

PERBANDINGAN METODE FERMENTASI, EKSTRAKSI, DAN KEPOLARAN PELARUT TERHADAP KADAR TOTAL FLAVONOID DAN STEROID PADA DAUN SUKUN (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg)

Hesti Riasari^{1,*}, Sani Nurlaela Fitriansyah¹, Irna Siti Hoeriah¹

¹Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia, Jl. Soekarno-Hatta No.354 Bandung 40266

*Alamat korespondensi: hestiriasari@stfi.ac.id

Abstrak

Daun sukun mengandung metabolit sekunder antara lain flavonoid, polifenol, kuinon, dan steroid. Proses biosintetik dapat menyebabkan perubahan warna, kandungan, dan jenis kandungan yang ada pada daun sukun. penelitian menggambarkan konsentrasi total metabolit sekunder yang dipisahkan berdasarkan polaritas pelarut dan metode ekstraksi. Proses biosintetik adalah fermentasi daun hijau segar menjadi daun hijau fermentasi (HF) melalui metode fermentasi aerob dan anaerob. Ekstraksi dilakukan dengan dua metode yaitu metode panas (sokletasi) dan metode dingin (maserasi) untuk membandingkan metode ekstraksi yang lebih baik. Ekstraksi dilakukan dengan kepolaran bergradasi menggunakan pelarut N-heksana, etil asetat, dan etanol. Ekstraksi kepolaran bertingkat akan menghasilkan senyawa-senyawa tertentu yang terpisah secara spesifik pada setiap pelarut yang digunakan, oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh data ilmiah mengenai pengaruh metode fermentasi, metode ekstraksi, dan gradien polaritas pelarut terhadap kandungan flavonoid dan steroid total ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg). Hasil kandungan flavonoid total tertinggi adalah ekstrak etil asetat dari daun sukun fermentasi aerobik dengan metode maserasi 0,3054 g QE/100g dan kandungan steroid total tertinggi pada ekstrak N-heksana dari daun sukun fermentasi aerobik maserasi 0, 1169g/100g. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa metode ekstraksi terbaik untuk menentukan kadar total flavonoid dan steroid adalah metode maserasi. Sedangkan polaritas pelarut yang baik untuk penentuan kadar flavonoid total adalah etil asetat aerobik, dan N-heksana aerobik untuk penentuan kadar steroid total, metode fermentasi yang efektif dalam meningkatkan kadar metabolit sekunder pada daun sukun adalah metode fermentasi aerobik.

Kata kunci: daun sukun, metode Fermentasi, Kadar Flavonoid Total, Kadar Steroid Total

Abstract

*Breadfruit leaves contain secondary metabolites including flavonoids, polyphenols, quinones, and steroids. The biosynthetic process can cause changes in the color, content, and type of content present in breadfruit leaves². study described the total concentration of separated secondary metabolites based on the polarity of the solvent and the extraction method. The biosynthetic process is fermenting fresh green leaves into fermented green leaves (HF) through aerobic and anaerobic fermentation methods. The extraction was carried out by two methods, namely the hot method (soxhletation) and the cold method (maceration) in order to compare the better extraction method. Extraction was carried out with graded polarity using N-hexane, ethyl acetate, and ethanol as solvents. Multilevel polarity extraction will produce certain compounds that are separated specifically in each solvent used, therefore the purpose of this study was to obtain scientific data regarding the effect of fermentation method, extraction method, and solvent polarity gradient on total flavonoid and steroid content of leaf extract. breadfruit (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg). The result of the highest total flavonoid content was the ethyl acetate extract from the aerobic fermented breadfruit leaf with maceration method of 0.3054 g QE/100g and the highest total steroid content was in the N-hexane extract from the macerated aerobic fermented breadfruit leaf of 0, 1169g/100g. Based on the research that has been done, it can*

be concluded that the best extraction method for determining the total levels of flavonoids and steroids is the maceration method. While a good solvent polarity for determination of total flavonoid content is aerobic ethyl acetate, and aerobic N-hexane for determination of total steroid content, the fermentation method that is effective in increasing levels of secondary metabolites in breadfruit leaves is the aerobic fermentation method.

Keywords: breadfruit leaves, Fermented methods, Total Flavonoid Level, Total Steroid Level.

PENDAHULUAN

Sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) merupakan salah satu jenis tanaman serbaguna (Adinugraha dan Susilawati, 2014). Bagian tanaman sukun yang biasa dimanfaatkan sebagai pengobatan adalah bagian buah dan daunnya (Utami, 2013). Tanaman ini memproduksi senyawa fenolik termasuk flavonoid, stilbenoid, dan arylbenzofuron (Sikarwar dkk., 2014). Berdasarkan Penelitian yang telah dilakukan (Suryanto dan Wehantouw, 2009) membuktikan bahwa ekstrak metanol, etanol, dan aseton daun sukun mengandung senyawa fenolik, flavonoid, serta memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas terhadap 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Menurut (Sabrina, 2011) daun sukun berkhasiat sebagai sumber antibakteri, antivirus, anti inflamasi, antioksidan, dan antikanker. Daun sukun mampu mengobati penyakit ginjal dan kardiovaskular, serta berfungsi sebagai penurun kolesterol.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan (Riasari dkk., 2015) pada daun sukun jatuh kering (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) telah berhasil diisolasi senyawa sitostenon (merupakan senyawa golongan metabolit sekunder steroid), β -karoten dan

flavonoid dengan dua gugus prenil. Penelitian yang telah dilakukan oleh (Gustav, 2017) menyatakan bahwa ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) fermentasi aerob dengan metode ekstraksi maserasi memiliki kandungan total steroid sebesar 11,425 ppm.

Proses biosintesis dapat menyebabkan perubahan warna, kadar, dan jenis kandungan yang ada pada daun sukun. Salah satu proses biosintesis adalah fermentasi daun hijau segar menjadi daun hijau fermentasi (HF). Dengan proses HF ini, diharapkan kandungan kadar senyawa dalam daun sukun dapat meningkat dibandingkan daun sukun hijau segar. Fermentasi daun dilakukan dengan cara menumpukkan daun selama 5 hari setelah proses pencucian (Riasari, 2015).

