

PENENTUAN KADAR FLAVONOID TOTAL DAN UJI ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI N-HEKSANA-ETIL ASETAT-AIR KULIT DELIMA PUTIH (*Punica Granatum L.*) MENGGUNAKAN METODE FRAP

Eny Wijayanti¹

Co-author :

¹Jurusan Farmasi Universitas Duta Bangsa Surakarta

Informasi

artikel:

Dikirim : 07-2023

Diperbaiki : 07-2023

Diterima : 08-2023



Karya ini dilisensikan di bawah aLisensi Internasional Creative Commons Atribusi-NonKomersial 4.0

Penerbit:

PC IAI Sragen

ABSTRAK

Dalam tubuh terdapat banyak sekali radikal bebas yang diperlukan untuk kesehatan dalam jumlah tertentu radikal bebas bersifat merusak dan berbahaya agar tidak kelebihan radikal bebas tubuh memerlukan antioksidan sebagai pelindung tubuh maka dalam penelitian ini akan dilakukan uji kadar flavonoid total dan uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi n-heksana, efraksi etil asetat, dan fraksi air menggunakan metode FRAP dengan tujuan mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) dan penentuan kadar flavonoid total pada kulit buah delima putih (*Puunica granatum L.*) dan mengetahui nilai aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) dengan menggunakan metode FRAP. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Tahap penelitian dimulai dari pengambilan sampel, determinasi tumbuhan, pembuatan simplisia, pembuatan ekstrak, skrining fitokimia, pembuatan larutan uji, penetapan kadar flavonoid, pengujian aktivitas antioksidan, dan analisis data. Senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid dan saponin. Kadar total flavonoid ekstrak kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) yang dilihat menggunakan spektrofotometri UV-Vis yaitu 55,3 mg QE/g. Ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air ekstrak kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai berturut-turut 2.501 mgQE/g sampel, 3.125 mgQE/g sampel, 3.055 mgQE/g sampel, 30.516 mgQE/g sampel, jika lihat menggunakan metode FRAP.

Kata kunci: Delima putih, Flavonoid, Antioksidan, FRAP

1. PENDAHULUAN

Tubuh memiliki banyak sekali radikal bebas yang diperlukan untuk kesehatan dalam jumlah tertentu. Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Radikal bebas yang terlalu banyak bersifat merusak dan sangat berbahaya. Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan sel dengan cara serangkaian reduksi asam lemak yang disebabkan oleh peroksidasi komponen lipid dari membran sitosol yang menyebabkan kerusakan organel sel dan membran, kerusakan DNA, dan modifikasi protein (Irianti, 2021). Radikal bebas dapat bersumber dari dalam dan luar tubuh. Radikal bebas yang berasal dari luar tubuh dapat dihasilkan dari asap rokok, polusi, radiasi, sinar UV, obat pestisida, limbah industri, dan ozon. Indonesia menduduki posisi ke-17 dunia dengan tingkat polusi udaranya (IQAir, 2021). Antioksidan diperlukan dalam melindungi tubuh dari aktivitas merugikan radikal bebas.

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat mendonorkan elektron kepada molekul radikal bebas sehingga dapat menstabilkan radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai

(Irianti, 2021). Antioksidan dapat bersumber dari 2 jenis, yaitu alami dan sintetik. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan alami adalah buah delima (Isrul *et al.*, 2020). Salah satu penghasil antioksidan alami adalah buah delima putih (*Punica granatum L.*). Buah delima putih memiliki aktivitas antioksidan kuat yang mampu mencegah atau mengobati kerusakan akibat stres oksidatif sehingga dapat melindungi kerusakan organ (Harling, 2019). Antioksidan yang tergantung didalam kulit buah delima membantu mencegah terjadinya penyumbatan pada pembuluh darah arteri oleh kolesterol, khususnya bagi mereka yang beresiko tinggi, delima membantu mengatur gula darah, meningkatkan sensitivitas terhadap insulin, mampu melawan peradangan, dan meningkatkan berbagai faktor lain yang terlibat dalam sindrom metabolis yang kerap dikaitkan dengan obesitas dan pemicu diabetes, karena efek ini, delima dapat membantu penurunan berat badan (Sudjijo, 2014).

Aktivitas antioksidan dibuktikan pada penelitian Resti (2020) tentang uji antioksidan ekstrak etanol buah delima putih (*Punica granatum L.*) menggunakan metode FRAP yang mendapatkan nilai IC_{50} sebesar 9,58 ppm yang menunjukkan ekstrak etanol buah delima putih (*Punica granatum L.*) memiliki aktivitas antioksidan kategori sangat kuat. Pada buah delima putih (*Punica granatum L.*) memiliki antioksidan tinggi yaitu 92% dari total antioksidan karena bagian ini kaya dengan kandungan polifenol yang terdiri dari flavonoid (antosianin, katekin dan flavonoid kompleks lainnya) dan tanin terhidrolisis (*punicallagin, pedunculagin, ellagic acid*) (Aviram *et al.*, 2008).

Buah delima putih (*Punica granatum L.*) mengandung kandungan flavonoid lebih banyak sebanyak 3 kali lipat jika dibandingkan dengan tanaman teh hijau, jeruk dan wine. Flavonoid berperan sebagai radikal bebas di dalam tubuh sehingga mampu memperbaiki sel-sel yang sudah rusak dan memberikan perlindungan pada kulit (Madhawati, 2012). Berdasarkan Penelitian di UPT Laboratorium Analitik Universitas Udayana menyatakan bahwa kulit buah delima memiliki kandungan kadar total flavonoid sebesar 1148,52 mg/100gram. Sedangkan, kandungan polifenol pada buah delima sebesar 1,56 mg/ml. Kandungan senyawa flavonoid khususnya polifenol pada biji buah delima sebanyak 14,5 % dan kulit buah delima sebanyak 31,5% (Li Y., 2006).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenol yang sering ditemukan di alam dan memiliki zat warna yang bermacam-macam diantaranya merah, ungu, biru dan kuning (Sabrina, 2015). Flavonoid ini berfungsi sebagai zat pengatur tumbuh, zat antimikroba, mengatur proses fotosintesis, antivirus, anti insektisida, anti inflamasi dan antioksidan secara langsung (Sumathy, 2013). Struktur dasar dari flavonoid yaitu *2-phenyl-benzo pyrane* atau *inti flavane*, yang terbentuk dari 2 cincin benzena yang beikatan dengan cincin pyrane (Rusmaputeri, 2018). Hal ini diperkuat oleh Kholisa (2018), tanaman delima memiliki kandungan polifenol seperti antosianin, tannin, alkaloid dan flavonoid. Pada penelitian ini di uji berbagai jenis pelarut untuk fraksinasi dari kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) yang awal mulanya di ekstrak dengan pelarut etanol.

