jenis tanah (laterit, gambut dan berpasir) dan suhu persekitaran turut mempengaruhi kandungan komposisi nutrisi sesuatu tumbuhan kerana keadaan yang lembap dan suhu yang tinggi menyebabkan banyak air yang diserap oleh tumbuhan. Kelembapan yang berlebihan berpotensi menyebabkan kebolehdapatan kandungan nutrisi penting yang rendah [16].

Seterusnya, kaedah Kjeldhal digunakan dalam penentuan kandungan protein yang terdapat di dalam daun *H. rosa sinensis*. Molekul protein terbentuk daripada atom karbon (C), hidrogen (H), oksigen (O), nitrogen (N) dan kemungkinan sulfur (S). Untuk menentukan kandungan protein di dalam sesuatu tumbuhan, nilai nitrogen akan didarabkan dengan faktor penukaran iaitu 6.25. Teknik ini mengandaikan bahawa semua nitrogen berasal daripada sumber protein [14]. Kandungan protein yang terdapat di dalam daun *H. rosa sinensis* adalah lebih tinggi ($10.44 \pm 0.32\%$) berbanding daun *Hypericum perforatum* dan *Verbena officinalis* dan rendah berbanding daun *Moringa oleifera*. Perbezaan kandungan protein dalam sesuatu tumbuhan amat dipengaruhi oleh kandungan nutrisi tanah dan air. Penggunaan baja dan lokasi tanah yang kaya dengan sumber nitrogen (N) dan sulfur (S) boleh mempengaruhi kandungan protein tumbuhan [17]. Perkara ini disokong oleh kajian Zhang et al. (2012) [18] di mana variasi alam sekitar seperti lokasi dan perubahan musim secara mendadak boleh mempengaruhi kandungan protein sesuatu tumbuhan.

Kaedah pengekstrakan *soxhlet* digunakan dalam penentuan kandungan lemak. Di dalam kajian ini, didapati daun *H. rosa sinensis* mempunyai lemak yang tinggi iaitu $6.43 \pm 0.03\%$ berbanding daun-daun yang lain. Data analisis lemak adalah di antara data yang terpenting dalam kajian ini. Ia menggambarkan kewujudan secara tidak langsung bahan bioaktif utama iaitu β -sitosterol di dalam sampel daun *H. rosa sinensis*. Bahan bioaktif tersebut dilihat berkait rapat dengan kandungan lemak yang diperolehi dan ianya disifatkan sebagai agen utama aktiviti biologi positif seperti antipiretik, antioksidan dan antikanser. β -sitosterol diketahui mempunyai persamaan seperti komponen kolesterol yang mana mempunyai ciri-ciri antioksidan, memerangkap radikal bebas dan mampu mengawal pertumbuhan sel-sel kanser. Menurut Awad et al. (2011) [19], fitosterol iaitu β -sitosterol ialah lemak yang banyak terdapat di dalam diet vegetarian di mana ia berupaya meningkatkan sistem isyarat intrasel sel-sel kanser supaya tidak membahagikan sel kanser secara berterusan dan seterusnya mengawal proses pembahagian sel tersebut.

Seterusnya adalah analisis kandungan abu. Abu dikenali sebagai zat tidak organik yang tidak terbakar manakala bahan-bahan organik yang melalui proses pembakaran akan terbebas menjadi gas karbon dioksida dan air [20]. Kandungan abu yang tinggi di dalam sesuatu sampel akan menunjukkan kehadiran jumlah nutrisi tidak organik yang tinggi [21]. Terdapat dua jenis kaedah yang boleh digunakan dalam penentuan abu pada sesuatu sampel makanan iaitu pengabuan kering yang memang dikhaskan untuk analisis proksimat dan pengabuan basah yang digunakan untuk penyediaan dalam penentuan mineral. Dalam kajian ini, pengabuan kering digunakan dan kandungan abu yang terdapat di dalam daun *H. rosa sinensis* adalah $11.22 \pm 0.26\%$ lebih tinggi berbanding daun *Moringa oleifera* dan *Hypericum perforatum*. Data ini juga menjelaskan perkaitan penting kandungan keseluruhan bahan inorganik (kandungan abu) dengan keputusan analisis komposisi kandungan bahan inorganik yang terdapat di dalam ekstrak daun *H. rosa sinensis*. Kewujudan beberapa bahan inorganik penting (Jadual 5) di dalam daun *H. rosa sinensis* menggambarkan kebolehpayaan bahan tersebut secara tidak langsung dalam membantu mempertingkatkan dan meregulasi proses penghasilan produk metabolik sekunder penting antaranya seperti β -sitosterol [35].