Flavonoid adalah senyawa fenol alam yang terdapat hampir pada semua tumbuhan. Umumnya sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid telah di laporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi, dan antikanker (Neldawati, 2013). Flavonoid pada umumnya larut dalam pelarut polar, kecuali flavonoid bebas seperti isoflavan, flavon, flavanon dan flavonol termetoksilasi lebih mudah larut dalam pelarut semipolar (Monache, 1996).

Steroid merupakan terpenoid lipid yang dikenal dengan empat cincin kerangka dasar karbon yang menyatu (Samejo dkk., 2013), bersifat non polar. Steroid berperan penting bagi tubuh dalam menjaga keseimbangan garam, mengendalikan metabolisme dan meningkatkan fungsi organ seksual serta perbedaan fungsi biologis lainnya antara jenis kelamin. Tubuh manusia memproduksi steroid secara alami yang terlibat dalam berbagai proses metabolisme. Sebagai contoh steroid dari garam empedu, seperti garam deoksikolik, asam kholik dan glisin serta konjugat taurin yang berfungsi memperlancar proses pencernaan (Bhawani dkk., 2011).

Ekstraksi dilakukan dengan dua metode, yaitu cara panas (soxhletasi) dan cara dingin (maserasi). Alasan pemilihan dua metode ekstraksi tersebut adalah untuk membandingkan cara dingin dan cara panas serta memiliki banyak keuntungan dibandingkan metode ekstraksi lainnya. Keuntungan metode maserasi yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, tidak ada proses pemanasan sehingga bahan alam tidak mudah terurai, serta ekstraksi cara dingin memungkinkan banyak senyawa terekstraksi meskipun beberapa senyawa memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut ekstraksi pada suhu kamar. Sedangkan, keuntungan metode soxhletasi merupakan metode ekstraksi cara panas terbaik untuk memperoleh hasil ekstrak yang banyak dengan pelarut yang digunakan lebih sedikit, serta waktu yang lebih cepat (Heinrich dkk., 2004). Metode ekstraksi

bertingkat merupakan metode melarutkan bahan atau sampel dengan menggunakan dua atau lebih pelarut. Kelebihan dari metode ekstraksi bertingkat yaitu dapat menghasilkan rendemen dalam jumlah yang besar dengan senyawa yang berbeda tingkat kepolarannya (Sudarmadji dkk., 2007).

Ekstraksi dengan pelarut seperti air, metanol, etanol, etil asetat dan N-heksana mampu memisahkan senyawa-senyawa yang penting dalam suatu bahan. Pada prinsipnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya (Sudarmadji dkk., 1989). Ekstraksi bertingkat akan menghasilkan senyawa tertentu yang terekstrak secara spesifik pada tiap pelarut yang digunakan. Menurut penelitian Aisyah dan Asnani (2012) tentang pengaruh berbagai pelarut dan metode ekstraksi rumput laut, dengan hasil yang menunjukkan bahwa kadar polifenol yang didapatkan lebih tinggi pada ekstraksi bertingkat dibandingkan ekstraksi tidak bertingkat.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian lebih lanjut, terutama mengenai pengaruh metode fermentasi, metode ekstraksi dan tingkat kepolaran pelarut yang dapat menghasilkan kadar total flavonoid dan steroid dari daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg).

METODE

Alat

Alat sokhlet, maserasi, *Rotary evaporator* (IKA RV 10 Digital V), *Spektrometri UV-Vis* (Shimadzu), timbangan

analitik (Henrerr[®]), tanur (Branstead Thermolyne[®]), oven (Mommert[®]), tabung reaksi (pyrex[®]), corong gelas (pyrex), cawan krus, gelas ukur (pyrex), erlenmeyer (pyrex), beaker glass (pyrex), pipet tetes, batang pengaduk, kertas saring, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu[®]), kuvet, mikro pipet (Socorex[®]), lemari pendingin (Polytron[®]), serta alat-alat yang digunakan pada proses skrining dan karakterisasi.

Bahan

Bahan Tumbuhan

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) berwarna hijau tua yang diperoleh dari kelurahan Holis-Bandung.

Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu, metanol, etil asetat, N-heksana, akuades, ammonia, kloroform, asam klorida 2N, pereaksi mayer (HgCl₂, KI dan akuades), pereaksi Dragendroff (Bi(NO₃)₃.H₂O, HNO₃, KI dan akuades), larutan besi (III) klorida, larutan gelatin 1%, serbuk magnesium, amil alkohol, eter, pereaksi Lieberman-Burchard (Asam asetat anhidrat, Kloroform dan H₂SO₄), larutan vanillin-asam sulfat, natrium hidroksida, AlCl₃, H₂SO₄, plat KLT (silika GF₂₅₄), silika gel 60 H, NaOMe, NaOAc, H₃BO₃, HCl.

Metode Fermentasi

Fermentasi Metode Aerob

Bahan berupa daun sukun berwarna hijau tua sebanyak 100 lembar daun

dikumpulkan dan dibersihkan dengan air lalu dikeringkan. Setelah dikeringkan, dari 100 daun di bagi menjadi dua tumpuk, masing-masing daun ditumpuk sebanyak 50 daun dengan cara aerob selama 10 hari dalam suhu kamar (25°C). Daun yang diambil dari hasil fermentasi dari tumpukan ke 2 sampai tumpukan ke 49, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Simplisia yang dihasilkan dibuat menjadi serbuk dan di ayak dengan ayakan nomor 100 (Riasari, 2020).

Fermentasi Metode Anaerob

Bahan berupa daun sukun berwarna hijau tua sebanyak 100 daun dikumpulkan dan dibersihkan dengan air lalu dikeringkan. Dari 100 daun di bagi menjadi dua tumpuk dengan cara anaerob, masing-masing daun ditumpuk sebanyak 50 daun dan di masukkan ke dalam tempat kedap udara, dihilangkan udara menggunakan vakum dan didiamkan selama 10 hari dalam suhu kamar (25°C). Daun yang di ambil dari hasil fermentasi yaitu daun dari tumpukan ke 2 sampai tumpukan ke 49. lalu dikeringkan dengan cara dipanaskan di bawah sinar matahari (Riasari, 2020).

Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap semua ekstrak. Pita magnesium, HCl dan amilalkohol untuk senyawa flavonoid. FeCl₃ 10% digunakan untuk senyawa fenolik, gelatin untuk tanin, pereaksi Dragendorf dan Mayer untuk alkaloid, KOH 5% untuk kuinon, vanillin 10% untuk H₂SO₄ untuk monoterpen dan seskuipterpen, Lieberman-Burchard untuk

steroid dan triterpenoid. Saponin ditunjukkan dengan pembentukan busa yang stabil selama 10 menit setelah pengocokan ekstrak air (Jamous dkk, 2015; Dewi, 2013; Sangi, 2008; Fransworth, 1966).

Ekstraksi Kepolaran Bertingkat

1. Maserasi

Ekstraksi dilakukan dengan cara ekstraksi bertingkat dari simplisia 200 g dengan pelarut N-heksana 2 liter, dengan penggantian pelarut 3 kali 24 jam. Ekstrak cair yang telah dikumpulkan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C sehingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak ditimbang, kemudian ditentukan nilai rendemennya. Ampas dari perendaman pertama dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C, kemudian diekstraksi dengan pelarut etil asetat 2 liter, dengan penggantian pelarut 3 kali 24 jam. Ekstrak cair yang telah dikumpulkan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C sehingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak ditimbang, kemudian ditentukan nilai rendemennya. Ampas dari perendaman kedua dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C, kemudian diekstraksi dengan pelarut etanol 96% 2 liter, dengan penggantian pelarut 3 kali 24 jam. Ekstrak cair yang telah dikumpulkan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C sehingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak ditimbang, kemudian ditentukan nilai rendemennya.

2. Ekstraksi Sinambung dengan alat Soxhlet

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 130 gram, kemudian diekstraksi dengan cara ekstraksi bertingkat dengan metode sokhletasi. Pelarut yang digunakan adalah pelarut dengan kepolaran bertingkat yaitu N-heksana, etil asetat, dan etanol 96%, masing-masing pelarut yang digunakan 1 liter. Serbuk simplisia dibungkus dengan kertas saring, kemudian diekstraksi dengan pelarut N-heksana 1 liter sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40-50°C selama 4-5 jam. Hasil filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Ampas dikeluarkan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Ampas yang telah dikeringkan selanjutnya diekstraksi dengan pelarut etil asetat 1 liter sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40-50°C selama 4-5 jam. Hasil filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Ampas dikeluarkan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Ampas yang telah dikeringkan selanjutnya diekstraksi dengan pelarut etanol 96% 1 liter sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40-50°C selama 4-5 jam. Hasil filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, sehingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak ditimbang, kemudian ditentukan nilai rendemennya.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Masing-masing sampel ditotolkan pada lempeng silika gel. Kemudian pengembang dijenuhkan terlebih dahulu dengan cara

mengimplan dalam chamber, disimpan kertas saring dan ditutup. Tanda pengembang jenuh adalah kertas saring telah basah oleh pengembang seluruhnya. Setelah sampel ditotolkan pada lempeng silika gel di masukkan ke dalam *chamber* kromatografi kemudian chamber kromatografi ditutup. Ditunggu dan diamati hingga fase gerak meresap dan naik hingga batas permukaan lempeng, kemudian diamati di bawah lampu ultra violet dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm. Bercak yang naik selanjutnya diamati dengan cara menyemprot lempeng KLT menggunakan penampak bercak atau reagen $AlCl_3$, Uap Ammonia, dan Lieberman – Burchard, kemudian diamati di bawah lampu ultra violet dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian dihitung Rf nya dengan cara mengukur jarak yang ditempuh senyawa terlarut dan jarak yang ditempuh pelarut (Sudjadi, 2007).

Penetapan Kadar Total Flavonoid

1. Pembuatan Kurva Kalibrasi Kuersetin

Larutan baku dibuat dengan menimbang 50 mg kuersetin, dilarutkan dengan metanol sampai 100 mL. Satu seri konsentrasi larutan kuersetin dalam etanol dibuat dari larutan baku, yaitu dengan konsentrasi: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 $\mu g/mL$. Kemudian masing-masing dipipet 0,5 mL dilarutkan 1,5 mL etanol ditambahkan 0,1 mL $AlCl_3$ 10% ditambahkan 0,1 mL potassium asetat 1M ditambahkan 2,8 mL akuades, didiamkan 30 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 430 nm, blanko dibuat

sama dengan larutan standar dengan mengganti $AlCl_3$ 10% dengan aquadest. Dari data ini persamaan regresi antara konsentrasi kuersetin dengan serapan dibuat (Chang dkk., 2002).

2. Penentuan Kadar Flavonoid Total

Penentuan kadar flavonoid total dilakukan dengan spektrofotometri menggunakan reagen aluminium klorida sesuai prosedur Chang dkk., (2002). Sebanyak 0,5 mL larutan ekstrak dengan konsentrasi 1000 $\mu g/mL$ ditambah dengan 1,5 ml metanol, 0,1 mL aluminium (III) klorida 10% 0,1 mL, 0,1 mL Natrium asetat 1M, dan 2,8 mL akuades, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi larutan uji diukur dengan spektrofotometer UV-sinar tampak pada panjang gelombang 430 nm. Kadar flavonoid total dihitung menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi kuersetin dan dihitung sebagai kuersetin ekuivalen per 100 gram ekstrak (g QE/100g).

Penetapan Kadar Total Steroid

1. Penyiapan larutan baku sitosterol

Sitosterol dibuat konsentrasi 500 ppm dengan ditimbang 50 mg kemudian dilarutkan dalam methanol hingga larut, kemudian larutan dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas. Larutan baku standar ditambahkan pereaksi Besi(III) klorida dan Kalium Heksasianoferat kemudian diukur serapannya pada berbagai panjang gelombang, kemudian yang memiliki serapan tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum.

