

EVALUASI KADAR FLAVONOID TOTAL PADA EKSTRAK ETANOL DAUN SANGKETAN (*ACHYRANTHES ASPERA*) DENGAN SPEKTROFOTOMETRI

Yulis Trinovita^{1,a}, Yayuk Mundriyastutik^{1,b}, Zaenal Fanani^{1,c}, Ana Nurul Fitriyani^{1,d}

¹Universitas Muhammadiyah Kudus

Prodi S-1 Farmasi

Jl. Ganesha I Purwosari, Kudus, Indonesia

^ayulistrinovita@umkudus.ac.id

^byayukmundriyastutik@umkudus.ac.id

^czaenalfanani@umkudus.ac.id

^dananurul@umkudus.ac.id

Abstrak

Masyarakat biasanya menggunakan daun Sangketan untuk mengobati sawanan dengan mengusapkan daun sangketan, bawang, dlingo, dan bengkle yang sudah dihaluskan kemudian dioleskan pada ubun-ubun, kuping, leher, tangan, dan kaki. Daun sangketan mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, dan terpenoid. Flavonoid telah terbukti mencegah atau memperlambat perkembangan beberapa kanker. Sebagian besar bertindak sebagai agen anti-oksidan dan anti-inflamasi. **Tujuan** dari penelitian ini adalah untuk mengetahui profil flavonoid dari ekstrak etanol daun sangketan (*Achyranthes Aspera*) secara kualitatif. **Menggunakan** metode eksperimen dengan pendekatan one shot case study. Serbuk simplisia di maserasi dengan etanol 96% selama 8 hari disertai pengadukan, filtrat diuapkan hingga menjadi ekstrak kental. Pengujian kadar flavonoid total ekstrak dilakukan dengan spektrofotometer, menggunakan larutan baku kuersetin. **Hasil** analisis dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, konsentrasi ekstrak Sangketan 100 ppm lebih mendekati nilai absorbansi baku kuersetin pada panjang gelombang 419,8 nm, dengan kadar flavonoid total 47,23%. **Berdasarkan** analisis dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 419,8 nm, ekstrak etanol daun sangketan mengandung flavonoid total dengan kadar 47,23%. tanin.

Kata Kunci: Daun, Sangketan, Flavonoid, Spektrofotometri.

Abstract

Sangketan plants (Achyranthes Aspera) in the journal Indian Forester Sangketan plants have efficacy in treatment systems such as emenagogue, anti-arthritis, antifertility, laxatives, abortion, patients, anti-worms, aphrodisiacs, antiviral, antiplasmodic, antihypertensive, anticoagulant, diuretic, and antitumor. Of the several properties of sangketan plants because of the important role of flavonoid content. Flavonoids are mostly contained in plant leaves. Therefore, the aim of this study was to determine the profile of secondary metabolites of flavonoids from 96% ethanol extract of sangketan leaves (Achyranthes Aspera) qualitatively, and calculate percent concentration values in extract of sangketan leaves (Achyranthes Aspera) quantitative. Using a pure experimental method with a one shot case study approach. Sangketan leaf samples were obtained from Ngemplak, Undaan, Kudus. Based on the results of the analysis using the UV-Vis spectrophotometry method at a wavelength of 419.8 nm ethanol extract of sangketan leaves containing flavonoid compounds with levels of 47.23%. At least 100 ppm sample concentration is closer to the standard absorbance of 40 ppm quersetin at a wavelength of 419.8 nm with a total concentration of flavonoid levels of 47.23%. tannin.

Keywords: *Achyranthes aspera*, Leaf, Flavonoid, Spectrophotometry.

I. PENDAHULUAN

Semakin tinggi penggunaan produk kesehatan berbasis tanaman di negara berkembang serta negara maju yang menghasilkan pertumbuhan eksponensial produk herbal secara global. Para peneliti banyak melakukan penelitian pada tanaman-tanaman obat sebagai alternatif bahan kimia yang sudah ada.

