

Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri dari Ekstrak dan Fraksi Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) Hasil Penyulingan

Threesanola Nasaret Wongkar¹, Vanda Selvana Kamu^{1*}, Harry Julius Koleangen¹, Fajar Hutagalung¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado,

*Email korespondensi: vandakamu@unsrat.ac.id

ABSTRAK

Seiring dengan perubahan pola hidup masyarakat, masalah kesehatan di Indonesia menjadi semakin kompleks akibat paparan radikal bebas yang memicu stres oksidatif dan penyakit degeneratif seperti kanker, diabetes, serta penyakit kardiovaskular. Kondisi ini diperburuk oleh tingginya risiko infeksi bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang dapat merusak sel-sel tubuh. Dampak negatif radikal bebas dan infeksi tersebut dapat dicegah oleh senyawa antioksidan dan antibakteri yang mampu melindungi sel serta menghambat pertumbuhan mikroba. Daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth) merupakan salah satu sumber herbal yang memiliki potensi sebagai antioksidan dan antibakteri karena masih mengandung senyawa metabolit sekunder seperti fenolik, flavonoid, dan tanin. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan dan antibakteri dari ekstrak serta fraksi limbah daun nilam hasil penyulingan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat (FEA) memiliki kandungan tertinggi pada total fenolik (43,31 µg/mL), flavonoid (78,90 µg/mL), dan tanin (22,78 µg/mL). FEA juga memberikan aktivitas antioksidan terkuat sebesar 96,61%. Pada uji antibakteri konsentrasi 30%, FEA menghasilkan zona hambat kategori kuat sebesar 16,80 mm terhadap *S. aureus* dan 15,25 mm terhadap *E. coli*. Hasil GC-MS menunjukkan bahwa dalam fraksi etil asetat daun nilam teridentifikasi beberapa senyawa dari golongan terpenoid dan asam lemak yang memiliki aktivitas antioksidan serta antibakteri. Berdasarkan hasil pengujian, ekstrak dan fraksi daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) hasil penyulingan memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri.

Kata kunci: Daun nilam, limbah penyulingan, antioksidan, antibakteri, GC-MS.

ABSTRACT

Along with changes in public lifestyle, health issues in Indonesia have become increasingly complex due to exposure to free radicals, which trigger oxidative stress and degenerative diseases such as cancer, diabetes, and cardiovascular diseases. This condition is exacerbated by the high risk of infections from pathogenic bacteria, such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, which can damage body cells. The negative impacts of free radicals and these infections can be prevented by antioxidant and antibacterial compounds capable of protecting cells and inhibiting microbial growth. Patchouli leaves (*Pogostemon cablin* Benth) are a herbal source with potential as antioxidants and antibacterials, as they contain secondary metabolites such as phenolics, flavonoids, and tannins. This study aims to determine the antioxidant and antibacterial activities of extracts and fractions from patchouli leaf waste post-distillation. The results showed that the ethyl acetate fraction (FEA) had the highest content of total phenolics (43,31 µg/mL), flavonoids (78,90 µg/mL), and tannins (22,78 µg/mL). FEA also exhibited the strongest antioxidant activity at 96.61%. In the antibacterial test at a 30% concentration, FEA produced a strong inhibition zone of 16,80 mm against *S. aureus* and 15,25 mm against *E. coli*. GC-MS analysis identified several compounds from the terpenoid and fatty acid groups in the ethyl acetate fraction of patchouli leaves, which possess antioxidant and antibacterial activities. Based on the test results, the extracts and fractions of distilled patchouli leaf waste (*Pogostemon cablin* Benth) exhibit significant antioxidant and antibacterial activities.

Keywords: Patchouli leaves, distillation waste, antioxidant, antibacterial, GC-MS.