Larutan baku standar dibuat berbagai konsentrasi ppm dan di tentukan serapannya (Absorbansi). kemudian dibuat kurva kalibrasi sehingga didapat persamaan kurva kalibrasi antara absorbansi terhadap konsentrasi.

2. Penetapan kadar steroid total

Larutan sampel diambil dan dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan 2 mL asam sulfat 4N dan 2 mL besi (III) 0.5%. Campuran dipanaskan pada suhu 70°C selama 30 menit dengan penggojogan dan diencerkan sampai tanda batas dengan akuades. Absorbansi diukur sebanyak 3 kali (Triplo) dengan panjang gelombang maksimum terhadap reagen blanko sitosterol. Dibuat plot hubungan antara konsentrasi (ppm) dengan absorbansinya (Kurva kalibrasi), kemudian dihitung kadar steroid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Determinasi Tanaman

Hasil determinasi menyatakan bahwa tanaman yang digunakan adalah benar tanaman sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg). Proses determinasi merupakan identifikasi tanaman yang meliputi nama ilmiah, nama lokal serta klasifikasi. Determinasi dilakukan di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung.

Proses Pengumpulan Bahan Tanaman

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) hijau segar yang diperoleh dari kelurahan Holis-Bandung. Daun

sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) hijau segar yang diperoleh, kemudian dikumpulkan yang selanjutnya disortasi, dicuci, ditiriskan. Daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) hijau segar yang sudah ditiriskan, kemudian difermentasi dengan cara aerob dan anaerob. Metode fermentasi aerob dilakukan dengan cara menumpuk daun sebanyak 50 helai daun, kemudian didiamkan dalam keadaan udara terbuka pada suhu kamar. Sedangkan, metode fermentasi anaerob dilakukan dengan cara menumpuk daun sebanyak 50 helai, kemudian dimasukkan kedalam suatu wadah kedap udara dan didiamkan dalam keadaan tanpa udara pada suhu kamar. Fermentasi daun dilakukan agar terjadi proses biosintesis sehingga dapat mempercepat perubahan metabolit sekunder baik dari jenis metabolit sekunder maupun kadarnya (Riasari, 2015). Setelah selesai proses fermentasi, daun kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari, dengan tujuan untuk mengurangi kadar air di dalam daun, hal tersebut dilakukan karena air merupakan komponen penyebab tumbuhnya bakteri dan jamur pada tanaman yang dapat merusak kandungan senyawa-senyawa di dalam daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) hijau fermentasi yang digunakan.

Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi simplisia yang dilakukan pada daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) hijau fermentasi diantaranya adalah penetapan kadar abu, kada

sari larut air, kadar sari larut etanol dan kadar air, dan susut pengeringan. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 1

Tabel 1. Hasil Karakterisasi Daun Sukun

Karakterisasi	Hasil Aerob	Hasil Anaerob
Kadar Abu	28,5%	17%
Kadar Sari Larut Air	8,8%	10,2%
Kadar Sari Larut Etanol	4,4%	6%
Kadar Air	2%	4,2%
Susut Pengeringan	8,5%	6,9%

Berdasarkan hasil karakterisasi simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) hijau fermentasi, penetapan kadar abu simplisia daun sukun fermentasi aerob adalah 28,5% dan 17% untuk daun sukun fermentasi anaerob. Hasil pada fermentasi aerob lebih besar dibandingkan dengan fermentasi anaerob, hal ini disebabkan karena pada saat proses fermentasi aerob daun disimpan pada ruangan terbuka sehingga memungkinkan adanya pengotor yang menempel, sedangkan proses fermentasi anaerob daun ditutup dengan plastik. Penetapan kadar abu menunjukkan kandungan unsur mineral dan senyawa anorganik yang terkandung dalam simplisia. Hasil penetapan kadar sari larut air pada daun sukun aerob adalah 8,8% dan 10,2% pada anaerob, Selanjutnya hasil dari penetapan kadar sari larut etanol pada daun sukun aerob adalah 4,4% dan daun sukun anaerob adalah 6%, pada daun sukun anaerob menunjukkan kadar sari larut etanol lebih tinggi daripada kadar sari larut air menunjukkan kelarutan senyawa metabolit

sekunder lebih tertarik pada pelarut organik dibandingkan pelarut anorganik. Penetapan kadar sari larut air Penetapan kadar sari dilakukan untuk memberikan gambaran awal kandungan senyawa yang dapat telarut dengan pelarut air dan etanol (Depkes RI, 2000). Penentuan kadar sari juga dilakukan untuk menentukan pelarut yang sesuai dalam proses ekstraksi. Penetapan kadar air daun sukun fermentasi aerob adalah 2%, dan pada daun sukun fermentasi anaerob adalah 2% Hasil ini sesuai dengan persyaratan pada (MMI, 1995) yaitu <10%, akan tetapi daun sukun anaerob menghasilkan kadar air tinggi dikarenakan pada saat proses fermentasi ditutup dengan plastik kedap udara sehingga proses pengeluaran oksigen menjadi uap air pada saat biosintesis tertahan sehingga kadar air meningkat. Penetapan kadar air simplisia dilakukan untuk memberikan batasan maksimal kandungan air di dalam simplisia, karena jumlah air yang tinggi dapat menjadi media tumbuhnya bakteri dan jamur yang dapat merusak senyawa yang

terkandung di dalam simplisia (Depkes RI, 2000). Selanjutnya dilakukan penetapan susut pengeringan. Susut pengeringan dilakukan dalam oven dengan temperatur 105° selama kurang lebih 30 menit. Hasil yang diperoleh pada susut pengeringan adalah 8,5% untuk aerob dan 6,9% untuk anaerob. Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk memberikan gambaran senyawa yang hilang selama proses pengeringan.