Dalam penelitian Jumari (2012) tentang etnobiologi masyarakat, melaporkan bahwa masyarakat petani hidupnya masih mengandalkan sumber daya alam, mereka mempunyai pengetahuan yang baik terhadap keanekaragaman jenis tumbuhan di sekitar, salah satunya Sangketan (*Achyranthes Aspera*). Masyarakat biasanya menggunakan daun Sangketan untuk mengobati sawan dengan mengusapkan daun sangketan, bawang, dlingo, dan bengkle yang sudah dihaluskan kemudian dioleskan pada ubun-ubun, kuping, leher, tangan, dan kaki. Selain itu, daun sangketan juga biasa digunakan untuk bedak bobok dengan mencampurkan daun sangketan, beras, ganggeng, lempuyang, kunir, dan bengkle [8].

Berdasarkan penelitian Narayana (2001), Daun sangketan mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, dan terpenoid. Flavonoid telah terbukti mencegah atau memperlambat perkembangan beberapa kanker. Sebagian besar bertindak sebagai agen anti-oksidan dan anti-inflamasi [11]. Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dan terdapat pada semua bagian tumbuhan terutama pada bagian daunnya [14]. Flavonoid merupakan senyawa polar karena memiliki sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi. Pelarut polar seperti etanol, metanol, etilasetat, atau campuran dari pelarut tersebut dapat digunakan untuk mengekstrak flavonoid dari jaringan tumbuhan [12].

Melihat kemanfaatan daun sangketan yang besar, maka diperlukan penelitian lebih lanjut tentang kandungan senyawa aktif dari daun sangketan terutama jumlah kadar senyawa flavonoid. Ekstrak daun sangketan hasil perendaman dapat diidentifikasi kandungan flavonoid total dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Sehingga hasil penelitian dapat membuka jalan baru bagi

inovasi pada pengolahan serta pemanfaatan daun sangketan di masa depan.

II. METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimen murni (*true experimental research*). Dikatakan *true experimental research* karena dalam penelitian, peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen [16].

Penelitian ini menggunakan penelitian kualitatif dan kuantitatif. Berdasarkan sifat masalahnya, rancangan penelitian eksperimen murni sesungguhnya (*True Experimental Research*) yang digunakan adalah desain penelitian *one shot case study* (studi kasus satu tembakan), yaitu sebuah eksperimen yang dilaksanakan tanpa adanya sekelompok pembanding dan juga tanpa test awal [17]. Dalam penelitian ini *one shot case study* yang terdiri dari satu faktor yaitu untuk menetapkan kadar flavonoid total pada ekstrak daun sangketan (*Achyranthes Aspera*).

Dalam penelitian eksperimen, proses pengumpulan data dilakukan dengan cara mengukur hasil suatu perlakuan atau manipulasi terhadap sampel penelitian. Dalam penelitian ini, sumber data yang diperoleh adalah data primer. Pada penelitian ini data primernya berupa peneliti melakukan penelitian untuk mengetahui nilai kadar flavonoid total yang terkandung pada ekstrak etanol 96% daun sangketan (*Achyranthes Aspera*).

Sampel pada penelitian ini adalah daun dari tanaman sangketan (*Achyranthes Aspera*) yang diambil dari Desa Ngemplak, Kecamatan Undaan, Kabupaten Kudus. Alat yang digunakan adalah beaker glass, cawan porselin, gelas ukur, kuvet, spektrofotometri uv-vis, labu ukur, mikro pipet, oven, batang pengaduk, neraca analitik, pipet tetes, waterbath, dan tabung reaksi. Bahan yang digunakan adalah daun sangketan, aquadest, etanol 96% p.a, etanol 96% teknis, baku kuersetin, $AlCl_3$, NH_3 , dan asam asetat.

Daun sangketan dibuat menjadi simplisia dengan cara dikeringkan melalui sinar matahari langsung, kemudian simplisia dihancurkan menjadi serbuk menggunakan blender. Serbuk simplisia di maserasi dengan pelarut etanol 96% selama 8 hari disertai

pengadukan. Filtrat yang diperoleh diuapkan hingga menjadi ekstrak kental

Sebelum dilakukan pengujian kadar sebelumnya diidentifikasi kandungan flavonoid pada ekstrak daun sangketan dengan cara ekstrak sangketan dilarutkan dengan pelarut etanol 96% kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl_3 , perubahan warna hijau kehitaman berarti positif mengandung flavonoid.