Analisis kandungan proksimat terakhir adalah karbohidrat. Ia dikira secara teori berdasarkan kepada persamaan (1) setelah ke semua kandungan komponen nutrisi penting yang lain (kandungan abu, kelembapan, protein, lemak dan serat kasar) dikira. Keputusan menunjukkan bahawa kandungan karbohidrat di dalam daun *H. rosa sinensis* dan beberapa tumbuhan yang lain adalah melebihi 50% daripada kandungan keseluruhan nutrisi yang dicirap. Kandungan tersebut menunjukkan keupayaan daun *H. rosa sinensis* dan tumbuhan yang lain dalam menyediakan substrat berkarbon tinggi (hasil metabolisma primer) bagi penghasilan bahan-bahan fitokimia penting yang tinggi untuk proses metabolisma produk sekunder [20].

Secara keseluruhan, walaupun daun *H. rosa sinensis*, *Moringa oleifera*, *Verbena officinalis* dan *Hypericum perforatum* mempunyai karakteristik antipiretik yang sama dan kaya dengan bahan bioaktif antioksidan, analisis proksimat menunjukkan terdapatnya perbezaan yang kecil di antara setiap peratusan komposisi nutrisi yang dinilai. Perkara ini mungkin disebabkan oleh daya penyerapan nutrisi daripada komposisi tanah yang pelbagai (berbaja, kandungan mineral tinggi, tahap pencemaran dan kelembapan tanah) dan kebolehpayaan metabolisme bagi tumbuhan berlainan spesies [15]. Walaubagaimanapun, kesemua tumbuh-tumbuhan tersebut dilihat berpotensi besar dalam industri berasaskan produk herba dan ujikaji lanjutan dilihat perlu dilakukan bagi mendapatkan pula kandungan optimum bahan bioaktif yang kaya dengan sumber antioksidan dan antikanser.

Jumlah kandungan fenolik (TPC)

Sebatian fenolik di dalam sesuatu tumbuhan dikenali untuk bertindak sebagai pemerangkapan radikal bebas yang juga berkaitrapat dengan aktiviti antioksidan [22]. Jadual 2 menunjukkan kandungan keseluruhan fenolik yang terdapat di dalam ekstrak daun *H. rosa sinensis*. Analisis TPC mendapati daun bunga raya yang telah dikeringkan mengandungi jumlah kandungan fenolik yang tinggi ($p < 0.05$) secara signifikan berbanding daun segar tanpa mengira penggunaan pelarut pengekstrakan aseton atau air suling. Oleh yang demikian, dengan adanya kewujudan bahan fenolik di dalam kedua-dua sampel daun tersebut, maka dua jenis aktiviti antioksidan penting iaitu DPPH dan FRAP boleh dijalankan bagi mengenalpasti keberkesanan hasil ekstrak tersebut.

Jadual 2. Jumlah kandungan fenolik di dalam daun *H. rosa sinensis*.