Ekstraksi kepolaran bertingkat

Daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) hijau fermentasi diekstraksi dengan menggunakan dua metode, yaitu cara dingin dengan maserasi dan cara panas dengan soxhletasi, dimana pelarut yang digunakan adalah pelarut dengan kepolaran bertingkat, yaitu N-heksana, etil asetat, dan etanol. Ekstraksi dilakukan dengan dua metode, yaitu cara panas (soxhletasi) dan cara dingin (maserasi). Alasan pemilihan dua metode ekstraksi tersebut adalah untuk membandingkan cara dingin dan cara panas serta memiliki banyak keuntungan dibandingkan metode ekstraksi lainnya. Keuntungan metode maserasi yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, tidak ada proses pemanasan sehingga bahan alam tidak mudah terurai, serta ekstraksi cara dingin memungkinkan banyak senyawa terekstraksi meskipun beberapa senyawa memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut ekstraksi pada suhu kamar. Sedangkan, keuntungan metode soxhletasi merupakan metode ekstraksi cara panas terbaik untuk memperoleh hasil ekstrak

yang banyak dengan pelarut yang digunakan lebih sedikit, serta waktu yang lebih cepat (Heinrich *dkk.*, 2004). Metode ekstraksi bertingkat merupakan metode melarutkan bahan atau sampel dengan menggunakan dua atau lebih pelarut. Kelebihan dari metode ekstraksi bertingkat yaitu dapat menghasilkan rendemen dalam jumlah yang besar dengan senyawa yang berbeda tingkat kepolarannya (Sudarmadji *dkk.*, 2007).

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 130 gram, kemudian diekstraksi dengan cara ekstraksi bertingkat dengan metode soxhletasi. Pelarut yang digunakan adalah pelarut dengan kepolaran bertingkat yaitu N-heksana, etil asetat, dan etanol 96%, masing-masing pelarut yang digunakan 1 liter. Serbuk simplisia dibungkus dengan kertas saring, kemudian diekstraksi dengan pelarut N-heksana 1 liter sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40-50°C selama 4-5 jam. Hasil filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Ampas dikeluarkan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Ampas yang telah dikeringkan selanjutnya diekstraksi dengan pelarut etil asetat 1 liter sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40-50°C selama 4-5 jam. Hasil filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Ampas dikeluarkan dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Ampas yang telah dikeringkan selanjutnya diekstraksi dengan pelarut etanol 96% 1 liter sampai pelarut berwarna bening dengan suhu 40-50°C selama 4-5 jam. Hasil

filtrat yang diperoleh dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, sehingga dipeloreh ekstrak kental, ekstrak ditimbang, kemudian ditentukan nilai rendemennya. Hasil ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 2. Rendemen ekstrak yang didapat bervariasi, metode ekstraksi dengan ekstraksi bersinambung pada daun sukun fermentasi aerob dan anaerob memberikan rendemen ekstrak yang lebih tinggi dikarenakan ada proses pemanasan sehingga dapat melarutkan metabolit sekunder lebih banyak dibandingkan metode maserasi. Rendemen ekstrak yang tinggi pada eluen etil asetat menandakan metabolit sekunder banyak tertarik pada kepolaran semipolar. Ekstraksi bertingkat akan menghasilkan senyawa tertentu yang terekstrak secara spesifik pada tiap pelarut yang digunakan. Aisyah dan Asnani (2012).

Penapisan Fitokimia Simplisia dan Ekstrak

Penapisan fitokimia penting dilakukan untuk memberikan gambaran komponen metabolit sekunder yang terkandung dalam simplisia, sehingga dapat diketahui apakah senyawa yang diinginkan terdapat dalam simplisia atau tidak. Setelah simplisia menjadi

ekstrak, kembali dilakukan penapisan fitokimia yang bertujuan untuk memastikan apakah senyawa yang diinginkan masih terdapat dalam ekstrak atau tidak. Hasil penapisan fitokimia dapat dilihat pada tabel 3. Tabel penapisan fitokimia menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam simplisia dan ekstrak daun sukun adalah flavonoid, fenol, steroid, triterpenoid, dan kuinon.

Pada penapisan fitokimia yang pertama yaitu alkaloid yang dilakukan dengan dua pengujian, dengan penambahan reagen dragendroff dan reagen mayer. Penambahan reagen dragendroff menyebabkan reaksi pembentukan senyawa kompleks yang mengendap. Hasil positif pada pengujian alkaloid dengan reagen dragendroff adalah dengan terbentuknya endapan warna putih. Hasil pengujian pada daun sukun menunjukkan hasil negatif alkaloid. Pada uji alkaloid dengan reagen mayer hasil positif ditandai dengan adanya endapan berwarna putih. Hal tersebut diduga karena nitrogen yang berada pada senyawa alkaloid bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat(II) membentuk kalium-alkaloid yang mengendap (Marliana et al., 2005).

Tabel 2. Rendemen ekstrak daun sukun fermentasi aerob dan anaerob

Fermentasi	Ekstraksi	Pelarut	Ekstrak Kental (gram)	Rendemen (%)
Aerob	Maserasi	N-heksana	3,24	1,62%
		Etil Asetat	7,95	3,97%
		Etanol	5,65	2,82%
	Sokhlet	N-heksana	5,84	4,43%
		Etil Asetat	9,04	6,95%
		Etanol	6,4	4,92%

Anaerob	Maserasi	N-heksana	3,74	1,87%
		Etil Asetat	9,06	4,53%
		Etanol	8,81	4,40%
	Sokhlet	N-heksana	6,03	4,63%
		Etil Asetat	8,90	6,84%
		Etanol	10,08	7,75%

Tabel 3. Hasil penapisan fitokimia simplisia dan ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) hijau fermentasi Aerob dan Anaerob

Pengujian	Simplisia		Ekstrak	
	Aerob	Anaerob	Aerob	Anaerob
Alkaloid	-	-	-	-
Flavonoid	+	+	+	+
Fenolat	+	+	+	+
Tanin	-	-	-	-
Steroid	+	+	+	+
Triterpenoid	+	+	+	+
Monoterpen	-	-	-	-
Seskuiterpen	-	-	-	-
Kuinon	+	+	+	+
Saponin	-	-	-	-