Pengujian kadar flavonoid total ekstrak dilakukan dengan alat spektrofotometer. Sampel ekstrak daun sangketan (*Achyranthes Aspera*) ditambahkan etanol p.a pada labu ukur 100 ml hingga tanda batas, kemudian ditentukan *Operating Time*. Selanjutnya, larutan baku kuersetin dibuat konsentrasi 1000 ppm (larutan stok). Kemudian dari larutan tersebut dipipet 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, 1 ml dan 1,2 ml masing-masing dicukupkan volumenya dengan etanol p.a pada labu ukur hingga 10 ml sehingga diperoleh 5 konsentrasi yaitu 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm. Kemudian masing-masing konsentrasi diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maximum 300-600 nm.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya kandungan senyawa flavonoid serta berapa kadar flavonoid total pada sampel dengan metode maserasi dan spektrofotometri UV-Vis. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daun sangketan yang diambil dari desa Ngemplak, kecamatan Undaan, kabupaten Kudus. Sampel kemudian dideterminasi untuk mengetahui nama atau jenis tumbuhan secara spesifik dan tepat sasaran, sehingga dapat diketahui kebenaran identitas tanaman tersebut, apakah tanaman tersebut benar-benar tanaman yang diinginkan.

Sampel daun sangketan dipisahkan dari batang dan disortasi basah kemudian dicuci bersih untuk menghilangkan debu, tanah atau pengotor lain yang menempel pada permukaan daun [18]. Selanjutnya dibuat menjadi simplisia dengan cara alamiah yaitu dikeringkan dibawah matahari langsung selama \pm 3 hari sampai kadar air dari simplisia mencapai 2-5%. Proses pengeringan dilakukan karena dapat mencegah tumbuhnya

bakteri dan jamur pada tahap penyimpanan [19]. Selanjutnya dilakukan uji kadar air atau uji kelembapan dengan menggunakan alat *moisture balance*, uji kadar air digunakan untuk mencegah kelembapan yang dapat mempercepat pertumbuhan mikroba dan jamur. Pada uji kelembapan sampel simplisia sangketan didapatkan nilai kadar 3,47%. Nilai kadar kelembapan yang diperoleh sudah memenuhi persyaratan, karena kadar kelembapan simplisia yang baik adalah 2-5% [20].

Selanjutnya daun sangketan yang sudah kering ditimbang sebanyak 500 g kemudian dihaluskan untuk memperluas permukaan yang akan bersentuhan dengan cairan penyari pada proses ekstraksi dengan metode maserasi. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode maserasi dengan perbandingan pelarut 1:5. Metode maserasi digunakan karena adanya senyawa flavonoid pada daun sangketan yang tidak tahan terhadap pemanasan [21].

Pada penelitian ini, digunakan serbuk simplisia daun sangketan 500 gram dimasukkan ke dalam wadah maserasi, ditambahkan pelarut etanol 96% hingga serbuk simplisia terendam dengan volume etanol 2,5 liter, dibiarkan selama 8 hari terlindung dari cahaya, sambil diaduk tiap 8 jam selama 15 menit untuk meratakan konsentrasi larutan diluar butir serbuk simplisia sehingga tetap terjaga adanya derajat konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam sel dengan larutan di luar sel [22].

Hasil maserasi kemudian disaring untuk mendapatkan ekstrak cair. Ekstrak cair yang diperoleh diuapkan untuk mendapatkan ekstrak kental dengan menggunakan *waterbath* supaya ekstrak dengan pelarut etanol 96% terpisah. Pemisahan dilakukan pada suhu 60°C karena pada suhu ini ekstrak tidak mudah rusak dan pelarut etanol 96% pada suhu ini sudah dapat menguap.