Sampel	mg GAE/100 g (aseton) ^a	mg GAE/100 g (air suling) ^a
Daun segar	526 ± 5.3	307.33 ± 8.08
Daun kering	1307.33 ± 3.06*	921.67 ± 1.16*

* $p < 0.05$: Perbezaan signifikan di antara daun kering dan segar,

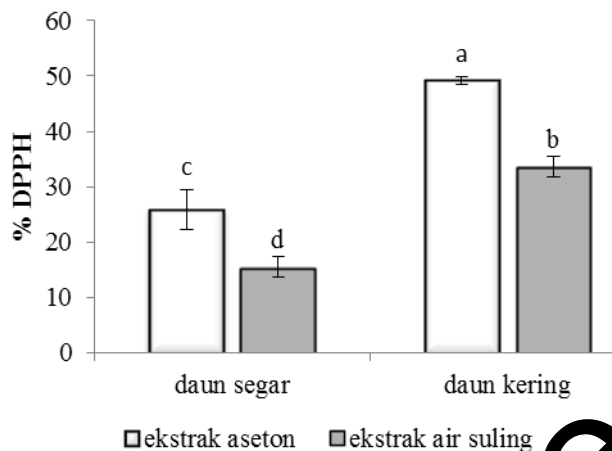
^aJumlah kandungan fenolik (TP) adalah sebagai mg *Gallic Acid Equivalents* (GAE)/100 g berat sampel.

Aktiviti antioksidan

Menurut Stoilova et al. (2007) [23], aktiviti antioksidan terhadap ekstrak tumbuhan yang mengandungi komponen polifenol adalah disebabkan oleh keupayaan mereka untuk menjadi penderma atom hidrogen atau elektron dan untuk menangkap radikal bebas. Radikal bebas adalah hasil sampingan yang sangat reaktif yang terhasil daripada proses kimia yang berlaku dalam badan. Bahan ini boleh memudaratkan serta merosakkan sel dan tisu badan. Oleh yang demikian, kaedah pemerangkapan radikal bebas (DPPH) dan kuasa penurunan ion ferik (FRAP) telah digunakan dalam penentuan aktiviti antioksidan bagi ekstrak daun *H. rosa sinensis*. Merujuk kepada Rajah 2, peratusan DPPH menggunakan ekstrak aseton dilihat lebih tinggi ($p < 0.05$) secara signifikan berbanding ekstrak air suling tanpa mengira penggunaan daun segar atau kering. Pengekstrakan dengan menggunakan pelarut yang berbeza polariti dan ketumpatan densiti mempengaruhi aktiviti penangkapan radikal bebas. Proses pengekstrakan yang menggunakan pelarut aseton menghasilkan kandungan fenolik yang tinggi ($p < 0.05$) secara signifikan berbanding air suling (Jadual 2). Ini disebabkan oleh kecenderungan komponen fenolik untuk melarut di dalam pelarut organik yang mempunyai polarisasi yang sederhana (polariti 5.2 aseton) adalah tinggi berbanding pelarut yang mempunyai polariti yang tinggi (melebihi 6 pada skala polariti). Di samping itu, faktor kelikatan dan ketumpatan pelarut organik yang rendah turut membantu dalam memberikan daya resapan yang tinggi di mana pelarut tersebut lebih mudah meresap ke dalam liang-liang tumbuhan untuk mengeluarkan komponen bioaktif [24]. Aseton mempunyai ketumpatan yang rendah berbanding air iaitu 0.791 g cm^{-3} dan ketumpatan air ialah 1 g cm^{-3} . Oleh yang demikian, nilai aktiviti antioksidan DPPH daripada proses pengekstrakan menggunakan aseton adalah terbukti lebih tinggi berbanding daripada pengekstrakan air suling.

Selain daripada itu, Jadual 3 menunjukkan penggunaan pelarut aseton bagi daun kering mempunyai aktiviti kuasa penurunan ion ferik yang tinggi secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding penggunaan air suling. Secara umumnya, kuasa penurunan ion ferik berkaitrapat dengan kehadiran sebatian yang bersifat *reductone* di mana ia berkeupayaan untuk menderma ion hidrogen (Shimada et al. 1992) [25]. Salah satu contoh sebatian tersebut adalah sebatian

fenolik. Kehadiran sebatian *reductone* ini akan menstabilkan radikal bebas dan menamatkan tindak balas rantaian radikal (antioksidan) [26]. Oleh yang demikian, kandungan sebatian fenolik yang terdapat di dalam kedua-dua jenis daun (kering dan basah) membuktikan akan keupayaan bahan tersebut dalam aktiviti antioksidan.



