

Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Hasil *Ultrasonic Assisted Extraction* Daun Binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis)

Landyyun Rahmawan Sjahid^{1*}, Amelia Aqshari¹, Sediarto¹

¹Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka, Jakarta, Indonesia

Corresponding Author:
Landyyun Rahmawan Sjahid
landyyun@uhamka.ac.id

Received: February 2020
Accepted: March 2020
Published: March 2020

©Landyyun Rahmawan Sjahid et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Anredera cordifolia [Ten] Steenis has been proven to have pharmacological activity that is thought to be influenced by the presence of phenolic compounds and flavonoids. However, both compounds are found in small concentrations through conventional extraction (maceration, decoction, soxhlet, and reflux). This study aims to prove that the ultrasonic assisted extraction method can obtain higher concentrations of phenolic and flavonoid compounds. Dried binahong leaves were extracted using ultrasonic assisted extraction with 70% ethanol. Phenolic levels were determined using Folin-Ciocalteu, while flavonoid levels were determined using the colorimetric aluminum method. The results showed binahong leaves ethanolic extract had phenolic levels of 10.16 % GAE and flavonoid levels of 10.58 % QE. These results are much higher than the results obtained using conventional extraction so that ultrasonic assisted extraction can be recommended to maximize the extraction of phenolic and flavonoid levels from the leaves of Binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis).

Keywords: *Ultrasonic assisted extraction, Anredera cordifolia* [Ten] Steenis, phenolic, flavonoid

Pendahuluan

Binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis) merupakan salah satu tanaman yang telah digunakan secara luas oleh masyarakat sebagai bahan obat. Beberapa kegunaannya telah didukung oleh hasil penelitian diantaranya sebagai penyembuh luka^{[1],[2]}, menurunkan kematian pada proses kelahiran^[3], analgesik^[4], anti-inflamasi^[5], anti-oksidan^{[6],[7]}, hepato-protector^[8], gastroprotector^[9], nefroprotector^[10], anti-mikroba^{[11]-[13]}, anti-diabetes^{[14],[15]}, anti-hiperlipidemi^[16], anti-hipertensi^[17], anti-TBC^[18] dan anti-kanker^[19]. Aktivitas farmakologi tersebut berhubungan erat dengan metabolit

sekunder yang terdapat pada Binahong seperti vitexin^{[20],[21]}, 3-hydroxy-alpha-ionone^[22], stigmasterol^[23], minyak atsiri^[24], saponin^[25], auron^[26], flavonol^[6], flavon^{[14],[27]} dan fenol^[7].

Selama ini proses ekstraksi daun binahong dilakukan dengan metode maserasi^{[7],[13],[21],[28]-[30]}, dekokta^[13], soklet^[31], dan refluks^{[6],[10],[18]}. Namun kuantitas dan kualitas ekstrak yang diperoleh masih tergolong rendah. Kuantitas ekstrak dapat diketahui dari hasil rendemen yang diperoleh sebesar 1,5% - 18%^{[14],[18],[28],[31]}. Sedangkan kualitas ekstrak dapat diketahui berdasarkan kadar senyawa mayor dalam simplisia yang sebagian besar merupakan

golongan fenol dan flavonoid dengan kadar 0,5%-8%^{[6],[7]}.

Perolehan kadar fenol dan flavonoid dapat ditingkatkan menggunakan *ultrasonic assisted extraction*. Metode ini telah terbukti meningkatkan rendemen serta kadar fenolik dan flavonoid pada ekstrak kulit jeruk dibandingkan dengan maserasi^[32], pada ekstrak *Elsholtzia ciliata* dibandingkan dengan maserasi, perkolasi dan refluks^[33], pada ekstrak *Equisetum arvense* L dibandingkan dengan soklet^[34]. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk memberikan solusi terhadap keterbatasan perolehan kadar fenol dan flavonoid dari daun binahong (*Anredera cordifolia*) sehingga dapat tercapai efisiensi proses ekstraksi apabila dibutuhkan dalam skala besar.

Metode Penelitian

Bahan kimia

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis) di peroleh dari BALITTRO, etanol 70%, kertas saring, asam galat (Sigma), kuersetin (Sigma), reagen Folin-Ciocalteu, NaOH (Merck), natrium asetat (Merck), kalium asetat, Na₂CO₃ (Merck), kain flanel, asam asetat glasial, HCl, reagen Meyer, serbuk Mg, aseton, FeCl₃, NaCl, H₂SO₄, metanol, akuades.