Penelitian ini akan menentukan kandungan metabolit sekunder, menguji kadar flavonoid dan antioksidan ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan air buah delima putih (*Punica granatum L.*) menggunakan metode FRAP dengan spektrofotometri UV-Vis. Penelitian ini diharapkan memberikan pengetahuan baru terkait kandungan flavonoid dan antioksidan kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) serta mengembangkan ilmu yang diperoleh secara teoritis dan praktikum sebagai pengabdian ke masyarakat.

2. METODE

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Farmasi Prodi S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan

Universitas Duta Bangsa Surakarta dan Laboratorium Farmasetika Universitas Muhammadiyah Surakarta dari bulan Mei sampai bulan Juli tahun 2023. Tahap penelitian dimulai dari pengambilan sampel, determinasi tumbuhan, pembuatan simplisia, pembuatan ekstrak, skrining fitokimia, pembuatan larutan uji, penetapan kadar flavonoid, pengujian aktivitas antioksidan, dan analisis data.

2.1 Alat

Seperangkat alat meserasi, blender (*Cosmos*), oven, timbangan analit, beaker glass (*Pyrex*), corong kaca (*Iwaki*), penangas, gelas ukur (*Pyrex*), kaca arloji, corong pisah, ayakan no.40 dan 60, handscoon, batang pengaduk, cawan porselen, seperangkat *rotary evaporator*, Labu Erlenmeyer, tabung reaksi (*Iwaki*), mikropipet, rak tabung, labu ukur (*Iwaki*), pipet tetes, pipet volume, pH meter, kertas saring, kuvet dan alat spektrometer UV-Vis *Genesys 10S (B-one)*.

2.2 Bahan

Bahan yang digunakan antara lain n-heksana, etil asetat, aqua destilata, etanol 96%, HCl, magnesium, dragendorf, meyer, wagner, kloroform, asam asetat, FeCl₃, NaOH, AlCl₃, H₂SO₄ (asam sulfat), natrium asetat, metanol p.a, larutan dapar fosfat, Kalium ferrisianida, asam trikloroasetat (TCA), kuersetin.

2.3 Pengumpulan Bahan

Diperoleh sampel 12 kg buah delima (*Punica granatum L*) dari Desa Ringinsari, Kelurahan Wonosari, Kabupaten Gunung kidul, Yogyakarta.

2.4 Determinasi

Determinasi kebenaran simplisia buah delima yang digunakan akan dilakukan determinasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan, Banguntapan, Bantul, Yogyakarta.

2.5 Pembuatan Serbuk Simplisia

Sampel buah delima putih sebanyak 12 kg dikupas dan kulitnya dikumpulkan. Kulit buah delima yang telah dikumpulkan kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran yang menempel pada kulit buah delima putih, kemudian dicuci hingga bersih dan ditiriskan. Setelah bersih, kulit buah delima putih dirajang kecil-kecil agar memudahkan proses pengeringan dan dapat kering secara sempurna. Kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) selanjutnya dikeringkan dibawah sinar matahari selama 3 hari. Setelah kulit buah delima putih kering dilakukan sortasi kering, kemudian simplisia kering dihaluskan menggunakan blender. Serbuk diayak menggunakan pengayak ukuran 40 mesh. Hasilnya disimpan dalam wadah kering dan tertutup (Mauliandani *et al.*, 2017).

2.6 Standarisasi Simplisia

2.6.1. Penetapan susut pengeringan

Metode yang digunakan untuk mengukur susut pengeringan adalah Gravimetri. Serbuk kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) ditimbang masing-masing seberat 2 gram dalam krus porselen tertutup yang telah dipanaskan sebelumnya pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Kemudian, serbuk simplisia dipanaskan pada oven dengan suhu 105°C selama 60 menit dan didinginkan di dalam desikator hingga suhu kamar dan ditimbang. Proses pengeringan dilakukan kembali dengan suhu 105°C selama 30 menit (El'kariem *et al.*, 2022). Perbedaan berat antara dua penimbangan simplisia berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Kementerian Kesehatan RI & Direktorat Jenderal Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2020).

2.6.2. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air dilakukan menggunakan *Moisture Balance* dengan cara menimbang dan memasukkan simplisia kulit buah delima putih (*Punica granatum L*) seberat 1 gram, pada suhu 105°C. Proses tersebut dilakukan selama 10 menit dan sebanyak 2 kali (Alifiawati *et al.*, 2018).

2.7 Ekstraksi

Pembuatan ekstrak etanol kulit buah delima putih (*Punica granatum L*) dilakukan dengan metode maserasi. Sebanyak 300 gram serbuk kulit buah delima putih dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 3000 ml (1:10), dilakukan 3 x 24 jam dengan beberapa kali pengadukan dan dilakukan penyaringan. Residu penyaringan maserasi kemudian dilakukan remaserasi atau maserasi kembali dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 500 ml (1:2,5) selama 1 x 24 jam kemudian dilakukan penyaringan kembali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan menjadi satu dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C - 60°C dan dikentalkan di atas

waterbath sehingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian ekstrak kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) di hitung % Rendemen ekstrak (Lindawati & Ma'ruf, 2020).

2.8 Standarisasi Ekstrak

2.8.1. Penetapan susut pengeringan

Metode yang digunakan untuk mengukur susut pengeringan adalah Gravimetri. Serbuk kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) ditimbang masing-masing seberat 2 gram dalam krus porselin bertutup yang telah dipanaskan sebelumnya pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Kemudian, serbuk simplisia dipanaskan pada oven dengan suhu 105°C selama 60 menit dan didinginkan di dalam desikator hingga suhu kamar dan ditimbang. Proses pengeringan dilakukan kembali dengan suhu 105°C selama 30 menit (El'kariem *et al.*, 2022). Perbedaan berat antara dua penimbangan simplisia berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Kementerian Kesehatan RI & Direktorat Jenderal Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2020).