^{a-d}: Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) bagi setiap jenis daun.

Rajah 2. Aktiviti pemerangkapan radikal DPPH bagi ekstrak daun *H. rosa sinensis*.

Jadual 3. Kuasa penurunan ferik (FRAP) di dalam daun *H. rosa sinensis*.

Sampel	mg TE/100 g (aseton) ^a	mg TE/100 g (air suling) ^a
Daun segar	646.67 ± 1.0	310.56 ± 9.48
Daun kering	2312.22 ± 152*	1690.01 ± 4.41*

* $p < 0.05$: Perbezaan signifikan di antara daun kering dan segar,

^aKapasiti antioksidan diukur melalui asai ORAC (oxygen radical absorbance capacity) sebagai mg Trolox Equivalents (TE)/100 g berat sampel.

Korelasi di antara jumlah kandungan fenolik dan aktiviti antioksidan

Jadual 4 menunjukkan korelasi antara kandungan jumlah fenolik (TPC) dan dua aktiviti antipengoksida iaitu aktiviti pemerangkapan radikal DPPH dan kuasa penurunan ion ferik (FRAP). Analisis korelasi menunjukkan jumlah kandungan fenolik mempunyai korelasi positif yang tinggi secara signifikan dengan kedua-dua aktiviti antioksidan iaitu pemerangkapan radikal DPPH ($r = 0.743$, $p < 0.05$) dan kuasa penurunan ion ferik ($r = 0.546$, $p < 0.05$). Secara keseluruhannya, korelasi ini membuktikan bahawa semakin tinggi nilai TPC, semakin tinggi nilai aktiviti antioksidan bagi ekstrak daun *H. rosa sinensis*.

Jadual 4. Analisis korelasi antara jumlah kandungan fenolik dan aktiviti-aktiviti antioksidan.

	TPC	DPPH	FRAP
TPC	1.00	+0.74	+0.55
DPPH	+0.74	1.00	+0.71
FRAP	+0.55	+0.71	1.00

Kandungan bahan inorganik

Jadual 5 menunjukkan komposisi kandungan bahan inorganik yang terdapat di dalam ekstrak daun *H. rosa sinensis* segar dengan menggunakan kaedah spektrometri jisim plasma berpeningkatan berganda (ICP-MS). Menurut Berg (1997) [27], tumbuh-tumbuhan memerlukan sumber bahan inorganik penting seperti Cu, Fe, Mn dan Zn untuk tumbesarnya manakala kehadiran Cd dan Pb amat berpotensi menjadi toksik dan tidak baik untuk pertumbuhan.

Jadual 5. Komposisi kandungan bahan inorganik di dalam daun *H. rosa sinensis*.

Bahan inorganik	Kandungan (mg/kg)
Cd	0.002 ± 0.001
Cr	0.15 ± 0.01
Pb	0.04 ± 0.02
As	0.06 ± 0.01
Ni	0.06 ± 0.01
Fe	9.54 ± 1.29
Zn	0.85 ± 0.33