Keterangan : (+) Teridentifikasi, (-) Tidak Teridentifikasi

Pengujian yang kedua yaitu flavonoid dengan menambahkan serbuk Mg dan HCl pada sampel. Penambahan logam Mg dan HCl pada pengujian ini berfungsi dalam mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terbentuk warna menjadi merah, kuning atau jingga (Syafitri dkk, 2014). Flavonoid adalah senyawa yang mempunyai inti α -benzopyron. Oksigen pada gugus karbonilnya akan terprotonisasi ketika direaksikan dengan HCl. Hasil reaksinya adalah garam flavilium yang berwarna merah. Hasil pengujian pada daun sukun yaitu positif dengan adanya warna merah. Pengujian yang ketiga adalah fenol dengan penambahan $FeCl_3$. Senyawa fenol akan bereaksi dengan $FeCl_3$

membentuk warna merah, ungu, biru atau hitam yang pekat karena $FeCl_3$ bereaksi dengan gugus -OH aromatis (Sa'adah, 2010). Senyawa kompleks yang terbentuk diperkirakan merupakan senyawa besi (III) heksafenolat (Marliana, Saleh., 2005). Hasil pengujian pada daun sukun positif, yaitu dengan adanya warna hijau biru kehitaman. Pengujian yang keempat adalah tannin dengan penambahan gelatin dengan hasil positif akan terbentuk endapan putih, karena semakin kuat ikatan tannin dengan gelatin maka akan membentuk endapan putih. Hasil dari pengujian daun sukun adalah negatif. Pengujian yang kelima adalah steroid dan triterpenoid dengan penambahan pereaksi *Lieberman-Burchard*. Sampel ditambahkan

eter kemudian dibiarkan menguap yang selanjutnya ditambah pereaksi *Lieberman-Burchard* (asam asetat anhidrat, H_2SO_4) menunjukkan hasil positif dengan perubahan warna menjadi hijau biru untuk steroid dan coklat ungu untuk triterpenoid. Perubahan warna tersebut didasari oleh kemampuan senyawa triterpenoid dan steroid membentuk warna apabila direaksikan dengan H_2SO_4 dalam larutan asam asetat anhidrid. Perbedaan warna yang terjadi antara steroid dan triterpenoid disebabkan perbedaan gugus pada atom C-4 (Marliana & Saleh., 2011). Hasil pengujian pada daun sukun adalah positif steroid dan triterpenoid. Pengujian yang keenam adalah kuinon dengan penambahan KOH yang berfungsi untuk mende protonasi gugus fenol yang berada pada kuinon sehingga akan membentuk ion enolat yang terkonjugasi dengan ikatan pi karbon benzen, dan jika hasilnya positif akan menunjukkan warna kuning. Hasil dari pengujian daun sukun adalah positif. Pengujian yang keenam adalah monoterpen dan seskuiterpen dengan penambahan vanillin sulfat, dan hasil pengujian pada daun sukun adalah tidak terbentuknya warna-warni yang berarti negatif. Pengujian yang terakhir adalah saponin dengan hasil negatif pada daun sukun, yaitu tidak terbentuk busa ± 1 cm selama 5-10 menit.

Kromatografi Lapis Tipis

Tahap yang selanjutnya dilakukan adalah Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang berfungsi untuk mendeteksi keberadaan

senyawa flavonoid dan steroid dengan menggunakan pereaksi bercak H_2SO_4 , $AlCl_3$, Uap ammonia, *Lieberman-Burchard* yang dilihat secara visibel serta pada UV 254 dan 366. Parameter yang dilihat dalam KLT ini adalah berupa gambar yang dapat dilihat pada Lampiran 5.

Eluen yang digunakan untuk ekstrak N-heksana yaitu N-heksana:Etil asetat (8:2), untuk ekstrak Etil asetat yaitu N-heksana:Etil asetat (7:3), dan untuk ekstrak Etanol yaitu Kloroform:Etil asetat (7:3). Kemudian dilakukan identifikasi menggunakan penampak bercak H_2SO_4 yaitu untuk menghasilkan warna-warna yang dapat dimati secara kasat mata. Setelah semua ekstrak disemprot H_2SO_4 menunjukkan hasil positif adanya beberapa senyawa yang ditandai dengan munculnya beberapa spot dengan warna yang berbeda ketika dilihat secara visual maupun pada UV 366 nm.

Pada ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol aerob dan anaerob setelah disemprot pereaksi $AlCl_3$ (flavonoid), kemudian dilihat pada UV 366 positif adanya flavonoid, hal ini bisa dilihat dengan adanya spot berwarna kuning, dimana $AlCl_3$ merupakan penampak bercak untuk mengetahui adanya flavonoid yang ditandai dengan munculnya warna kuning (Markham, 1988). Sedangkan untuk ekstrak N-heksana tidak terlihat jelas adanya spot berwarna kuning, hal ini mungkin menunjukkan bahwa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak N-heksana hanya sedikit. Pereaksi lain yang digunakan untuk mengidentifikasi flavonoid

adalah Uap Ammonia dengan menunjukkan hasil positif berupa perubahan warna menjadi kuning atau hijau, biru muda, merah atau jingga (Markham, 1988). Pada ekstrak etil asetat dan etanol menunjukkan hasil berupa perubahan warna, hal ini menandakan hasil positif adanya senyawa flavonoid. Sedangkan pada ekstrak N-heksana perubahan warna yang ditunjukkan tidak terlalu jelas, hal ini memungkinkan kandungan senyawa flavonoid hanya sedikit. Perekasi selanjutnya yang digunakan adalah pereaksi *Lieberman-Burchard*, yaitu pereaksi yang digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa steroid dengan hasil berupa perubahan warna menjadi biru kehijauan setelah disemprot. Dari semua ekstrak yang diidentifikasi, menunjukkan hasil tidak terjadinya perubahan warna secara jelas, hal ini memungkinkan bahwa steroid yang terkandung dalam ekstrak lebih sedikit dibandingkan flavonoid yang menunjukkan perubahan warna yang jelas.