2.8.2. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance* dengan cara memasukan ekstrak 2 g dalam wadah yang telah ditara dan ditimbang secara seksama. Kemudian dikeringkan pada suhu 105°C selama 30 menit dan ditimbang. Pengeringan dilanjutkan kembali dan ditimbang pada jarak waktu 1 jam sampai perbedaan berat penimbangan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 10 % (Supomo *et al.*, 2016).

2.9 Skrining Fitokimia

2.11.1. Uji tabung (reaksi warna)

a. Alkaloid

Ditimbang 2 gram serbuk ekstrak, kemudian digerus dengan 5 ml amoniak kemudian ditambah 20 ml kloroform dan disaring. Filtrat ditambah HCl kemudian diambil lapisan bagian atas dan dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi. Ditetesi dengan peraksi mayer pada tabung reaksi 1 dan akan terbentuk endapan berwarna coklat jika mengandung alkaloid. Larutan kedua ditambah dengan 2 tetes pereaksi dragendorf akan terbentuk endapan jingga atau merah cokelat. Kemudian pada tabung 3 ditetesi pereaksi burchard dan membentuk endapan berwarna putih jika tidak mengandung alkaloid.

b. Flavonoid

Ditimbang 2 gram serbuk ekstrak ditambah 100 ml air panas dan di didihkan selama 15 menit kemudian disaring sebanyak 5 ml filtrat ditambah dengan serbuk mg dan 2 ml larutan alkohol-HCl (1:1). Kemudian ditambahkan amil alkohol lalu dikocok kuat-kuat dan dibiarkan memisah. Terbentuknya warna jingga atau kuning pada lapisan amil alkohol menunjukkan hasil yang positif.

c. Saponin

Ditimbang 2 gram ekstrak kemudian ditambah 100 ml air panas dan didinginkan. Dimasukan sebanyak 20 ml filtrat ke dalam tabung reaksi lalu dikocok kuat selama 15 menit, kemudian didiamkan dan ditambah HCl 2 N. Jika terbentuk buih dan tidak hilang setelah penambahan HCl, maka sampel mengandung saponin.

d. Tanin

Ditimbang 2 gram ekstrak kemudian ditambahkan 100 ml air panas dan didihkan selama 15 menit kemudian disaring. Disiapkan 2 tabung reaksi yang berisi masing-masing 5 ml. filtrat kemudian tabung 1 ditambahkan FeCl₃ 1 % (positif ditunjukkan dengan warna hijau violet kehitaman). Tabung 2 ditambahkan gelatin (positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih).

e. Terpenoid dan steroid

Ditimbang 2 gram ekstrak sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 2 mL etil asetat dan dikocok. Lapisan etil asetat diambil lalu ditetesi pada plat tetes dibiarkan sampai kering. Setelah kering, ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Apabila terbentuk warna merah atau kuning berarti positif terpenoid. Apabila terbentuk warna hijau berarti positif steroid.

2.11.2. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Skrining fitokimia dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan fase diam plat KLT silika gel GF245 dengan panjang 8 cm dan lebar 1 cm dengan jarak eluen 6 menggunakan eluen n-butanol : amonia dengan perbandingan (5 : 0,5).

a. Alkaloid

Identifikasi senyawa Fenolik/Tanin menggunakan pereaksi semprot (penampak noda) FeCl_3 10 % hasil positif menunjukkan adanya spot berwarna biru kehitaman pada sinar tampak.

b. Flavonoid

Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan pereaksi semprot (penampak noda) AlCl_3 10 % hasil positif menunjukkan adanya spot berwarna kuning pada sinar tampak dan spot berfluoresensi biru pada UV 366 nm.

c. Fenolik/Tanin

Identifikasi senyawa Fenolik/Tanin menggunakan pereaksi semprot (penampak noda) FeCl_3 10 % hasil positif menunjukkan adanya spot berwarna biru kehitaman pada sinar tampak.

d. Terpenoid dan steroid

Identifikasi senyawa terpenoid menggunakan pereaksi semprot (penampak noda) Anisaldehyde- H_2SO_4 hasil positif menunjukkan adanya spot berwarna merah keunguan/merah kecoklatan pada sinar tampak dan spot berfluoresensi hijau kebiruan pada UV 366 nm (Khaerati dan Ihwan, 2011).

e. Saponin

Identifikasi saponin menggunakan pereaksi *Lieberman Burchard* akan membentuk cincin coklat atau violet yang menunjukkan adanya triterpene, sedangkan warna hijau atau biru menunjukkan adanya saponin steroid (Bintoro *et al.*, 2017).

2.10 Fraksinasi

Pembuatan fraksi n-heksana, etil asetat dan air dilakukan dengan menimbang 12 gram ekstrak kental dilarutkan dengan etanol 96% ditambah akuades hingga 150 ml dan dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian difraksinasi dengan n-heksana. Fraksinasi n-heksana dilakukan sebanyak tiga kali. Sari yang didapat dari fraksinasi n-heksana dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C . Hasil fraksinasi ini disebut fraksi n-heksana. Lapisan sisa fraksinasi n-heksana (lapisan air) kemudian ditambah dengan etil asetat. Fraksinasi etil asetat sebanyak tiga kali. Hasil yang didapat dari fraksinasi etil asetat dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C , hasil fraksi ini disebut fraksi etil asetat. Sisa hasil fraksinasi n-heksana dan etil asetat kemudian dipekatkan dengan cara diuapkan di atas penangas air, hasilnya disebut fraksi air (Mus *et al.*, 2017).

2.11 Penentuan Kadar Flavonoid Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*)

2.11.1. Pembuatan kurva baku kuersetin

Diambil larutan standar kuersetin 100 ppm, kemudian dibuat beberapa konsentrasi yaitu 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan standar kuersetin dipipet 1 ml. Kemudian ditambahkan 1 ml AlCl_3 10% dan 1 ml natrium asetat 1M. Sampel diinkubasi selama waktu operating time yang diperoleh. Absorbansi ditentukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Aminah *et al.*, 2017).