Pada penelitian ini penguapan dilakukan selama 7 hari dan didapatkan ekstrak kental sebanyak 21,84 gram. Ekstrak dikatakan kental apabila setelah 3 kali penimbangan berat ekstrak tetap konstan [18]. Ekstrak yang diperoleh berwarna hijau kehitaman dan memiliki nilai rendemen sebesar 4,368%.

Besar kecilnya nilai rendemen yang didapat menunjukkan keefektifan proses ekstraksi. Efektivitas proses ekstraksi dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan sebagai penyari, ukuran partikel simplisia dan lamanya ekstraksi [23].

Uji kualitatif flavonoid bertujuan untuk memastikan ada tidaknya kandungan flavonoid yang terdapat pada ekstrak daun sangketan. Pada uji kualitatif ini menunjukkan adanya kandungan flavonoid yang diuji dengan menggunakan larutan FeCl_3 10% dalam aquadest dan menunjukkan hasil positif berwarna hijau kehitaman warna tersebut terbentuk karena terjadi reaksi kompleks antara logam Fe dari FeCl_3 dengan gugus hidroksil flavonoid [24].

Sampel yang dinyatakan positif mengandung flavonoid selanjutnya dilakukan uji kuantitatif penetapan kadar dengan metode spektrofotometri UV-Visible karena metode ini memberikan cara sederhana untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil. Selain itu, hasil yang diperoleh cukup akurat, dimana angka yang terbaca langsung dicatat oleh *detector* dan tercetak dalam bentuk angka digital ataupun grafik yang sudah diregresikan. Analisis flavonoid ini dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Visible karena flavonoid memiliki sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak [25].

Langkah pertama adalah pembuatan larutan induk Kuersetin sebanyak 25 mg larutkan dalam 25 ml etanol 96% (1000 ppm) kemudian dipipet 2,5 ml dan tambahkan etanol 96% sampai 25 ml (100 ppm). Kuersetin digunakan sebagai larutan induk karena kuersetin dapat membentuk kompleks antara AlCl_3 dengan gugus keto pada atom C-4 dan juga dengan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol [26].

Langkah kedua adalah penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui lama waktu yang dibutuhkan larutan untuk mencapai absorbansi konstan. Ditentukan dengan mengukur absorbansi dari larutan baku kuersetin pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer

UV-Visible [27]. Pada penentuan OT dilakukan dengan menggunakan kuersetin 80 ppm dengan panjang gelombang teori 435 nm. Dari penelitian yang dilakukan diperoleh *operating time* pada menit ke-0 sampai menit ke-0,6 dengan hasil absorbansi yang konstan yaitu 0,5004.

Langkah ketiga adalah penentuan panjang gelombang maksimum dengan melakukan *scanning* terhadap kuersetin 80 ppm pada panjang gelombang 300-600 nm. Penentuan panjang gelombang maksimal ini bertujuan untuk mengetahui absorbansi maksimal dari sampel [28]. Larutan yang digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimal dengan spektrofotometri UV-Vis yaitu larutan standar yang konsentrasinya berada di tengah-tengah konsentrasi larutan standar kuersetin yang digunakan (80 ppm) diperoleh panjang gelombang maksimum sebesar 419,8 nm pada absorbansi 0,5952.