Penetapan Kadar Total Flavonoid

Penetapan kadar flavonoid dilakukan secara triplo. Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa penetapan kadar total flavonoid dari ekstrak aerob metode maserasi eluen etil asetat sebesar 0,3054 g QE/100g lebih besar dibandingkan ekstrak n-heksan dan etanol pada daun sukun fermentasi aerob lainnya menunjukkan bahwa senyawa flavonoid pada daun sukun fermentasi aerob memiliki kepolaran semipolar yang sedikit tersubstitusi gugus gula dan untuk ekstrak anaerob pun yang

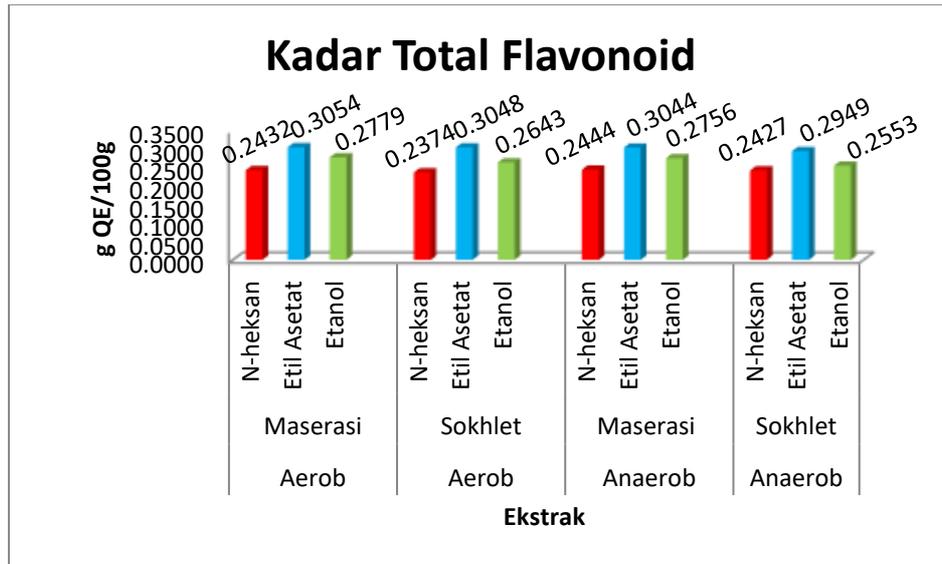
lebih besar adalah ekstrak anaerob metode maserasi eluen etil asetat dengan nilai 0,3044 g QE/100g. Hubungan rendemen metode ekstraksi dengan kadar flavonoid dimana senyawa flavonoid yang terkandung pada daun sukun menunjukkan senyawa yang tidak tahan panas dikarenakan dengan metode ekstraksi maserasi didapatkan kadar total yang tinggi walaupun pada jumlah rendemen tidak berbanding lurus, jumlah rendemen tinggi memang menunjukkan banyaknya jumlah metabolit yang tertarik pada saat proses ekstraksi, akan tetapi jumlah metabolit yang tertarik bukan senyawa flavonoid.

Penetapan Kadar Total Steroid

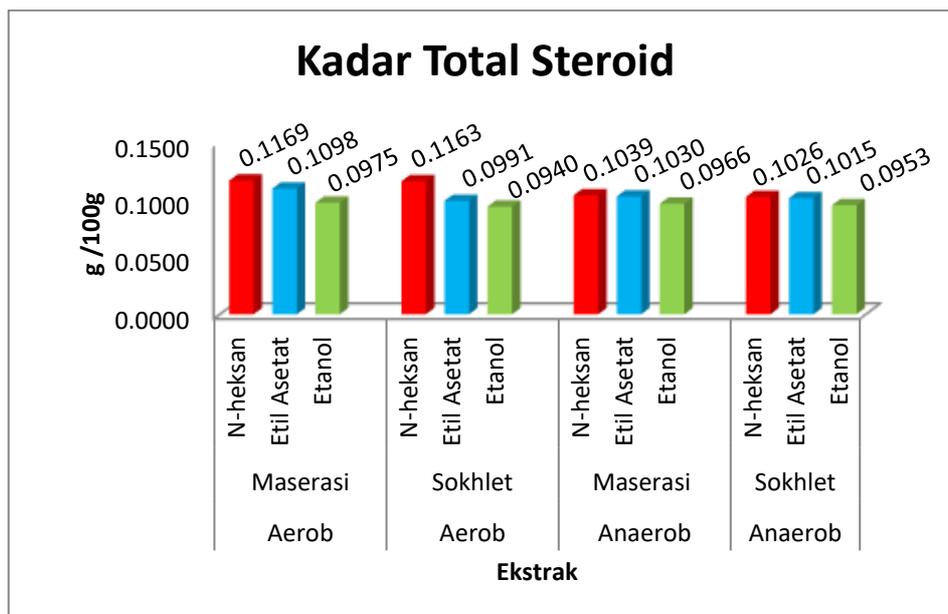
Pada analisis kualitatif telah terbukti adanya senyawa steroid dalam ekstrak daun sukun fermentasi aerob dan anaerob. Selanjutnya dilakukan analisis kuantitatif yaitu penetapan kadar steroid dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Visible. Senyawa standar yang digunakan pada penetapan kadar senyawa steroid adalah sitosterol. Dalam proses penetapan kadar steroid menggunakan FeCl_3 dan Kalium Heksasianoferat yang berfungsi sebagai pemberi warna pada spektrofotometri visible, serta asam sulfat 4N yang berfungsi untuk menghidrolisis senyawa dari larutan pada pengukuran yang dilakukan pada panjang gelombang 780 nm. Penetapan kadar total steroid dilakukan secara triplo, dengan hasil yang bisa dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan penetapan kadar total flavonoid dari ekstrak aerob metode maserasi eluen n-heksan sebesar 0,1169g SE/100g lebih besar dibandingkan ekstrak etil asetat dan etanol pada daun sukun fermentasi aerob lain. Hal ini menunjukkan senyawa steroid pada daun sukun fermentasi aerob bersifat nonpolar sehingga banyak tertarik pada eluen nonpolar. Kadar total steroid pada metode fermentasi

aerob lebih tinggi dibandingkan metode fermentasi anaerob pada kedua metode ekstraksi menunjukkan bahwa metode fermentasi aerob dapat meningkatkan kadar senyawa steroid secara signifikan, maka dari itu metode fermentasi aerob dapat dijadikan acuan untuk proses peningkatan kadar senyawa steroid pada daun sukun.