2.11.2. Penetapan kadar flavonoid

Sebanyak 10 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam 10 ml etanol, larutan tersebut dipipet 1 ml kemudian ditambahkan 1 ml larutan AlCl_3 10% dan 1 ml natrium asetat 1 M. Sampel diinkubasi selama waktu *operating time* pada suhu kamar. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Sampel dibuat dalam tiga replikasi untuk setiap analisis dan diperoleh nilai rata-rata absorbansi (Aminah *et al.*, 2017). Absorbansi sampel sebagai kadar flavonoid total yang diperoleh dinyatakan sebagai (mg QE/mg) jumlah mg ekuivalen kuersetin (QE) pada tiap gram ekstrak dan fraksi (Mukhriani *et al.*, 2019).

2.12 Uji Aktivitas Antioksidan Metode *Ferric Reducing Antioxidant Power FRAP*

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi kulit buah delima putih dilakukan dengan metode FRAP berdasarkan metode yang dikemukakan oleh Vijayalakshmi & Ruckmani, (2016).

2.12.1. Pembuatan larutan seri konsentrasi kuersetin

Sejumlah 25 mg kuersetin ditimbang seksama dan dilarutkan dalam 25 ml asam oksalat 1% kemudian dikocok hingga homogen. Larutan kuersetin dibuat dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Masukkan ke dalam labu tentukur 5 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol pro analisis hingga 5 ml lalu dihomogenkan (Raharjo, 2019).

2.12.2. Penetapan larutan seri konsentrasi sampel

Sejumlah 10 mg ekstrak ditimbang saksama dan dilarutkan dalam 100 ml etanol 96% (100 ppm). Kemudian dibuat seri konsentrasi sebagai berikut 5, 10, 25, 50, dan 100 ppm dengan mengambil masing-masing 0,5 ml, 1 ml, 2,5 ml, 5 ml, dan 10 ml. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml dan dicukupkan volumenya dengan etanol 96% hingga 10 ml lalu dihomogenkan (Harmita, 2006).

2.12.3. Pembuatan larutan blanko

Sebanyak 2 ml dapar fosfat (pH 6,6) dan 1 ml kalium ferisianida dimasukkan kedalam tabung reaksi dan inkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. setelah diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA, larutan disentrifuge pada kecepatan 3.000 rpm selama 20 menit, kemudian diambil 1 ml lapisan atas kemudian tambahkan 1 ml aquadest dan 0,5 ml FeCl₃ 0,1%. Inkubasi selama operating time dan ukur serapan pada panjang gelombang maksimum (Raharjo, 2019).

2.12.4. Pengukuran aktivitas antioksidan kuersetin

Diambil sebanyak 1 ml dari masing-masing konsentrasi kuersetin (5, 10, 15, 20, dan 25 ppm) selanjutnya ditambah dengan 1 ml dapar fosfat (pH 6,6) dan 1 ml kalium ferisianida dimasukkan kedalam tabung reaksi dan inkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA, larutan disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil 1 ml lapisan atas kemudian tambahkan 1 ml aquadest dan 0,5 ml FeCl₃ 0,1%. Inkubasi selama *operating time* dan ukur serapan pada panjang gelombang maksimum (Raharjo *et al.*, 2022).

2.12.5. Pengukuran aktivitas antioksidan sampel

Diambil sebanyak 1 ml dari masing-masing konsentrasi sampel (Ekstrak etanol dan fraksi kulit buah delima) dengan konsentrasi 5, 10, 25, 50, dan 100 ppm) selanjutnya ditambah dengan 1 ml dapar fosfat (pH 6,6) dan 1 ml kalium ferisianida dimasukkan kedalam tabung reaksi dan inkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. setelah diinkubasi larutan ditambahkan 1 ml TCA, larutan disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil 1 ml lapisan atas kemudian tambahkan 1 ml aquadest dan 0,5 ml FeCl₃ 0,1%. Inkubasi selama *operating time* dan ukur serapan pada panjang gelombang maksimum (Maryam, 2015).

2.13 Analisis Data

Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode FRAP berdasarkan Nurinnafi'a, (2022) pengukuran presentase aktivitas antioksidan FRAP dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100 \%$$

Keterangan:

A blanko = serapan larutan radikal FRAP (Nurinnafi'a dkk., 2022)

A sampel = serapan radikal FRAP setelah diberi perlakuan larutan sampel.

3. HASIL DAN DISKUSI

3.1 Determinasi dan Preparasi Sampel Kulit Buah Delima Putih

Hasil determinasi tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar buah delima putih (*Punica granatum L.*). Tujuan dilakukan daterminasi untuk mengetahui kebenaran dari sampel kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) yang akan digunakan untuk penelitian guna menghindari kesalahan dan tercampurnya bahan dengan tanaman lain dalam pengumpulan

sampel. Preparasi dilakukan dengan cara mengumpulkan dan mencuci 12 kg buah delima putih (*Punica granatum L.*). Pencucian dilakukan dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan residu-residu yang menempel pada kulit buah delima putih. Delima putih yang telah bersih kemudian dilakukan sortasi basah, hasil dari sortasi basah dilakukan pengupasan kulit buah delima putih di dapatkan bobot basah 960 gram kemudian dilakukan proses pengeringan. Proses pengeringan dilakukan dengan menggunakan sinar matahari dengan ditutup kain hitam selama 5 hari di dapatkan hasil 565 gram dan jumlah randemennya didapatkan hasil 53,09%.

Kulit delima putih (*Punica granatum L.*) dilakukan sortasi kering, kemudian penyerbukan dilakukan menggunakan blender. Penyerbukan dilakukan dengan tujuan memperkecil partikel kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) sehingga mempermudah kontak dengan pelarut dan penyarian dapat berlangsung secara efektif. Serbuk kemudian diayak dengan ayakan no 40 mesh. Hasil serbuk kulit delima putih (*Punica granatum L.*) yang telah diayak didapatkan serbuk kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) sebanyak 300 gram dari 565 gram bobot simplisia kering dengan randemen 53,09%.