PENDAHULUAN

Masalah kesehatan di Indonesia tergolong cukup serius, salah satunya dipicu oleh tingginya paparan radikal bebas. Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang bersifat sangat reaktif karena memiliki elektron tidak berpasangan, sehingga berpotensi merusak sel-sel dalam tubuh. Peningkatan radikal bebas dalam tubuh dapat menimbulkan stres oksidatif akibat ketidakseimbangan antara radikal

bebas dan antioksidan, yang selanjutnya berkontribusi terhadap timbulnya penyakit degeneratif seperti kanker, diabetes, peradangan, serta penyakit kardiovaskular (Tjakra dkk., 2022). Dampak buruk radikal bebas terhadap tubuh dapat diminimalkan melalui keberadaan antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat atau mencegah reaksi oksidasi yang merusak sel, sehingga berperan dalam melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas (Halliwell dkk., 2012). Senyawa fenolik, termasuk flavonoid dan tanin, merupakan metabolit sekunder tumbuhan yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan.

Selain radikal bebas, infeksi bakteri patogen juga menjadi penyebab berbagai penyakit di Indonesia. Bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dapat masuk ke dalam tubuh melalui berbagai jalur, antara lain konsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi, luka pada kulit, serta kontak langsung dengan pakaian atau bahan tekstil, termasuk kain tenun yang digunakan (Sanit dkk., 2023). Penggunaan agen antibakteri berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri tersebut dan dimanfaatkan dalam pengobatan berbagai infeksi di dalam tubuh (Magani dkk., 2020).

Tanaman herbal merupakan sumber potensial senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri. Salah satu tanaman yang berpotensi adalah nilam (*Pogostemon cablin Benth.*). Daun nilam mengandung berbagai metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, fenolik, tanin, saponin, dan terpenoid (Daniati dkk., 2021). Penelitian oleh Sernita dkk. (2018) menunjukkan bahwa ekstrak daun nilam mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 30%, 40%, dan 50% dengan zona hambat masing-masing sebesar 1,83 mm, 2,26 mm, dan 3,43 mm. Nilam juga dikenal sebagai tanaman penghasil minyak atsiri yang diperoleh melalui proses penyulingan daun atau batang. Proses penyulingan tersebut tidak hanya menghasilkan minyak atsiri, tetapi juga menghasilkan limbah padat berupa sisa daun dan batang yang umumnya hanya ditumpuk di sekitar lokasi penyulingan (Aryani dkk., 2022).

Dalam jangka panjang, limbah sisa penyulingan yang belum dimanfaatkan secara optimal oleh petani berpotensi mencemari lingkungan. Penelitian mengenai aktivitas antioksidan dan antibakteri dari limbah tersebut masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas antioksidan dan antibakteri ekstrak daun nilam (*Pogostemon cablin Benth.*) hasil penyulingan terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* untuk meningkatkan nilai ekonomi dan ekologi.

BAHAN DAN METODE

Sampel daun nilam hasil penyulingan diambil dari Desa Pakuure Kabupaten Minahasa Selatan, Provinsi Sulawesi Utara. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini meliputi AlCl_3 2%, aluminium foil, akuades, asam galat, bakteri uji (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*), DMSO 10%, DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil), etanol 96%, etil asetat, reagen Folin–Ciocalteu 50%, HCl 37%, katekin, kertas saring, kuersetin, metanol, Na_2CO_3 2%, n-heksana, media nutrien agar (NA), tablet ciprofloxacin, dan vanilin.

Preparasi sampel

Daun nilam hasil penyulingan dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50 °C selama 5 jam. Setelah proses pengeringan, sampel dihaluskan menggunakan blender dan selanjutnya diayak dengan ayakan berukuran 100 mesh untuk memperoleh serbuk daun nilam hasil penyulingan.

Ekstraksi

Sebanyak 200 g serbuk daun nilam hasil penyulingan dimasukkan ke dalam bejana maserasi, kemudian ditambahkan 2000 mL pelarut etanol 96% dan dibiarkan selama 72 jam. Setelah proses maserasi selesai, campuran disaring untuk memperoleh filtrat. Filtrat selanjutnya diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 78 °C selama 1 jam hingga diperoleh ekstrak etanol. Ekstrak yang dihasilkan kemudian dikeringkan kembali menggunakan oven pada suhu 60 °C selama 45 menit sehingga diperoleh ekstrak etanol pekat.