Peralatan

Timbangan analitik (OHAUS), pengayak, ultrasonic cleaner WT-600-40, spektrofotometer UV-Vis (shimadzu), corong pisah 100 ml dan 500 ml, timbangan digital, oven, *rotary vacuum evaporator*, pengayak (ABM) dan peralatan gelas lainnya.

Prosedur penelitian

Perhatikan penulisan unit pengukuran atau satuan metrik internasional dan penggunaan sub heading 3 jika diperlukan.

Pembuatan ekstrak

Serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis) 200 gram direndam dalam etanol 70% (1:10) pada wadah ekstraksi yang kemudian

dimasukkan ke dalam *ultrasonic cleaning bath* dengan frekuensi 40Khz, selama 30 menit^{[33],[35]}. Hasil ekstraksi disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas. Filtrat dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50-60°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak tersebut dihitung rendemennya, diuji organoleptik^[36], kadar air^[37], kadar abu total^[38] dan skrining fitokimia menggunakan uji fitokimia menggunakan reagen warna yang biasa digunakan untuk masing-masing golongan metabolit sekunder yang diuji.

Penetapan kadar fenol total

Kadar fenol total ditetapkan menggunakan Folin-Ciocalteu method^[39] dengan sedikit perubahan. Sebanyak 10.0 mg ekstrak sampel dilarutkan dengan campuran metanol : akuades (1:1) sampai volume 10.0 ml. Sebanyak 300 µl larutan dicampur dengan 1.5 ml reagen Folin-Ciocalteu, didiamkan selama 3 menit, kemudian ditambah 1.2 ml larutan Na₂CO₃ 7.5% dan didiamkan lagi selama 35 menit pada suhu kamar. Absorbansi larutan diukur pada 767 nm. Kadar fenol total dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat (*Gallic Acid Equivalen*/GAE) berdasarkan persamaan (1).

$$\text{Kadar fenol (\% GAE)} = \frac{C \times V \times fp \times 10^{-6}}{m} \quad (1)$$

Keterangan :

C = Kesetaraan kadar asam galat berdasarkan kurva kalibrasi (µg/ml)

V = Volume total ekstrak (ml)

fp = Faktor pengenceran

m = Bobot sampel (g)

Penetapan kadar flavonoid total

Kadar flavonoid total ditetapkan menggunakan *aluminium colorimetric method* ^[40]. Sebanyak 10.0 mg ekstrak dilarutkan dalam 10.0 ml etanol sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan tersebut dipipet 0.5 ml, ditambah dengan 1.5 ml etanol 70%, 0.1 ml AlCl₃ 10%, 0.1 ml natrium asetat 1M, dan 2.8 ml aquadest. Larutan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 442 nm. Kadar total flavonoid

dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin (*Quercetin Equivalen/QE*) berdasarkan persamaan (2).

$$\text{Kadar flavonoid (\% QE)} = \frac{C \times V \times fp \times 10^{-6}}{m} \quad (2)$$

Keterangan :

C = Kesetaraan kadar kuersetin berdasarkan kurva kalibrasi ($\mu\text{g/ml}$)

V = Volume total ekstrak (ml)

fp = Faktor pengenceran

m = Bobot sampel (g) ^[40]

Hasil dan Diskusi

Karakteristik ekstrak

Daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis) yang diekstraksi menggunakan *ultrasonic assisted extraction* menghasilkan rendemen sebesar 40.098%. Hasil tersebut lebih besar daripada hasil ekstrak yang diperoleh menggunakan metode maserasi dan refluks, yaitu sebesar 1.5% - 18%^{[14],[18],[28]}. Secara organoleptis, ekstrak yang diperoleh berwarna coklat dengan bau khas dan rasa pahit. Ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis) yang dihasilkan memiliki kadar air dan kadar abu berturut-turut sebesar 7.52% dan 3.27%. Kadar air ekstrak yang dihasilkan masih

memenuhi standar yaitu berada di bawah 8.85%^[41]. Hal ini menandakan bahwa ekstrak dapat disimpan lebih lama karena kandungan air sebagai media tumbuh mikroorganisme ada dalam jumlah terbatas sedangkan kadar abu pada ekstrak yang dihasilkan lebih dari standar yang ditetapkan, yaitu 1.64%^[41]. Tingginya kadar abu menandakan bahwa ekstrak yang dihasilkan mengandung senyawa anorganik lebih banyak daripada yang seharusnya. Senyawa ini dapat berasal dari unsur anorganik seperti logam dan mineral yang terdapat dari tanah tempat tumbuh tanaman asal. Hasil skrining fitokimia menggunakan reaksi warna menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis) mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder (tabel 1) yang sesuai dengan penelitian sebelumnya.