3.2 Standarisasi Serbuk Simplisia Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*)

Standarisasi Serbuk Simplisia kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) dilakukan dengan standarisasi terlebih dahulu. Standarisasi simplisia dilakukan dengan harapan dapat menjamin kualitas sampel yang digunakan dalam penelitian. Standarisasi serbuk simplisia meliputi penetapan susut pengeringan dan penetapan kadar air.

3.2.1. Susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk memberikan rentang maksimal senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Parameter susut pengeringan merupakan parameter non spesifik yang mengukur kurangnya residu bahan setelah dilakukan pengeringan. Nilai yang didapatkan dari susut pengeringan serbuk yaitu 8,25 %, 8,5 %, 8,5 % dan dapat dilihat pada **Tabel 1.**

Tabel 1. Susut pengeringan serbuk

Replikasi	Berat Sampel (g)	Berat krus kosong (g)	Berat sampel sebelum pemanasan (g)	Berat sampel setelah pemanasan (g)	Nilai susut pengeringan (%)
1	2	31,735	33,760	33,570	8,25
2	2	31,735	33,760	33,565	8,5
3	2	31,735	33,760	33,565	8,5

3.2.2. Penetapan kadar air serbuk

Uji penetapan kadar air suatu serbuk bertujuan untuk melihat kandungan air yang terkandung dalam serbuk. Kadar air dalam serbuk harus seminimal mungkin karena jika kadar air yang terkandung dalam serbuk terlalu tinggi maka dapat menyebabkan bahan rentan ditumbuhi mikroba yang dapat mempengaruhi kandungan dalam bahan. Struktur kimia yang terkandung pada senyawa aktif yang terkandung dalam serbuk halus akan terpengaruh oleh air yang terkandung. Penetapan kadar air serbuk simplisia kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) menggunakan alat *Moisture Balance*. Hasil penetapan kadar air dalam serbuk simplisia kulit delima putih (*Punica granatum L.*) sebanyak 2,30 (% b/b). Dari hasil penetapan kadar air tersebut dapat disimpulkan bahwa kadar air yang terkandung dalam serbuk simplisia kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) sudah memenuhi syarat.

3.3 Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*)

Pembuatan ekstrak kulit delima putih (*Punica granatum L.*) dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 300 gram serbuk kulit delima putih (*Punica granatum L.*) diekstraksi dengan etanol sebanyak 3000 ml. Metode maserasi dipilih karena proses yang mudah, tidak menggunakan suhu tinggi yang mungkin dapat merusak senyawa kimia yang memiliki aktivitas antioksidan dalam kulit delima putih (*Punica granatum L.*), serta tidak

memakan biaya yang mahal. Pelarut etanol 96% digunakan karena etanol merupakan pelarut yang bersifat universal yang dapat melarutkan analit yang bersifat polar, semi polar, dan non polar. Maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam dengan beberapa kali pengadukan untuk menarik zat aktif yang terkandung dalam kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*). Setelah 3 x 24 jam dilakukan penyaringan. Residu penyaringan maserasi kemudian dilakukan remaserasi dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 1.000 ml selama 1 x 24 jam. Hasil remaserasi kemudian disaring dan disatukan dengan hasil maserasi awal dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40 - 60°C dan dipanaskan diatas *waterbath* untuk mendapatkan ekstrak kental. Hasil bobot serbuk diperoleh sebanyak 300 gram dan bobot ekstrak yang diperoleh sebanyak 117,77 gram hasil rendemen yang diperoleh dari proses maserasi dan remaserasi didapatkan hasil 39,25 %.

3.3.1. Susut pengeringan ekstrak

Penetapan Susut Pengeringan ekstrak bertujuan untuk memberikan rentang maksimal senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Parameter susut pengeringan merupakan parameter non spesifik yang mengukur kurangnya residu bahan setelah dilakukan pengeringan. Hasil penetapan kadar air dinyatakan dalam persen. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) didapatkan nilai susut pengeringan 6,5 %, 6%, 6% dapat dilihat pada tabel **Tabel 2**.

Tabel 2. Susut pengeringan ekstrak

Replikasi	Berat Sampel (g)	Berat krus kosong (g)	Berat sampel sebelum pemanasan (g)	Berat sampel setelah pemanasan (g)	Nilai susut pengeringan (%)
1	2	31,735	33,725	33,605	6,5
2	2	31,735	33,725	33,615	6
3	2	31,735	33,725	33,615	6

3.3.2. Penetapan kadar air ekstrak

Uji penetapan kadar air suatu ekstrak bertujuan untuk melihat kandungan air yang terkandung dalam ekstrak. Kadar air dalam ekstrak harus seminimal mungkin karena jika kadar air yang terkandung dalam ekstrak terlalu tinggi maka dapat menyebabkan bahan rentan ditumbuhi mikroba yang dapat mempengaruhi kandungan dalam bahan. Struktur kimia yang terkandung pada senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak akan terpengaruh oleh air yang terkandung. Penetapan kadar air ekstrak simplisia kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) menggunakan alat *Moisture Balance*. Hasil penetapan kadar air dalam serbuk simplisia kulit delima putih (*Punica granatum L.*) sebanyak 1,00 (% b/b). Dari hasil penetapan kadar air tersebut dapat disimpulkan bahwa kadar air yang terkandung dalam ekstrak simplisia kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) sudah memenuhi syarat.