Partisi

Sebanyak 5 g ekstrak etanol dilarutkan dalam 100 mL akuades. Larutan tersebut selanjutnya difraksinasi menggunakan corong pisah dengan penambahan 100 mL n-heksana. Campuran dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan n-heksana dan lapisan air. Lapisan n-heksana kemudian dipisahkan dan proses fraksinasi diulangi beberapa kali hingga lapisan n-heksana menjadi bening. Selanjutnya, lapisan air difraksinasi kembali dengan prosedur yang sama menggunakan pelarut etil asetat. Fraksi n-heksana, etil asetat, dan air yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga dihasilkan ekstrak dari masing-masing fraksi.

Penentuan kandungan total fenolik

Penentuan kandungan total fenolik dilakukan menggunakan metode Jeong dkk. (2004). Sebanyak 0,1 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu 50% dan dihomogenkan menggunakan vortex selama 3 menit. Selanjutnya, ditambahkan 2 mL larutan Na₂CO₃ 2% dan campuran diinkubasi dalam kondisi gelap selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kandungan total fenolik dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat ($\mu\text{g GAE/mL}$ ekstrak atau fraksi).

Penentuan kandungan total flavonoid

Penentuan kandungan total flavonoid dilakukan menggunakan metode Meda dkk. (2005). Sebanyak 1 mL sampel dicampurkan dengan 2 mL larutan AlCl₃ 2% dalam tabung reaksi, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya, absorbansi campuran diukur pada panjang gelombang 415 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin ($\mu\text{g QE/mL}$ ekstrak atau fraksi).

Penentuan kandungan total tanin

Penentuan kandungan tanin dilakukan menggunakan metode Julkunen-Tiito (1985). Sebanyak 0,5 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang dibungkus aluminium foil, kemudian ditambahkan 1,5 mL larutan vanilin-metanol 4% dan dihomogenkan menggunakan vortex selama 3 menit. Selanjutnya, campuran ditambahkan 0,75 mL HCl pekat dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 500 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kandungan tanin terkondensasi dinyatakan sebagai ekuivalen katekin ($\mu\text{g CE/mL}$ ekstrak).

Penentuan aktivitas penangkal radikal bebas DPPH

Penentuan aktivitas penangkal radikal bebas (metode DPPH) dari ekstrak dan fraksi ditentukan dengan metode Burda & Oleszeck (2001). Sebanyak 0,5 mL sampel direaksikan dengan 1,5 mL larutan DPPH, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex selama 2 menit. Perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning menunjukkan adanya aktivitas penangkal radikal bebas. Kemudian pada 5 menit terakhir menjelang 30 menit inkubasi, absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Aktivitas penangkal radikal bebas (APRB) dinyatakan sebagai persentase penurunan intensitas warna larutan DPPH dan dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$APRB (\%) = \left(1 - \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100$$

Uji Aktivitas Antibakteri Limbah Daun Nilam Hasil Penyulingan

Alat-alat dan media yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit (Pelu dkk., 2020). Kontrol positif dibuat menggunakan tablet Ciprofloxacin 500 mg. Satu tablet Ciprofloxacin digerus hingga halus, kemudian ditimbang sebanyak 0,01 g dan dilarutkan dalam 10 mL DMSO 10%. Selanjutnya, sebanyak 1 mL larutan Ciprofloxacin 0,1% diencerkan dengan 10 mL DMSO 10%. Kontrol negatif yang digunakan adalah larutan DMSO 10% (Winahyu dkk., 2019). Variasi konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi etil asetat dibuat pada konsentrasi 10%, 20%, dan 30%. Masing-masing konsentrasi ditimbang 0,10 g, 0,20 g, dan 0,30 g ekstrak, kemudian dilarutkan dalam 1 mL DMSO 10% (Purnomo & Azzahra, 2021).

Pembuatan media uji dikerjakan mengikuti Pelu dkk. (2020). Sebanyak 5,6 g nutrient agar (NA) dilarutkan dalam 250 mL akuades menggunakan erlenmeyer. Media kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 30 menit dan didinginkan hingga mencapai suhu 45–50 °C. Media dibagi ke dalam tiga erlenmeyer, kemudian masing-masing sebanyak 1 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* ditambahkan ke dalam dua erlenmeyer.