Penetapan kadar fenol dan flavonoid total

Penetapan kadar fenolik total dilakukan menggunakan metode Folin Ciocalteu. Pada metode ini senyawa fenol teroksidasi oleh reagen Folin Ciocalteu^[42] membentuk kompleks fosfotungstat-fosfomolibat berwarna biru dengan struktur dan mekanisme yang belum diketahui^[43]. Pemberian larutan Na_2CO_3 dapat meningkatkan efisiensi reduksi fenol^[44] sehingga warna yang terbentuk menjadi lebih stabil.

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis)

Metabolit sekunder	Hasil uji
Fenolik	+
Flavonoid	+
Alkaloid	+
Tanin	+
Saponin	+
Steroid	+
Triterpenoid	-

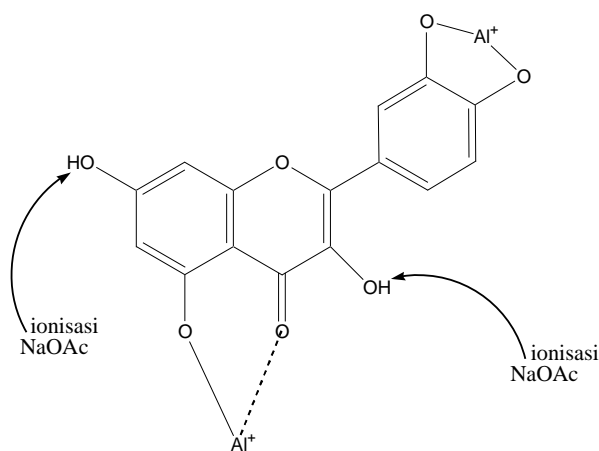
Keterangan : (+) = Terdeteksi
(-) = Tidak terdeteksi

Hasil penelitian diperoleh kadar fenol total ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis) sebesar 10.16 % GAE yang menunjukkan bahwa dalam 100 g serbuk simplisia terdapat 10.16 g senyawa fenol yang setara dengan asam galat. Asam galat digunakan sebagai pembanding karena memiliki gugus fenol yang dapat mewakili reaksi pembentukan kompleks dan memberikan warna yang stabil [42].

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan menggunakan aluminium colorimetric method. Pada metode ini, flavonoid yang memiliki gugus orto-dihidroksi maupun hidroksi keton akan membentuk senyawa kompleks dengan logam Aluminium sehingga menghasilkan pergeseran batokromik. Sedangkan natrium asetat digunakan untuk menstabilkan struktur dengan mengionisasi gugus 3 dan 4'-OH yang tidak terkompleks dengan Al^{3+} dan gugus 7-OH sehingga struktur tetap memberikan serapan pada daerah visible [45]. Hasil penelitian diperoleh kadar flavonoid total ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis) sebesar 10.58 % QE yang menunjukkan bahwa dalam 100 g serbuk simplisia terdapat 10.58 g senyawa flavonoid yang setara dengan kuersetin. Kuersetin digunakan sebagai pembanding karena memiliki semua gugus OH yang dapat bereaksi dengan Al^{3+} dan natrium asetat (gambar 1).

Hasil penetapan kadar fenol dan flavonoid total (Tabel 2) menunjukkan efektifitas *ultrasonic assisted extraction* untuk menarik senyawa fenol dan flavonoid dari daun binahong dalam waktu yang relatif singkat (30 menit) jika dibandingkan dengan metode ekstraksi lain yang pernah diteliti.

Ultrasonic assisted extraction merupakan metode ekstraksi dengan memberikan getaran ultrasonic > 20kHz pada permukaan simplisia. Pada tahap tersebut, simplisia akan mengalami beberapa kondisi diantaranya fragmentasi dan erosi. Fragmentasi terjadi karena pecahnya partikel simplisia menjadi ukuran yang lebih kecil sehingga luas permukaan partikel yang diekstraksi menjadi lebih besar. Hal tersebut menyebabkan meningkatnya transfer massa dari simplisia ke pelarut dan pada akhirnya akan meningkatkan laju ekstraksi dan jumlah rendemen^[46]. Hal ini tampak pada hasil rendemen penelitian ini sebesar 40.098%. Sedangkan erosi merupakan kondisi yang terjadi akibat adanya lokalisasi getaran di setiap permukaan simplisia. Hal tersebut menyebabkan metabolit sekunder terpaksa melepaskan diri dari ikatan dalam sel sehingga meningkatkan kemampuan solvent dalam melarutkan metabolit sekunder^[46].