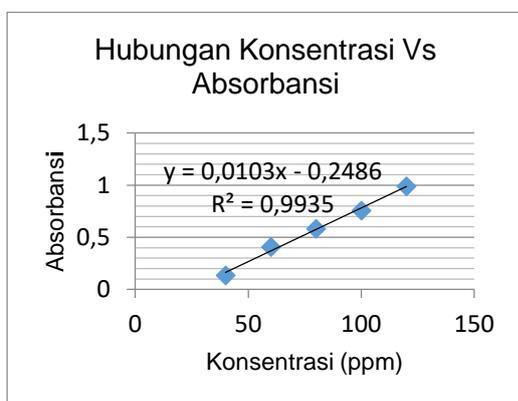
Proses selanjutnya setelah diperoleh panjang gelombang maksimum, diukur absorbansi dengan menggunakan larutan seri baku kuersetin dari 5 konsentrasi untuk membuat kurva linier dengan menggunakan panjang gelombang maksimal yang diperoleh. Pembuatan kurva baku dilakukan dengan cara membuat larutan induk kuersetin 1000 ppm dan 100 ppm. Larutan induk 100 ppm dibuat untuk larutan standar 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm yang dipipet 4 ml, 6 ml, dan 8 ml. sedangkan larutan induk 1000 ppm diambil 1 ml dan 1,2 ml untuk larutan standar 100 ppm dan 120 ppm, kemudian larutan induk yang telah dipepet tadi dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan etanol 96% sampai batas. Kemudian pipet 1 ml dan tambahkan 3 ml etanol 96%, 0,2 AlCl_3 , 0,2 asam asetat dan 5,6 ml aquadest pada masing-masing konsentrasi, setelah itu diinkubasi selama 15 menit bertujuan agar reaksi berjalan sempurna, sehingga memberikan intensitas warna yang maksimal [29]. Masing-masing konsentrasi dilakukan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang maksimum yaitu 419,8 nm. Larutan blanko yang digunakan adalah pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel, yaitu etanol 96%. Blanko yang digunakan hanya pelarut etanol 96% tidak menggunakan penambahan pereaksi karena panjang

gelombang yang dibaca hanya panjang gelombang kuersetin sehingga tidak perlu penambahan pereaksi [18].

Tabel 4.4 Absorbansi Larutan Baku Standar

Konsentrasi	Absorbansi
40 ppm	0,1362
60 ppm	0,4072
80 ppm	0,5832
100 ppm	0,7578
120 ppm	0,9903

Data absorbansi dari konsentrasi larutan seri baku kuersetin dapat dibuat kurva baku antara konsentrasi larutan kuersetin dan absorbansinya. Kurva baku dibuat untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya sehingga konsentrasi sampel dapat diketahui [30].



Gambar 4.2 Kurva Baku Kuersetin

Hasil penentuan absorbansi larutan standar tersebut dapat dilihat bahwa sesuai dengan hukum Lambert-Beer yaitu konsentrasi berbanding lurus dengan absorbansi dimana semakin tinggi nilai absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi zat yang terkandung di dalam suatu sampel [31]. Namun, pada penelitian kali ini, absorbansi dari konsentrasi yang di dapat belum memenuhi range absorbansi yang baik, karena range absorbansi yang baik yaitu berkisar 0,2 – 0,8 dan yang hanya memenuhi range yang baik yaitu pada konsentrasi 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm.

Berdasarkan gambar 4.2 Dapat dihitung regresi linear dengan bentuk persamaan $y=bx+a$ sehingga diperoleh regresi linear yaitu $Y = 0,0103x + 0,2486$ dengan nilai r (koefisien korelasi) sebesar 0,99674. Nilai r yang mendekati 1 menunjukkan kurva

kalibrasi linear dan terdapat hubungan antara konsentrasi larutan kuersetin dengan nilai serapan [32]. Nilai R^2 yang diperoleh dengan nilai 0,9935 sama dengan 99,35% angka tersebut mengandung arti bahwa konsentrasi berpengaruh terhadap absorbansi 99,35%.

Tabel 4.5 Kadar Flavonoid Ekstrak Sangketan

	Sampel I	Sampel II	Sampel III
Bobot Sampel (mg)	25	25,1	25,15
Nilai Absorbansi	0,2376	0,2380	0,2381
Kadar (mg/L)	47,2038	47,2427	47,2524
Kadar % (b/v)	47,20	47,24	47,25
Kadar Rata-Rata		47,23%	
SD		0,02645	
RSD		0,056%	