Sebanyak 20 mL media NA tanpa bakteri dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat. Setelah itu, dibuat sumuran menggunakan ujung pipet steril, kemudian ditambahkan 15 mL media NA yang mengandung suspensi bakteri. Ke dalam masing-masing sumuran dimasukkan sampel ekstrak dengan konsentrasi 10%, 20%, dan 30%, serta Ciprofloxacin sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran diukur menggunakan jangka sorong (Pelu dkk., 2020). Diameter zona hambat dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$x = \frac{(D_v - D_s) + (D_h - D_s)}{2}$$

Karakterisasi Limbah Daun Nilam Hasil Penyulingan

Sampel limbah daun nilam hasil penyulingan dianalisis menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS).

Analisis Data

Semua data penelitian dilakukan tiga kali ulangan dan hasilnya dinyatakan sebagai rata-rata \pm SD (Standar Deviasi). Analisis dilakukan menggunakan software SPSS versi 26.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi yang bertujuan untuk menarik senyawa bioaktif dari serbuk daun nilam hasil penyulingan menggunakan pelarut yang sesuai dengan karakteristik sampel. Proses maserasi dilakukan selama 72 jam. Nilai rendemen ekstrak yang diperoleh selanjutnya disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen ekstrak etanol daun nilam hasil penyulingan

Sampel	Serbuk sampel (g)	Ekstrak (g)	Rendemen (%)	Rata-rata Rendemen (%)
EE 1	200	7,673	3,84	3,75
EE 2	200	7,310	3,66	

Keterangan : EE 1 (ekstrak etanol ulangan 1), EE 2 (ekstrak etanol ulangan 2)

Tabel 1 menunjukkan bahwa rendemen ekstrak etanol yang diperoleh sebesar 3,75%. Proses ekstraksi dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut yang bersifat universal karena mampu melarutkan senyawa polar maupun nonpolar, serta memiliki tingkat toksisitas yang rendah sehingga aman digunakan dalam proses ekstraksi (Verawati dkk., 2017). Penggunaan etanol 96% dipilih karena bersifat lebih selektif dalam menarik senyawa target, memiliki daya absorpsi yang baik, mudah menguap, serta mampu menghasilkan ekstrak kental dalam waktu yang relatif lebih singkat dibandingkan dengan etanol 70% (Misna, 2016).

Partisi

Berdasarkan ekstrak yang telah diperoleh, selanjutnya dilakukan proses partisi cair–cair menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda. Nilai rendemen fraksi yang dihasilkan dari masing-masing pelarut disajikan pada Tabel 2.

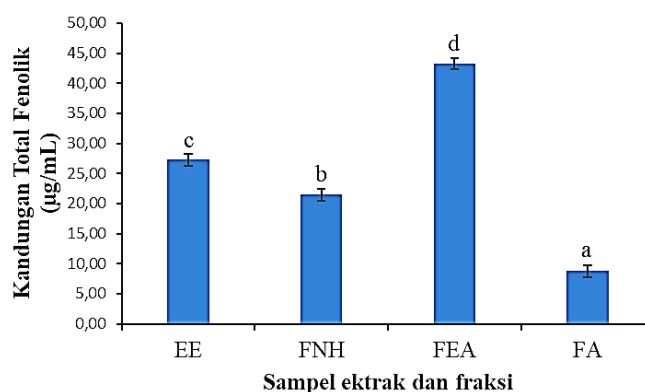
Tabel 2. Rendemen Hasil Partisi

Fraksi	Rendemen (%)
Fraksi n-heksana (FNH)	64,09
Fraksi etil asetat (FEA)	27,66
Fraksi Air (FA)	4,39

Berdasarkan hasil fraksinasi di Tabel 2, rendemen hasil fraksinasi tertinggi terdapat pada FNH yaitu sebesar 64,09% diikuti oleh FEA sebesar 27,66% dan FA sebesar 4,39%. Nilai rendemen FNH yang tinggi menunjukkan bahwa pelarut n-heksana mampu mengekstrak lebih banyak komponen bioaktif dengan sifat kepolaran yang rendah.