Gambar 1. Ilustrasi kompleks kuersetin – aluminium dan ionisasi natrium asetat terhadap struktur, modifikasi dari Nikolovska-Čoleska^[47].

Tabel 2. Perbandingan kadar fenol dan flavonoid berdasarkan hasil penelitian dan penelitian sebelumnya

Metode ekstraksi	Pelarut ekstrak	Rendemen (%)	Kadar fenol total (% GAE)	Kadar flavonoid total (% QE)	Literatur
Ultrasonik	Etanol 70%	40.098	10.16	10.58	
Maserasi	Etanol 70%	11.40	nd	nd	[21]
Maserasi	Etanol 96%	12.32	nd	1.35	[21]
Maserasi	Etanol	nd	2.843	nd	[29]
Maserasi	Etanol p.a	3.29	nd	0.001	[30]
Refluks	Etanol 70%	nd	8.42	0.70	[6]

Keterangan : nd= *no data* (tidak terdapat data)

Efek dari proses erosi tersebut mengakibatkan terlarutnya fenol dan flavonoid dalam kondisi optimal dengan kadar masing-masing sebesar 10.16 %GAE dan 10.58 %QE. Selain itu, ultrasonic assisted extraction pada penelitian ini dilakukan pada suhu kamar sehingga dapat meminimalkan kerusakan atau degradasi senyawa metabolit sekunder yang diekstrak.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka metode *ultrasonic assisted extraction* dapat menjadi solusi atas rendahnya kadar fenol dan flavonoid yang terekstrak pada saat menggunakan metode ekstraksi konvensional dan metode ini dapat diterapkan untuk industri obat tradisional untuk mendapatkan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis) dengan kualitas yang lebih baik.

Daftar Pustaka

- Wijayanti, K. & Esti, R. H. S., Effectiveness of binahong decoction water (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) for perineal wound healing at home delivery aesy grabag Magelang, Indonesia. *Int. J. Res. Med. Sci.*, **5(5)**: 1970–1975 (2017).
- Sutrisno, E., Sukandar, E., Fidrianny, I. & Adnyana, I. K., Wound healing in vivo and in vitro study of binahong leaves (*Anredera cordifolia* (ten.) Steenis) and pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) ethanolic extract. *Pharmacol. OnLine*, **1**: 111–116 (2018).
- Wijayanti, D., Setiatin, E. T. & Kurnianto, E., Leucocyte profile and offspring production of Guinea pig (*Cavia cobaya*) given *Anredera cordifolia* leaf extract. *J. Indones. Trop. Anim. Agric.*, **43(1)**: 19–25 (2018).
- Yuziani, Harahap, U. & Karsono., Evaluation of analgesic activities of ethanolic extract of *Anredera cordifolia* (Ten.) v. Steenis leaf. *Int. J. PharmTech Res.*, **6(5)**: 1608–1610 (2014).
- Sutrisno, E., Adnyana I, K., Yulinah Sukandar, E., Fidrianny, I. & Aligita, W., Anti-inflammatory study of *Anredera cordifolia* leaves and *Centella asiatica* herbs and its combinations using human red blood cell-membrane stabilization method. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **9(5)**: 78–80 (2016).
- Fidrianny, I., Wirasutisna, K. R. & Amanda, P., Senyawa antioksidan dari ekstrak etil asetat daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dari