3.4 Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*)

Identifikasi senyawa kimia atau skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*). Metabolit sekunder yang diuji secara kualitatif ini adalah flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid, dan tanin. Skrining fitokimia dapat dilakukan dengan 2 metode, yaitu metode uji tabung (kompleks warna) dan uji KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Kandungan fitokimia ekstrak etanol kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil uji fitokimia Ekstrak Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*)

Golongan senyawa	Jenis Uji	Tanda positif	Hasil pengamatan	Kesimpulan
Alkaloid	Mayer	Tidak terbentuk endapan putih	Tidak terbentuk endapan putih kekuningan	

	Dragendrof	Terbentuk endapan jingga / merah coklat	Terbentuk endapan merah kecoklatan	(+)
	Burchard	Terbentuk endapan coklat	Terbentuk endapan coklat kehitaman	
	Sitoborat	Terdapat bercak berwarna jingga di UV 366	Terbentuk bercak berwarna jingga di UV 366 pada Rf 0,47	
Flavonoid	Mg + HCl pekat	Perubahan warna kuning, orange, merah jingga sampai keunguan	Terjadi perubahan warna menjadi merah keunguan	(+)
	Dragendoff	Terdapat bercak berwarna kuning kehijauan di UV 366	Terbentuk bercak berwarna kuning kehijauan di UV 366 pada Rf 0,75	
saponin	Air suling	Terbentuk busa stabil	Terbentuk busa stabil	
	Liberman burchad	Terdapat bercak berwarna kuning kehijauan di UV 366	Terbentuk bercak berwarna kuning kehijauan di UV 366 pada Rf 0,45	(+)
tannin	FeCl ₃ 5%	Terbentuk warna biru tua, hijau kehitaman atau hitam	Terjadi perubahan warna menjadi hijau gelap / kehitaman (Rf 0,67)	(+)
triterpenoid	Libermann-Burchard	Terbentuk cincin Kecoklatan	Terdapat warna merah kecoklatan	
		Terdapat warna hijau muda kekuningan pada UV 366	Terbentuk bercak berwarna hijau mudah kekuningan di UV 366 pada Rf 0,85	(+)

3.5 Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*)

Fraksinasi dilakukan dengan cara melarutkan 10 gram ekstrak menggunakan 100 ml air hangat dan diaduk hingga larut. Fraksinasi metode partisi cair-cair menggunakan alat corong pisah. Tujuan dilakukannya fraksinasi adalah untuk memisahkan golongan senyawa berdasarkan perbedaan tingkat kepolarannya. Fraksinasi ekstrak kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol air.

Fraksinasi pertama dilakukan dengan menambahkan pelarut n-heksana sebanyak 100 ml. Setelah ditambahkan pelarut n-heksana dan dikocok akan terbentuk menjadi dua fase, fase atas adalah fase n-heksana. Fase n-heksana memiliki berat jenis 0,560 gram yang berarti lebih kecil dibandingkan dengan fase etanol air yang memiliki berat jenis 0,986 gram. Fraksinasi diulang sebanyak dua kali. Hasil fraksinasi n-heksana kemudian dipisahkan dan dipekatkan diatas *waterbath*.

Fase kedua menggunakan pelarut etil asetat yang memiliki berat jenis 0,902 gram. Etil asetat memiliki sifat pelarut semi polar, pelarut yang digunakan untuk pelarut senyawa flavonoid, tanin, dan alkaloid. Fase etil asetat berada diatas karena berat jenis etil asetat lebih kecil dari fase etanol air. Kedua fase dipisahkan dan dilakukan fraksinasi ulang pada fase etanol air sebanyak dua kali. Hasil fraksinasi dari kedua fase dipisahkan dan dipekatkan diatas *waterbath* hingga terbentuk hasil yang pekat. Hasil rendemen fraksinasi dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*)

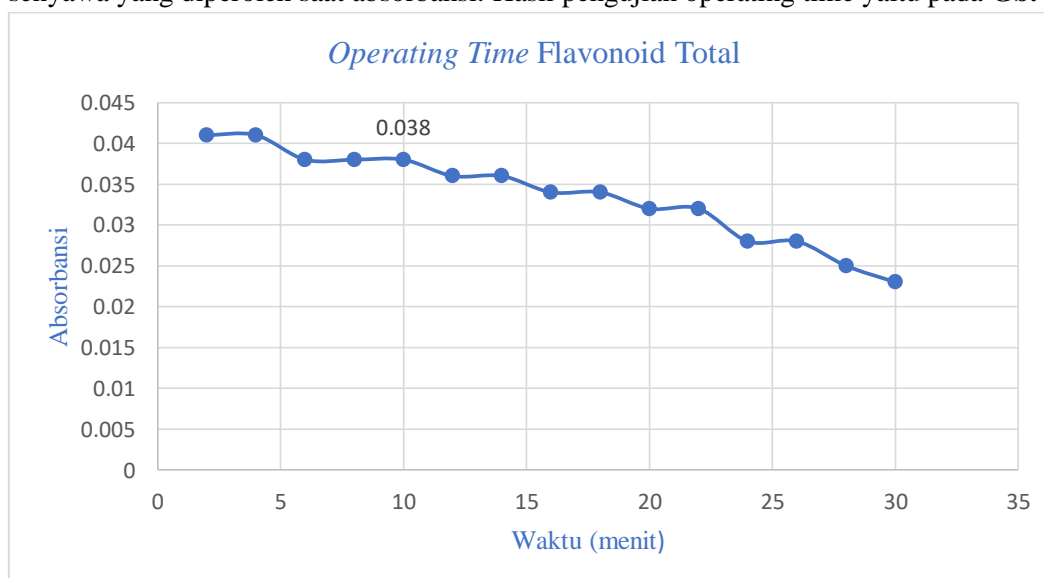
Bobot Ekstrak (g)	Pelarut Fraksi	Bobot Fraksi (g)	Randemen (%) b/b
10	N-Heksana	3,3	33 %
10	Etil Asetat	1,52	15,2 %
10	Air	1,2	12 %

3.6 Penetapan Kadar Total Flavonoid

Penetapan kadar total flavonoid dilakukan dengan pengukuran absorbansi sampel kulit buah delima putih (*Punica granatum* L) menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Ekstrak etanol kulit buah delima putih direaksikan dengan $AlCl_3$ dan natrium asetat yang akan menjadikan larutan berwarna kuning. Penetapan kadar total flavonoid menggunakan larutan baku kuersetin. Kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keto pada C-4 dan memiliki gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol sehingga kuersetin digunakan sebagai larutan standar dalam penetapan kadar flavonoid (Aminah *et al*, 2017). Kuersetin termasuk dalam senyawa flavonoid yang mempunyai reaktivitas tinggi dibandingkan rutin, daflon, diosmin dan morin (Dewi *et al*, 2018). Pemilihan kuersetin sebagai larutan baku juga karena kemampuannya bereaksi dengan $AlCl_3$ dalam membentuk kompleks. Penambahan Natrium Asetat pada penetapan kadar flavonoid digunakan sebagai pereaksi geser untuk mendeteksi adanya gugus 7- OH, dan untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah *visible* (Suwartini *dkk*, 2021).