Kandungan total fenolik

Penetapan kandungan total fenolik ekstrak dan fraksi daun nilam hasil penyulingan dalam penelitian ini dilakukan menggunakan reagen Folin–Ciocalteu yang direaksikan dengan natrium karbonat (Na_2CO_3). Reaksi antara senyawa fenolik dan reagen Folin–Ciocalteu berlangsung dalam kondisi basa, yang memungkinkan terjadinya disosiasi proton pada gugus fenolik menjadi ion fenolat. Kondisi basa tersebut dibentuk melalui penambahan Na_2CO_3 (Noviyanty dkk., 2020). Kandungan total fenolik dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat, karena asam galat memiliki kemampuan yang baik dalam membentuk kompleks dengan reagen Folin–Ciocalteu sehingga menghasilkan reaksi yang lebih sensitif dan intensif. Reaksi tersebut ditandai dengan terbentuknya warna biru pekat akibat interaksi asam galat dengan reagen Folin–Ciocalteu (Rondonuwu dkk., 2017). Hasil analisis kandungan total fenolik ekstrak dan fraksi daun nilam hasil penyulingan disajikan pada Gambar 1.

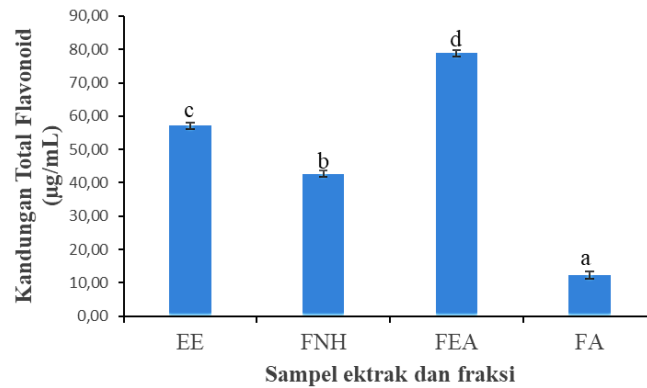


Gambar 1. Kandungan total fenolik dari ekstrak dan fraksi daun nilam

Berdasarkan Gambar 1, kandungan total fenolik tertinggi terdapat pada FEA sebesar 43,31 $\mu\text{g/mL}$, diikuti oleh EE sebesar 27,32 $\mu\text{g/mL}$, FNH sebesar 21,52 $\mu\text{g/mL}$, dan FA sebesar 8,74 $\mu\text{g/mL}$. Tingginya kandungan total fenolik pada FEA mengindikasikan bahwa senyawa fenolik dalam daun nilam hasil penyulingan umumnya bersifat semipolar dan memiliki kelarutan yang baik dalam pelarut etil asetat (Rondonuwu dkk., 2017). Senyawa fenolik memiliki struktur kimia yang terdiri atas cincin benzena yang bersifat nonpolar serta gugus hidroksil yang bersifat polar, sehingga karakter semipolar etil asetat memungkinkan ekstraksi senyawa fenolik berlangsung lebih optimal (Rudiana dkk., 2018).

Kandungan total flavonoid

Penetapan kandungan total flavonoid dilakukan menggunakan reagen AlCl_3 yang bekerja melalui pembentukan senyawa kompleks dengan gugus fungsi tertentu pada struktur flavonoid. Reaksi kompleksasi terjadi antara AlCl_3 dengan gugus karbonil pada posisi C-4 serta gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang berdekatan, terutama pada senyawa flavon dan flavonol. Kandungan total flavonoid dinyatakan dalam satuan ekuivalen kuersetin, karena kuersetin merupakan salah satu flavonoid standar yang dapat bereaksi secara optimal dengan AlCl_3 membentuk kompleks berwarna (Winahyu dkk., 2019). Hasil pengukuran kandungan total flavonoid pada ekstrak dan fraksi daun nilam hasil penyulingan disajikan pada Gambar 2.