- Babakan Ciparay, Bandung Selatan, Indonesia. *Acta Pharm. Indones.*, **38(1)**: 26–30 (2013).
7. Susanti, H., Total phenolic content and antioxidant activities of binahong (*Anredera cordifolia*). *J. Kedokt. dan Kesehatan. Indones. (Indonesian J. Med. Heal.*, **10(2)**: 171–175 (2019).
 8. Estowo, R., Zulfian. & Tjiptaningrum, A., The effect of binahong leaves extraction (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis) in 70 % ethanol toward ALT activities of male rat (*Rattus norvegicus*) of Sprague dawley which has induced by ethanol 50 %. *Majority*, **3(6)**: 108–117 (2014).
 9. Wibhisono, H., Busman, H. & Susantiningasih, T., Efek protektif ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap gambaran histopatologi lambung tikus putih galur Sprague dawley yang diinduksi etanol. *Majority*, **3(6)**: 170–178 (2014).
 10. Sukandar, E. Y., Fidrianny, I. & Adiwibowo, L. F., Efficacy of ethanol extract of *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis leaves on improving kidney failure in rats. *Int. J. Pharmacol.*, **7(8)**: 850–855 (2011).
 11. Leliqia, N. P. E., Sukandar, E. Y. & Fidrianny, I., Antibacterial activities of *Anredera cordifolia* (Ten.) v. Steenis leaves extracts and fractions. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **10(12)**: 10–13 (2017).
 12. Basyuni, M., Ginting, P. Y. A. B. & Lesmana, I., Phytochemical analysis of binahong (*Anredera cordifolia*) leaves extract to inhibit in vitro growth of *Aeromonas hydrophila*. in *Proceedings of the 3rd International Symposium on Applied Chemistry*, **1904**: 020072–1–020072–5 AIP Publishing, (2017).
 13. Elyani, H. & Risandiansyah, R., Antibacterial potential of four herbal plants (*Syzygium cumini*, *Piper ornatum*, *Anredera cordifolia*, and *Alpinia galangan*) against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *JIMR - J. Islam. Med. Res.*, **1(2)**: 26–33 (2017).
 14. Djamil, R., Winarti, W., Zaidan, S. & Abdillah, S., Antidiabetic activity of flavonoid from binahong leaves (*Anredera cordifolia*) extract in alloxan induced mice. *J. Pharmacogn. Nat. Prod.*, **03(02)**: 139 (2017).
 15. Astuti, S. M., Sakinah, A. M. M. & Risch, A., The triterpenoid saponin from binahong [*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis] to potential using as antidiabetic activity in animal laboratory. in *International Conference on Drug Development of Natural Resources*, 331–344 (2012).
 16. Lestari, D., Sukandar, E. Y. & Fidrianny, I., *Anredera cordifolia* leaves extract as antihyperlipidemia and endothelial fat content reducer in male Wistar rat. *Int. J. Pharm. Clin. Res.*, **7(6)**: 435–439 (2015).
 17. Garmana, A. N., Sukandar, E. Y. & Fidrianny, I., Antihypertension study of *Anredera cordifolia* (Ten.) v. Steenis extract and its fractions in rat through dexamethasone induction and nitric oxide release. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **11(1)**: 278–282 (2018).
 18. Pitaloka, D. A. E. & Sukandar, E. Y., Synergistic study on n-hexane extract of *Anredera cordifolia* (Ten.) v Steenis (binahong) leaves combined with antituberculosis drugs against drug-sensitive and drug-resistant of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **8(5)**: 134–138 (2018).
 19. Virginia, D. M., Saputra, R. P. & Setiawati, A., Cytotoxic activity of *Anredera cordifolia* leaf extract on Hela cells. *Biotropia (Bogor)*, **26(1)**: 33–40 (2019).
 20. Mulia, K., Muhammad, F. & Krisanti, E., Extraction of vitexin from binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) leaves using betaine - 1,4 butanediol natural deep eutectic solvent (NADES). in *International Conference on Chemistry, Chemical Process and Engineering (IC3PE)*, **1823**: 020018–1–020018–4 (2017).
 21. Dwitiyanti., Harahap, Y., Elya, B. & Bahtiar, A., Impact of solvent on the characteristics of standardized binahong leaf (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).