Berdasarkan tabel 4.5 Hasil Perhitungan Kadar Flavonoid Ekstrak Daun Sangketan diperoleh dengan cara memasukkan nilai absorbansi pada kurva standar kuersetin sehingga hasil dari besar kadar rata-rata flavonoid total ekstrak daun sangketan sebesar 47,23%. Semakin tinggi kadar flavonoid maka semakin tinggi juga manfaat flavonoid sebagai antioksidan. Pada umumnya, nilai keseksamaan dihitung menggunakan standar deviasi (simpan baku) untuk menghasilkan *relative standard deviation* (RSD). Standar deviasi (SD) dibutuhkan untuk membandingkan ketepatan suatu hasil, semakin kecil nilai SD dari serangkaian pengukuran, maka metode yang digunakan semakin tepat [28]. Nilai Keseksamaan (RSD) yang baik dinyatakan dengan semakin kecil persen RSD maka nilai persisi semakin tinggi. Kriteria seksama juga diberikan jika metode memberikan simpangan baku relative atau koefisien variasi $< 2\%$ atau kurang dan $RSD \leq 15\%$. Maka kecil standar deviasi, maka makin kecil koefisien variasinya [18].

Hasil perhitungan simpangan baku (SD) dari data yang diperoleh sebanyak 3 kali pengulangan sampel sebesar 0,02645 dengan nilai simpangan baku relatif (RSD) sebesar 0,056 %. Menurut Harmita (2004), nilai simpangan baku relative (RSD) $< 2\%$ menunjukkan parameter presisi memberikan

keterulangan yang dapat diterima dengan baik.

Senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun sangketan mempunyai banyak manfaat dibidang kesehatan diantaranya sebagai antioksidan, antidermatosis, kemopreventif, antikanker maupun antiviral [33]. Sehingga ekstrak daun sangketan dapat dijadikan terapi tambahan dan pencegahan suatu penyakit dengan cara dibuat menjadi sediaan farmasi. Maka dari itu, sebelum dibuat menjadi sediaan farmasi atau digunakan untuk efek terapi lain sebaiknya kita mengetahui kandungan dari flavonoid.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa pada Penetapan kadar flavonoid total pada daun sangketan secara spektrofotometri UV-Vis yaitu pada sampel 1 sebesar 47,20%, pada sampel 2 sebesar 47,24%, dan pada sampel 3 sebesar 47,25%, serta hasil rata-rata kadar yang didapat 47,23% Hasil perhitungan simpangan baku (SD) dari data yang diperoleh sebanyak 3 kali pengulangan sampel sebesar 0,02645 dengan nilai simpangan baku relatif (RSD) sebesar 0,056%.

DAFTAR PUSTAKA

- Bown, D. *Encyclopaedia of Herbs*. The Royal Horticulture Society. Dorling Kindersley. 1995; Ltd, 14.
- Srivastav S, Singh P, Mishra G, Jha KK, Khosa RL. *Achyranthes aspera-An important medicinal plant: A review*. *J. Nat. Prod. Plant Resour.* 2011; 1(1): 1-14.
- Vijayan A, Liju VB, John JV, Reena, Parthipan B, Renuka C. *Indian J. of Traditional Know.* 2007; 6(4), 589-594.
- Tijani, Y., M. O. Uguru, O. A. *African Journal of Biotechnology*. Salawu. 2008; 7(6), 696-700.
- Dhale DA and Bhoi S. Pharmacognostic Characterization and Phytochemical Screening of *Achyranthes Aspera* Linn, *Current Agriculture Research Journal*. 2013; Vol. 1(1); 51-57.
- Dwivedi S, Dubey R, Mehta K. *Achyranthes aspera linn. (Chirchira): A magic herb in folk medicine*. *Ethno Leafl.* 2008; 12:670-6.
- Fanani, Zaenal. Sangketan (*Achyranthes Aspera*) Agen Sitotoksik Potensial Di Masa Depan. *Indonesia Jurnal Farmasi*. 2017; Vol. 2 No.1. 21-27.
- Jumari. *Etnobiologi Masyarakat Samin*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. 2012.
- Chakraborty, A., Brantner, A., Mukainaka, T., Nobukuni, Y., Kuchide, M., Konoshima, T., Tokuda, H., & Nishino, H. Cancer chemopreventive activity of *Achyranthes Aspera* leaves on Etpstein-Barr virus activation and twostage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Letters*. 2002; 177(1), 1-5.
- Singleton, P. *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*. 4th edition. New York: John Wiley and Sons Ltd. 1999.
- Narayana RK, Reddy SM, Chaluvadi MR and Krishna DR. *Bioflavonoids: classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potentials*. *Indian J. Pharmacol.* 2001; 33: 2-16.
- Rijke, E. *Trace-level Determination of Flavonoids and Their Conjugates Application to Plants of The Leguminosae Family, Desertasi*. Amsterdam: Universitas Amsterdam. 2005.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E. C. S. *Dasardasar Mikrobiologi*, Jilid 1. Jakarta: UI Press. 1998.
- Raharjo, T.J. *Kimia Hasil Alam*. Cetakan I. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. 2013.
- Sriningsih, Ana. Uji Toksisitas dari Fraksi Etil Asetat dan Air Ekstrak Etanol Daun Sangketan Terhadap Larva *Artemia Salina* Leach Serta Uji Kandungan Kimianya. *Thesis*. Surabaya: University of Surabaya. 2001.
- Sugiyono. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif*. Bandung, 2010.
- Arikunto, Suharsimi. *Manajemen Penelitian*. Jakarta: Rineka Cipta. 2005.
- Kumalasari, Eka., Nazir, Ahlun, M., dan Putra A.,. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 96% Daun Bawang Dayak (*Eleutherine Palmifolia*L.) dengan