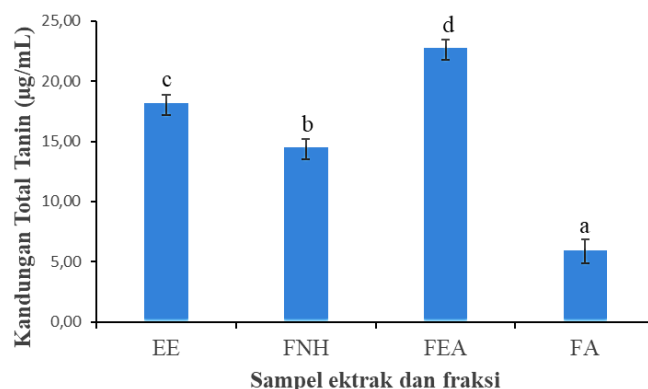


Gambar 2. Kandungan total flavonoid dari ekstrak dan fraksi daun nilam

Berdasarkan Gambar 2, FEA menunjukkan kandungan total flavonoid tertinggi sebesar 78,90 µg/mL, diikuti oleh EE sebesar 57,06 µg/mL, FNH sebesar 42,65 µg/mL, dan FA sebesar 12,29 µg/mL. Hasil kandungan flavonoid tersebut menggambarkan pengaruh perbedaan tingkat kepolaran pelarut yang digunakan selama proses fraksinasi. Etil asetat sebagai pelarut semipolar memiliki kemampuan yang lebih efektif dalam mengekstraksi senyawa flavonoid dibandingkan pelarut nonpolar seperti n-heksana maupun pelarut dengan kepolaran tinggi seperti air (Nurdyansyah & Widyastuti, 2020). Hal ini berkaitan dengan struktur kimia flavonoid yang umumnya tersusun atas gugus hidroksil dan sistem cincin aromatik, sehingga bersifat semipolar. Oleh karena itu, kesesuaian sifat kepolaran antara flavonoid dan etil asetat memungkinkan proses pelarutan berlangsung lebih optimal dibandingkan penggunaan n-heksana yang cenderung melarutkan senyawa lipofilik atau air yang kurang efektif melarutkan senyawa semipolar (Ionita, 2021).

Kandungan total tanin

Penetapan kandungan total tanin terkondensasi dilakukan berdasarkan prinsip pengujian vanilin-HCl. Pada kondisi asam, vanilin mengalami protonasi dalam larutan HCl sehingga membentuk karbokation yang selanjutnya bereaksi dengan senyawa flavonoid. Reaksi tersebut menghasilkan senyawa antara yang kemudian mengalami proses dehidrasi, ditandai dengan terbentuknya warna merah hingga ungu pada larutan (Salunkhe dkk., 1990). Kuantifikasi kandungan total tanin terkondensasi ditentukan menggunakan kurva standar katekin. Hasil analisis kandungan total tanin terkondensasi pada ekstrak dan fraksi daun nilam hasil penyulingan disajikan pada Gambar 3.



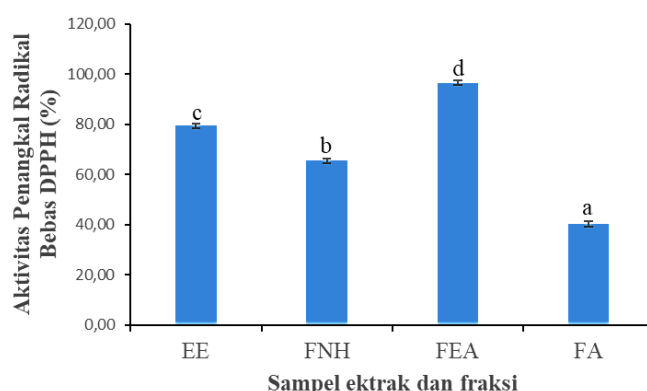
Gambar 3. Kandungan total tanin dari ekstrak dan fraksi daun nilam