- Pharmacogn. J.*, **11(6)**: 1463–1470 (2019).
22. Bari, I. N., Kato-Noguchi, H., Iwasaki, A. & Suenaga, K., Allelopathic potency and an active substance from *Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis. *Plants*, **8(134)**: 1–9 (2019).
 23. Manik, Y., Fachriyah, E. & Kusriani, D., Isolasi, identifikasi dan uji sitotoksik senyawa steroid dari daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *J. Kim. Sains dan Apl.*, **16(1)**: 23–26 (2013).
 24. Souza, L. F., Barros, I. B. I. de., Mancini, E., Martino, L. De., Scandolera, E. & Feo, V. De., Chemical composition and biological activities of the essential oil from *Anredera cordifolia* grown in Brazil. *Nat. Prod. Commun.*, **9(7)**: 1003–1006 (2014).
 25. Astuti, S. M., Sakinah A.M, M. S., Andayani B.M, R. & Risch, A., Determination of saponin compound from *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis plant (binahong) to potential treatment for several diseases. *J. Agric. Sci.*, **3(4)**: 224–232 (2011).
 26. Veronita, F., Wijayati, N. & Mursiti, S., Isolasi dan uji aktivitas antibakteri daun binahong serta aplikasinya sebagai hand sanitizer. *Indones. J. Chem. Sci.*, **6(2)**: 138–144 (2017).
 27. Djamil, R., Wahyudi, P., Wahono, S. & Hanafi, M., Antioxidant activity of flavonoid from *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis leaves. *Int. Res. J. Pharm.*, **3(9)**: 241–243 (2012).
 28. Djamil, R., Winarti, W., Syamsudin. & Rasna, M., Standardization and A-glucosidase inhibitory of extract from *Anredera cordifolia* leaves. in *Proceedings of The 9th Joint Conference on Chemistry*, 317–321 (2015).
 29. Hasri., Anwar, M. & Karim, M., Analisis fenolik dan daya hambat daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Indones. Chem. Appl. J.*, **1(1)**: 1–9 (2017).
 30. Selawa, W., Runtuwene, M. R. J. & Citraningtyas, G., Kandungan flavonoid dan kapasitas antioksidan total ekstrak etanol daun binahong [*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis]. *Pharmacogn. J. Ilm. Farm. UNSRAT*, **2(1)**: 18–22 (2013).
 31. Susanty. & Yudhistirani, S. A., Pengaruh waktu ekstraksi daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) terhadap kemampuan daya hambat bakteri *Escherichia coli* untuk pembuatan hand sanitizer. *J. Konversi*, **7(1)**: 1–10 (2018).
 32. Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P. & Singanusong, R., Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) peel. *Food Chem.*, **241**: 338–345 (2018).
 33. Pudziuelyte, L., Jakštas, V., Ivanauskas, L., Laukevičienė, A., Ibe, C. F. D., Kursvietiene, L. & Bernatoniene, J., Different extraction methods for phenolic and volatile compounds recovery from *Elsholtzia ciliata* fresh and dried herbal materials. *Ind. Crops Prod.*, **120**: 286–294 (2018).
 34. Oniszczyk, A., Podgórski, R., Oniszczyk, T., Zukiewicz-Sobczak, W., Nowak, R. & Waksmundzka-Hajnos, M., Extraction methods for the determination of phenolic compounds from *Equisetum arvense* L. herb. *Ind. Crops Prod.*, **61**: 377–381 (2014).
 35. Winata, E. W. & Yuniarta., Ekstraksi antosianin buah murbei (*Morus alba* L.) metode ultrasonic bath (kajian waktu dan rasio bahan : pelarut). *J. Pangan dan Agroindustri*, **3(2)**: 773–783 (2015).
 36. Departemen Kesehatan Republik Indonesia., *Buku panduan teknologi ekstrak*. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, (2000).
 37. Pasaribu, G., Gusmailina., Komarayati, S., Zulnely. & Dahlian, E., Analisis senyawa kimia *Dryobalanops aromatica*. *J. Penelit. Has. Hutan*, **32(1)**: 21–26 (2014).
 38. Departemen Kesehatan Republik Indonesia., *Farmakope herbal indonesia*. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, (2008).
 39. Siddiqui, N., Rauf, A., Latif, A. &

- Mahmood, Z., Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). *J. Taibah Univ. Med. Sci.*, (2017). doi:10.1016/j.jtumed.2016.11.006
40. Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M. & Chern, J.-C., Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.*, **10(3)**: 178–182 (2002).
41. Kementrian Kesehatan RI, *Farmakope herbal indonesia*. Kementrian Kesehatan RI, (2011).
42. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, **299**: 152–178 (1999).
43. Schofield, P., Mbugua, D. M. & Pell, A. N., Analysis of condensed tannins : a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **91**: 21–40 (2001).
44. Chen, L. Y., Cheng, C. W. & Liang, J. Y., Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chem.*, **170**: 10–15 (2015).
45. Cornard, J. P. & Merlin, J. C., Complexes of aluminium (III) with isoquercitrin : spectroscopic characterization and quantum chemical calculations. *Polyhedron*, **21**: 2801–2810 (2002).
46. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S. & Abert-Vian, M., Ultrasound assisted extraction of food and natural products. mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, **34**: 540–560 (2017).
47. Nikolovska-Čoleska, Ž., Dorevski, K., Klisarova, L. & Šturkova-Milošević, L., Identification of phenolic constituents isolated from Macedonian propolis. *Bull. Chem. Technol. Maced.*, **14(1)**: 13–17 (1995).