- Metode Spektrofotometri Uv-Vis, *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*. Banjarmasin: Akademi Farmasi ISFI. 2018; 1(2).
19. Katno, S. Standarisasi Ekstrak Etanol dan Eugenia Cumini, *Jurnal Sains Teknologi Farmasi*. 2008.
 20. Voight, R. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, diterjemahkan oleh Noerono Soenandi. Yogyakarta: Gajah Mada Universitas Press. 1994.
 21. Pratiwi, D., Wahdaningsih, S. Isnidar., Uji Aktivitas Antioksidan Daun Bawang Mekah (*Eleutherine americana* Merr.) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). *Traditional Medicine Journal*. 2013; Vol. 18(1).
 22. Agoes G. *Ekstraksi Tanaman Obat*. Bandung: ITB. 2007.
 23. Rahayu, P., Pengaruh Suhu Dan Lama Ekstraksi Secara Pengukuran Terhadap Rendemen Dan Kadar Albumin Ikan Gabus (*Opjiocephalus Striatus*), *Jurnal Saintik Perikanan*. 2013; Vol. 8. No. 2.
 24. Febrianti, D.R., Uji Aktivitas Anti Mikroorganisme Ekstrak Jeringau (*Acorus Calamus* L.) Terhadap Jamur *Candida Albicans* Dan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*. 2018; 1(1) 96-103.
 25. Indriyani, S., Validasi Penetapan Kadar Kuersetin Dalam Sediaan Krim Secara Kolorimetri dengan Pereaksi $AlCl_3$. *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma Yogyakarta. 2008.
 26. Chang, C, Ming, H., Hwei, M., and Chern J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002; Vol. 10 (3): 1181.
 27. Mukhlisoh, W., Pengaruh Ekstrak Tunggal dan Gabungan Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* Linn) Terhadap Efektivitas Antibakteri Secara In-Vitro'. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. 2010.
 28. Gandjar, I.G., dan Rohman, A. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. 2007.
 29. Azizah, D.N., Endang, K., dan Fahrauk, F., Penetapan Kadar Flavonoid Metode $AlCl_3$ Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). 2014; Vol. 2 (2): 45-49.
 30. Underwood, A. L. *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi ke Enam*. Jakarta: Erlangga. 1990.
 31. Neldawati, Ratnawulan dan Gusnedi., Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat, *Pillar Of Physics*. 2013; Vol. 2.
 32. Alfiansyah, Penetapan Kadar Flavonoid Dari Ekstrak Metanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Dengan Metode Spektrofotometri UV-Visible. *Karya Tulis Ilmiah*. Banjarmasin: Akademi Farmasi ISFI Banjarmasin. 2017.
 33. Amin, M.R., Analisis Kuantitatif Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.) Dengan Metode Spektrofotometri UV-Visible. *Karya Tulis Ilmiah*. Banjarmasin: Akademi Farmasi ISFI Banjarmasin. 2017.