Tahap penetapan kadar flavonoid dimulai dari penetapan panjang gelombang maksimum, *operating time* dan pembuatan kurva baku kuersetin dapat dilakukan terlebih dahulu sebelum melakukan penetapan kadar total flavonoid pada ekstrak etanol kulit buah delima putih (*Punica granatum* L). Dilakukannya penetapan panjang gelombang maksimum memiliki tujuan untuk menentukan panjang gelombang pengukuran dimana kompleks antara kuersetin dengan $AlCl_3$ memberikan absorbansi yang optimum dan memberikan kepekaan tinggi (Suharyanto dan Prima, 2020). Penetapan panjang gelombang maksimum dilakukan pada panjang gelombang 400-450 nm. Dari penetapan panjang gelombang maksimum diperoleh 430 nm dengan absorbansi 0,085.

Pengukuran pada panjang gelombang maksimum akan memberikan perubahan absorbansi paling besar untuk setiap satuan kadar, sehingga jika dibuat menjadi beberapa replikasi akan meminimalkan terjadinya kesalahan pengukuran. Panjang gelombang maksimum kuersetin yang telah diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan *operating time*. *Operating Time* perlu dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui waktu paling stabil dalam pengukuran suatu senyawa yang diperoleh saat absorbansi. Hasil pengujian *operating time* yaitu pada **Gb. 1**.



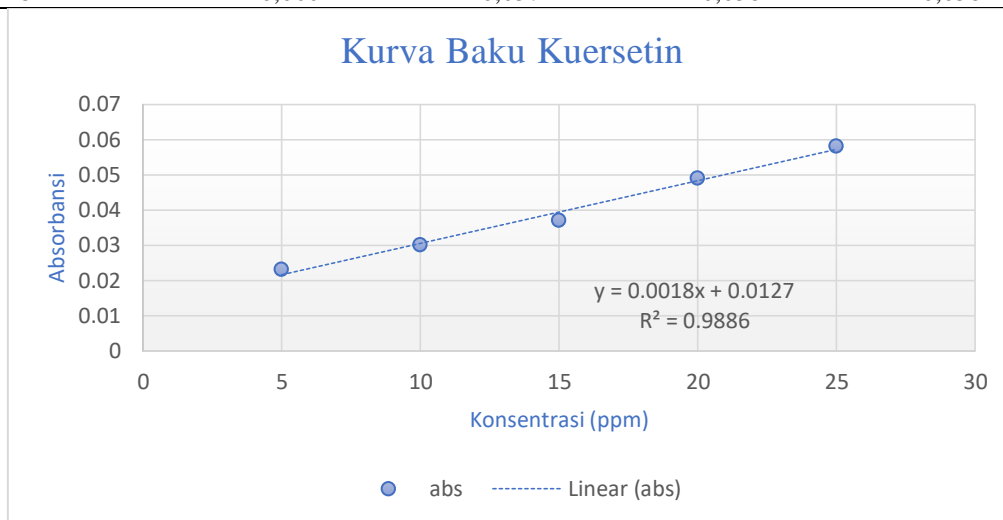
Gambar 1. Spektra *operating time*

Berdasarkan hasil penentuan *operating time* kuersetin yang diperoleh dapat diketahui bahwa nilai absorbansi yang stabil terletak pada menit ke 6 - 10. Pengukuran absorbansi dilakukan pada menit ke-10 diperoleh nilai absorbansi stabil pada angka 0,038. Hasil *operating time* yang diperoleh digunakan sebagai waktu perlakuan inkubasi larutan sebelum pengukuran, yang bertujuan untuk membuat reaksi berjalan sempurna sehingga memberikan intensitas warna yang maksimal (**Tabel 5**). Pada penentuan kurva baku kuersetin (**Gb. 2**) didapatkan persamaan

regresi linier antara konsentrasi kuersetin (sumbu x) versus absorbansi (sumbu y) dan didapat kan persamaan $y = 0,0018x + 0,0127$ dengan nilai koefisien korelasi ($r = 0,9886$).

Tabel 5. Data absorbansi kurva baku kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata-rata
	1	2	3	
5	0,022	0,024	0,024	0,023
10	0,031	0,030	0,030	0,030
15	0,037	0,036	0,039	0,037
20	0,051	0,047	0,049	0,049
25	0,060	0,057	0,058	0,058



Gambar 2. Persamaan linier kurva baku kuersetin

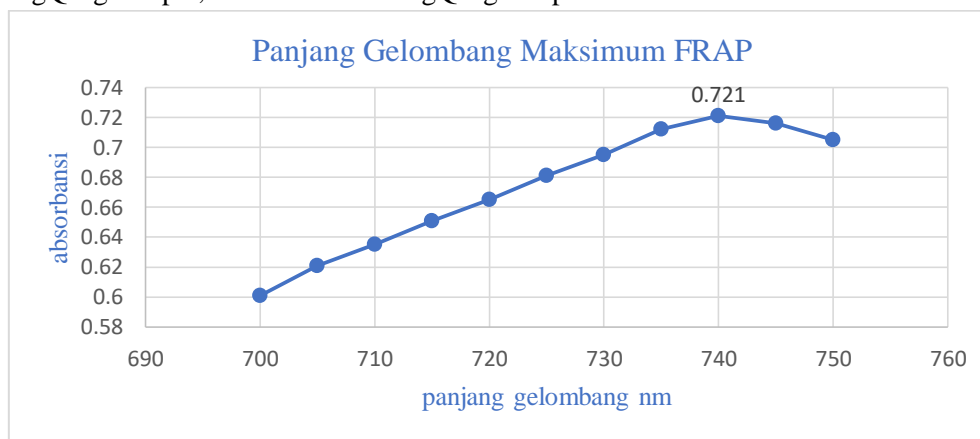
Penetapan kadar flavonoid dilakukan pada ekstrak etanol kulit buah delima putih (*Punica granatum* L) dengan konsentrasi 1000 ppm didapatkan nilai x 5,17 ppm, 6,28 ppm, 4,61 ppm, pada perhitungan kadar flavonoid total didapatkan nilai 51,7 mg QE/g, 62,8 mg QE/g, 46,1 mg QE/g dengan rata-rata kadar total flavonoid sebesar 55,3 mg QE/g.