Kandungan bahan inorganik bertoksik seperti kadmium (Cd) di dalam sampel ekstrak adalah 0.002 ± 0.001 mg/kg iaitu jauh lebih rendah ($p < 0.05$) secara signifikan berbanding jumlah kadmium yang dibenarkan oleh WHO/FAO iaitu 0.10 mg/kg. Manakala, kandungan kromium (Cr) pula adalah sebanyak 0.15 ± 0.01 mg/kg iaitu berada ditahap yang selamat mengikut piawaian yang ditetapkan oleh WHO (2007) [28] iaitu 1.30 mg/kg. Seterusnya, kandungan plumbum (Pb) (0.04 ± 0.02 mg/kg) dilihat rendah ($p < 0.05$) secara signifikan berbanding had selamat WHO (2007) [28] iaitu 0.3 mg/kg. Bagi ujikaji ini, sampel daun *H. rosa sinensis* yang digunakan diperolehi dari kawasan pinggir hutan yang jauh daripada sumber pencemaran seperti di tapak pelupusan sampah. Pencemaran Pb pada tumbuh-tumbuhan boleh berpunca daripada batuan asid plumbum yang mengalir masuk ke dalam sistem perparitan. Oleh yang demikian, penggunaan sebarang sampel tumbuh-tumbuhan bagi tujuan kajian perubatan (seperti pengambilan secara *oral*) perlulah terlebih dahulu memastikan persekitaran tumbuhan tersebut tidak terdedah kepada sebarang pencemaran. Bahagian tumbuhan akar, daun dan batang), buah-buahan dan sayur-sayuran yang telah terdedah kepada pencemaran Pb tidak akan mudah dihilangkan melalui teknik pembasuhan kerana ianya telah terkumpul dan sebatu dalam kepekatan yang tinggi di dalam bahagian tersebut [29]. Seterusnya, kandungan arsenik (As) yang terdapat di dalam daun *H. rosa sinensis* (0.06 ± 0.01 mg/kg) adalah lebih rendah ($p < 0.05$) secara signifikan berbanding kandungan piawaian yang ditetapkan oleh WHO (2007) [28] iaitu 1 mg/kg. Arsenik adalah bahan inorganik tidak penting untuk tumbesaran dan toksik kepada tumbuhan. Ia amat mudah terkumpul di bahagian daun dan buah-buahan sekiranya terdapatnya pencemaran arsenik [30]. Oleh yang demikian, kandungan arsenik yang terdapat di dalam daun *H. rosa sinensis* dilihat cukup selamat bagi sebarang penyediaan ubatan tradisional. Zat besi (Fe) merupakan mikronutrien yang diperlukan oleh tumbuhan dalam jumlah yang tinggi berbanding logam lain [31]. Ia merupakan unsur yang mudah larut dan ia cenderung untuk diserap oleh tumbuhan dalam kuantiti yang banyak [32]. Hasil ekstrak daun *H. rosa sinensis* menunjukkan kandungan zat besi yang tinggi (9.54 ± 1.29 mg/kg) ($p < 0.05$) secara signifikan berbanding sumber mineral yang lain. Akhir sekali, kandungan zink (Zn) yang terdapat di dalam daun *H. rosa sinensis* adalah (0.85 ± 0.33 mg/kg) jauh di bawah tahap kandungan selamat ($p < 0.05$) mengikut piawaian WHO (2007) [28] iaitu 99.4 mg/kg. Zink merupakan sumber mineral penting yang membantu dalam fungsi biologi seperti respon imuniti terhadap penyakit dan stimulan penting bagi enzim. Selain daripada itu, Zn juga dikenali dengan sifat antivirus, antibakteria, antikulat dan antikanser [33]. Oleh yang demikian, kewujudan mineral zink di dalam sampel ekstrak daun *H. rosa sinensis* menunjukkan potensi kebolehpupayaan ekstrak tersebut dalam penggunaannya sebagai agen antipiretik, antikanser dan antioksidan.