Gambar 1. Grafik Kadar Total Flavonoid Ekstrak Daun Sukun Fermentasi Aerob dan Anaerob



Gambar 2. Grafik Kadar Total Steroid Ekstrak Daun Sukun Fermentasi Aerob dan Anaerob

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa metode fermentasi aerob lebih baik dibandingkan metode anaerob, hal ini terbukti dari hasil penetapan kadar total flavonoid dan steroid yang lebih tinggi pada ekstrak aerob. Akan

tetapi, metode ekstraksi yaitu maserasi dan sokhletasi tidak terlalu berpengaruh secara signifikan terhadap metabolit sekunder flavonoid dan steroid, hal ini dapat dilihat dari hasil penetapan kadar yang tidak terlalu jauh antara maserasi dan sokhlet. Ekstraksi dengan kepolaran bertingkat menunjukkan kepolaran

dari suatu golongan senyawa dan memberikan hasil yang baik untuk ekstrak yang digunakan dalam penetapan kadar, dimana kadar total flavonoid lebih tinggi pada ekstrak etil asetat, dan kadar total steroid lebih tinggi pada ekstrak N-heksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinugraha, H. A., dan Susilawati, S. 2014. Variasi Kandungan Kimia Tanaman Sukun Dari Beberapa Populasi Di Indonesia Sebagai Sumber Pangan Dan Obat. *Jurnal Hutan Tropis*.
- Aisyah T.S., dan A. Asnani. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum*) Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut. Purwokerto: Fakultas Sains dan Teknik UNSOED.
- Bhawani, S. A., Sulaiman, O., Hashim, R., dan Ibrahim, M.N.M. 2011. Thinlayer chromatographic analysis of steroids. *Trop J Pharm Res*. 9: 301-313.
- Chang C. Yang M, Wen Hand Chern J. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, *J. Food Drug Anal.*
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Materia Medika Indonesia*. Jilid VI. Jakarta: Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan. P.116.
- Dewi, L. D. A. D. Y, Astuti, K. W., Warditiani, N.K. 2013. Penapisan Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.), *Jurnal Farmasi Udayana*, Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Udayana.
- Dirjen POM. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes RI.
- Farnsworth, N. R., 1996. Biological and Phytochemical Screening of Plants, *J.Pharm. Sci.*,55(3), 225-276.
- Gustav Ali Akbar. 2017. Penetapan Kadar Steroid Total Pada Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) Hijau Fermentasi Aerob Dan Anaerob Menggunakan Spektrofotometer Visible. *Skripsi*. Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia: Bandung.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., dan Williamson, E.M. 2004. *Fundamentals of Pharmacognosy and phytotherapy*. United Kingdom: Churchill Livingstone. P. 288.
- Jamous. R., Zaitoun. S., Husein. A, Qasem. I., and Ali-Shtayeh, M. 2015. Screening for biological activities of medicinal plants used in traditional arabic palestinian herbal medicine. *European Journal of Medicinal Plants*. 9(1) , 1–13.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Marliana, S.D., Saleh, C. 2011. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Fraksi N-heksana, Etil Asetat,

- dan Metanol dari Buah Labu Air (*Lagenari Siceraria* (Morliana). *Jurnal. Kimia Mulawarman*.
- Marliana, S. D., V. Suryanti, dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *J. Biofarmasi* 3 (1): 26-31
- Monache, D.G. 1996. Antimikrobia Isoflavanones from *Desmodium canum*. *Phytochemistry*. 41. Hal. 537-544.
- Neldawati, Ratnawulan, Gusnedi. 2013. *Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat*. Padang: Pillar: Physics. Vol 2.
- Riasari, H. 2015. Metabolite Profile of Various Development Bread Fruit Leaves (*Artocarpus atilis* (Parkinson) Fosberg) and The Identification of Thei Major Componens. *IJSPR*. 6(5): 2170-2177.
- Riasari, Hesti., Febriani, Y., Andiani, I. 2020. Comparison of Anti-inflammatory activity between aerobic and anaerobic fermented green breadfruit leaf extract. *Advances in Health Sciences Research*, 26: 70-76.
- Sa'adah, L. (2010). Isolasi dan identifikasi senyawa tanin dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Samejo, M,Q., Memon, S., Bhanger, M.I., dan Khan, K. M. 2013. Isolation and characterization of steroids from *Calligonum polygonoides*. *J. Pharmacy Res*. 6. 346-349.
- Sangi, M., Runtuwene, M.R.J., Simbala, H.E.I. dan Makang, V.M.A. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chemistry Progress*. 2008; 1 (1): 47-53.
- Sikarwar, S., et al, 2014. *A Review on Artocarpus atilis* (Parkinson) Fosberg (breadfruit), *J. of Applied Pharmaceutical Science*, 4 (08) : 091-097.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhardi. 2007. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty. Yogyakarta.
- Sudjadi. 2007. *Kimia Farnasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Suryanto Dan Wehantouw 2009. "Aktivitas Penangkap Radikal Bebas Dari Ekstrak Fenolik Daun Sukun (*Artocarpus Altilis* F)." Universitas Sam Ratulangi: Manado.
- Syafitri, N. E., M. Bintang, dan S.Falah. 2014. Kandungan Fitokimia, Total Fenol, dan Total Flavonoid Ekstrak Buah Harendong (*Melastoma affine* D. Don). *J. Current Biochemistry* vol. 1 (3): 105 - 115
- Utami, Prapti. 2013. *The Miracle of Herbs*. Agro Media Pustaka. Jakarta.