3.7 Uji Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum* L.) dengan Metode FRAP

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode FRAP dilakukan pada ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol air dari kulit buah delima putih (*Punica granatum* L). Prinsip metode FRAP adalah didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan untuk mereduksi ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} sehingga daya antioksidan suatu senyawa dianalogikan dengan kemampuannya kurangi itu. Penambahan larutan TCA berfungsi untuk mengendapkan kompleks kalium ferrosianida. Sedangkan penambahan $FeCl_3$ berfungsi untuk membentuk kompleks hijau ke biru (biru berlin). Jadi pengurangan kemampuan dapat ditentukan dengan mengukur kompleks warna pada 721 nm. Senyawa yang memiliki kekuatan untuk mengurangi cenderung bertindak sebagai antioksidan karena mereka dapat menstabilkan radikal dengan mendonor elektron atau atom hidrogen sehingga senyawa radikal menjadi lebih stabil. Sebelum dilakukan pengujian aktivitas antioksidan pada sampel kulit buah delima putih (*Punica granatum* L), terlebih dahulu dilakukan penetapan panjang gelombang maksimum. Pengukuran panjang gelombang maksimum menggunakan kuersetin pada konsentrasi 20 ppm. Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan pada panjang gelombang 700-750 nm.

Berdasarkan grafik hasil panjang gelombang maksimum (**Gb. 3**) dapat diketahui bahwa panjang gelombang maksimum FRAP yang diperoleh adalah 740 nm dengan nilai absorbansi 0,721. Setelah didapatkan panjang gelombang maksimum, selanjutnya menentukan *operating time*. Penentuan *operating time* dilakukan untuk mengukur kestabilan reaksi antara larutan FRAP dengan kuersetin. Penentuan *operating time* dilakukan dengan interval waktu 2 menit selama 20 menit pada panjang gelombang maksimum 740 nm.

Penentuan aktivitas antioksidan terhadap kuersetin sebagai baku pembanding dan sampel menggunakan ekstrak etanol, fraksi etanol air, fraksi nheksana, dan fraksi etil asetat dari kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) dengan deret konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm. Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode FRAP dapat dilihat pada **Tabel 6**. Berdasarkan nilai aktivitas antioksidan yang diperoleh dapat diketahui bahwa rata-rata nilai aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) adalah 2.500 mgQE/g sampel, fraksi n-heksana 3.125 mgQE/g sampel, fraksi etil asetat 3.055 mgQE/g sampel, fraksi air 3.024 mgQE/g sampel.



Gambar 3. Penentuan panjang gelombang maksimal kuersetin

Tabel 6. Data aktivitas antioksidan FRAP

Sampel	Absorbansi	Aktivitas (mgQE/g sampel)	Rata-rata (mgQE/g sampel)
ekstrak etanol	0,638	2.504,2	2.500
	0,636	2.483,2	
	0,639	2.514,7	
fraksi n-heksana	0,696	3.114,7	3.125
	0,697	3.125,3	
	0,698	3.135,8	
fraksi etil asetat	0,710	3.262,1	3.055
	0,671	2.851,6	
	0,690	3.051,6	
fraksi air	0,685	2.998,9	3.024
	0,687	3.020,0	
	0,690	3.051,6	

4. KESIMPULAN

Senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid dan saponin. Kadar total flavonoid ekstrak kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) yang dilihat menggunakan spektrofotometri UV-Vis yaitu 55,3 mg QE/g. Ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air ekstrak kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) memiliki nilai aktivitas antioksidan dengan rata rata nilai 2.500 mg QE/g sampel, 3.125 mg QE/g sampel, 3.055 mg QE/g sampel, 3.024 mg QE/g sampel jika dilihat menggunakan metode FRAP. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, penulis menyarankan perlu dilakukan isolasi untuk mengetahui senyawa senyawa aktif pada ekstrak kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) yang dapat berperan dalam aktivitas antioksidan.

5. PENGAKUAN

Penulis berterimakasih kepada petugas dan kepala Laboratorium Bahan Alam Farmasi Prodi S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Duta Bangsa Surakarta dan Laboratorium Farmasetika Universitas Muhammadiyah Surakarta yang membantu penulis melaksanakan penelitian ini.

6. REFERENSI

- Lindawati, N., & Ma'ruf, S. H. (2020). Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dengan Metode Kompleks Kolorimetri Secara Spektrofotometri Visibel. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 6(1), 83–91.
- Mauliandani, D., Lukmayani, Y., & Sadiyah, E. R. (2017). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid yang Berpotensi sebagai Antioksidan dari Herba Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.). *Prosiding Farmasi*, 3(2), 294–302.
- Mukhriani, M., Rusdi, M., Arsul, M. I., Sugiarna, R., dan Farhan, N. (2019). Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Anggur (*Vitis vinifera* L). *Ad-Dawaa' Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2).
- Sabrina, G. A., & Probosari, N. (2015). Daya Antibakteri Fraksi n-butanol Kulit Buah Delima Putih (*Granati fructus cortex*) terhadap *Streptococcus mutans*. *Jurnal Pustaka Kesehatan*, 3(3), 536–541.
- Suharyanto, dan Prima, D. A. N. (2020). Penetapan Kadar Flavonoid Total pada Juice Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L.) yang Berpotensi Sebagai Hepatoprotektor dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Cendekia Journal of Pharmacy*, 4(2), 110–119.
- Suwartini, Lusi. Nopri Yanti, W. E. (2021). Optimasi Kondisi Pengujian Senyawa Flavonoid Total di dalam Ekstrak Tanaman Sebagai Pengayaan Bahan Ajar Praktikum Makromolekul dan Hasil Alam di Laboratorium Kimia Organik. *Jurnal Penelitian Sains*, 23(1), 28–35.
- Vijayalakshmi, M., & Ruckmani, K. (2016). Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(3), 570–572. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i3.27663>.