Kesimpulan

Analisis komposisi proksimat di dalam daun *H. rosa sinensis* menunjukkan jumlah nutrisi penting yang tinggi seperti karbohidrat dan lemak. Kandungan komponen produk metabolik primer tersebut secara tidak langsung berkait rapat dengan penghasilan bahan bio-aktif fitokimia penting (hasil daripada proses metabolik sekunder) yang mempunyai ciri-ciri aktiviti biologi positif seperti antioksidan dan antipiretik. Ini dibuktikan dengan jumlah kandungan fenolik (TPC) yang tinggi di dalam daun *H. rosa sinensis*. Oleh yang demikian, dua ujikaji aktiviti antioksidan DPPH dan FRAP turut dijalankan bagi membuat pembuktian lanjutan dan keputusan analisis menunjukkan aktiviti antipengoksida yang tinggi bagi kedua-dua ujikaji tersebut. Seterusnya, analisis korelasi di antara analisis TPC dan dua ujikaji antioksidan turut memperlihatkan korelasi positif yang tinggi di antara TPC dan FRAP dan DPPH di mana semakin tinggi nilai TPC, semakin tinggi aktiviti antioksidan sesuatu sampel. Di samping itu, komposisi kandungan bahan-bahan inorganik berbahaya seperti Cd, As dan Pb bagi hasil ekstrak daun *H. rosa sinensis* segar menunjukkan ia berada di paras yang selamat berdasarkan kepada piawaian yang ditetapkan oleh *World Health Organisation* (WHO). Oleh yang demikian, hasil ekstrak air daun *H. rosa sinensis* dilihat mempunyai potensi yang besar sebagai salah satu daripada sumber penghasilan produk perubahan tradisional alternatif bagi merawat demam panas sekiranya pengambilan dibuat secara *oral* dalam menurunkan suhu badan melampau dengan pantas. Demam panas dilihat mempunyai perkaitan dengan kesan respon badan terhadap jangkitan virus dan bakteria. Sehubungan dengan itu, kajian lanjut untuk menilai keberkesanan hasil ekstrak daun *H. rosa sinensis* terhadap respon mortaliti mikroorganisma virus/bakteria dan juga tahap penghasilan sel darah putih secara model tiga dimensi (3-D) *in vitro* perlu dilakukan. Ujikaji diperingkat klinikal juga dilihat penting bagi mengesan sebarang kesan sampingan jangka masa panjang (kronik) mahupun singka (akut) akibat daripada penggunaan produk alternatif yang berasaskan ekstrak daun *H. rosa sinensis*.

Rujukan

1. Kumar, L., Chakraborty, G., Singh, V. & Mazumder, A. (2017). *Hibiscus Rosa-Sinensis*: A review on divine herb. *Journal of Advances in Pharmacy and Healthcare Research* 2(4): 9-18.
2. Nwachukwu, C.U. & Mbagwu F.N. (2008). Anatomical features of the roots and leaves of *Hibiscus rosa sinensis* and *abelmoschus esculenta*. *Life Science Journal* 5(1): 68-71.
3. Sayed, Z.I.E., Ateya, A.-M.M. & Fekry, M. (2012). Macro- and micromorphological study of the leaf, stem, flower and root of *Hibiscus rosa-sinensis*. *Journal of Applied Sciences Research* 8(1): 34-56.
4. Upadhyay, S. & Upadhyay, P. (2014). *Hibiscus rosa-sinensis*: pharmacological review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2(4): 1449-1450.
5. Soni, D. & Gupta, A. (2011). Antievaluation of antipyretic and analgesic potentials of aqueous root extract of *Hibiscus rosa sinensis* (inn. Malvaceae). *International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology* 1(3): 184-186.
6. Sharma, S. & Sultana, S. (2004). Effect of *Hibiscus rosa sinensis* extract on hyperproliferation and oxidative damage caused by benzoyl peroxide and ultraviolet radiations in mouse skin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 95(5): 20-25.
7. Ghaffar, F.R.A. & El-Elaimy, I.A. (2012). *In vitro*, antioxidant and scavenging activities of *Hibiscus rosa sinensis* crude extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2(1): 51-58.
8. Diane, L.M., Oliver, C.C-Y., Edward, S. & Jeffrey, B.B. (2010). *Hibiscus Sabdariffa* L. tea (tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *J. Nutr.* 140(2): 298-303.
9. Ye, J.C., Chang, W.C., Hsieh, D.J.Y. & Hsiao, M.W. (2010). Extraction and analysis of β -sitosterol in herbal medicines. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(7): 522-527.
10. Divya, K., Tripathi J.S., Tiwari S.K. (2013). Study of antiasthmatic properties and chemical characterization of indigenous ayurvedic compounds (polyherbal formulations). *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 6(1): 457-466.
11. Kumar, A.A.S. (2012). Review on *Hibiscus rosa sinensis*. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 3(2): p. 534-53.
12. AOAC (1990). Official Method of Analysis. 15th Edn. Arlington. Official Analytical Chemists.
13. Musa, K.H., Abdullah, A., Jusoh, K. & Subramaniam, V. (2011). Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): effect of extraction techniques and solvents. *Food Analytical Methods* 4(1): 100-107.

14. Ogre, A.O. & John, P.A. (2011). Proximate study, mineral and anti nutriti composition of *moringa oleifera* leaves harvested from lafia, Nigeria: potential benefits in poultry nutrition and health. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 1(3): 296-308.
15. Hussain, J., Bahader, A., Ullah, F., Rehmen, N. U., Khan, A. L., Ullah, W. & Shinwari, Z. K. (2009). Proximate and nutrient analysis of the locally manufactured herbal medicines and its raw material. *Journal of American Science* 5(6): 1-5.
16. **Champolivier, L. & Merrien, A. (1996).** Effect of water stress applied at different growth stages to *Brassica napus* L. var *Oleifera* on yield components and seed quality. *Eur. J. Agron.* 5: 153-160.
17. Malik, A.H., Holm, L. & Johansson, E. (2012). Soil and starter fertilizer and its effect on yield and protein compositon of malting barley. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12(4): 835-849.
18. Zhang, G., Chen, J., Wang, J. & Ding, S. (2001). Cultivar and environmental effects on (1→3, 1→4)-β-d-glucan and protein content in malting barley. *J. Cereal Sci.* 34(3): 295-301.
19. Awad, A.B., Fink, C.S., Williams, H. & Kim, U. (2001). In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *Eur J Cancer Prev.* 10(6): 507-13.
20. Vickery, M.L. & Vickery, B. (1981). Secondary plant metabolism. Macmillan Press: London.
21. Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N. & Khan, M. S. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chem.* 97: 331-335.
22. Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M. & Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanides, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.* 89: 191-198.
23. Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P. and Gargova, S. (2007). Antioxidant activity of a ginger extracts (*Zingiber officinale*). *Food Chem.* 102: 764-770.
24. Naczki, M. & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal* 41: 1523-1542.
25. Shimada K., Fujikawa K., Yahara K. & Nakamura T. (1992). Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem.* 40: 945-948.
26. David, C. & Simon, V. (2009). Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Functional Ecology.* 23(3): 506-509.
27. Berg, L.R. (1977). Introductory Botany: Plants, People and the Environment. New York: Saunders College Publishing.
28. WHO (2007). Health Risks of Heavy Metals from Long Range Transboundary Air Pollution. Germany: WHO Regional Office for Europe.
29. Itanna, F. (2002). Metals in leafy vegetables grown in Addis Ababa and toxicological implications. *Ethiop. J. Health Dev* 16(3): 295-302.
30. Garg, N. & Singla, P. (2013). Arsenic toxicity in crop plants: Physiological effects and tolerance mechanisms. *Environ. Chem. Lett.* 9: 323-328.
31. Hopkins, W.G. (1999). Introduction to Plant Physiology. New York: John Wiley & Sons.
32. Johnston, W.R. & Proctor, J. (1997). Metal concentrations in plants and soil from two British serpentine sites. *Plant Soil* 46: 275-286.
33. Moyo, B., Masika, P.J., Hugo, A. & Muchenje, V. (2011). Nutritional characterization of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Biotechnology.* 10(60): 12925-12933.
34. Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W. & Gu, G. (2006). Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7277-7286.
35. Chunhong, Z., Qianquan, L., Muxin, Z., N, Z. & Minhui, L. (2013). Effects of rare earth elements on growth and metabolism of medicinal plants. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 3(1): 20-24.