Berdasarkan Gambar 3, FEA menunjukkan kandungan total tanin terkondensasi tertinggi sebesar 22,78 µg/mL, diikuti oleh EE sebesar 18,19 µg/mL, FNH sebesar 14,49 µg/mL, dan FA sebesar 5,90 µg/mL. Tingginya kandungan tanin pada FEA mengindikasikan bahwa etil asetat memiliki kemampuan yang baik dalam melarutkan senyawa tanin, yang tergolong sebagai polifenol dengan sifat semipolar. Efektivitas fraksi etil asetat dalam mengekstraksi tanin sejalan dengan hasil penelitian

Rosamah dkk. (2017) yang menyatakan bahwa fraksi yang larut dalam etil asetat umumnya memiliki kandungan tanin terkondensasi yang relatif tinggi.

Penentuan aktivitas penangkal radikal bebas DPPH

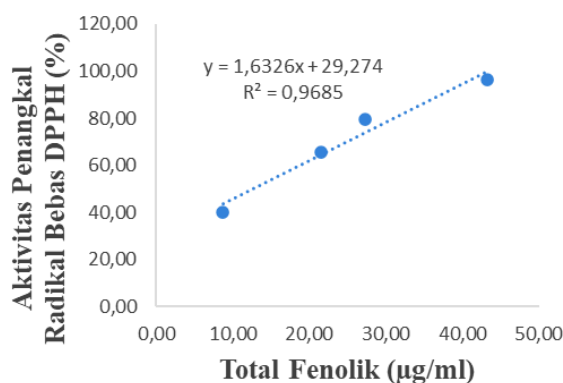
Aktivitas penangkal radikal bebas ditentukan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Prinsip pengujian ini didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan dalam mereduksi radikal bebas DPPH, yang ditandai dengan perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning serta penurunan nilai absorbansi. Radikal DPPH memiliki elektron tidak berpasangan yang memberikan warna ungu, dan akan mengalami penetralan ketika menerima pasangan elektron atau atom hidrogen dari senyawa antioksidan. Proses ini menghasilkan senyawa difenil pikrilhidrazin yang bersifat stabil, sehingga intensitas warna ungu DPPH berkurang. Penurunan intensitas warna tersebut seiring dengan peningkatan konsentrasi sampel menyebabkan penurunan absorbansi dan peningkatan persentase peredaman radikal bebas. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi limbah daun nilam hasil penyulingan disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Diagram batang aktivitas penangkal radikal bebas DPPH

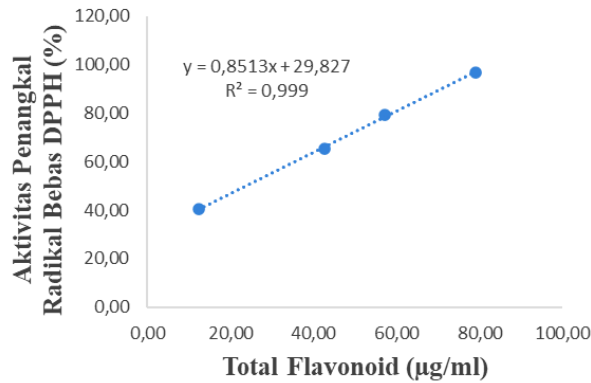
Berdasarkan Gambar 4, FEA menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi berdasarkan uji DPPH sebesar 96,61%, diikuti oleh EE sebesar 79,42%, FNH sebesar 65,45%, dan FA sebesar 40,32%. Temuan ini mengindikasikan bahwa aktivitas penangkal radikal bebas pada limbah daun nilam hasil penyulingan cenderung lebih tinggi pada fraksi dengan kepolaran menengah dibandingkan fraksi nonpolar maupun sangat polar. Tingginya aktivitas antioksidan pada FEA sejalan dengan tingginya kandungan flavonoid yang diketahui memiliki kemampuan dalam menetralkan radikal bebas melalui gugus hidroksil fenolik yang berperan sebagai donor atom hidrogen.

Selain itu, kandungan fenolik, flavonoid, dan tanin pada ekstrak dan fraksi daun nilam hasil penyulingan menunjukkan hubungan positif dengan aktivitas antioksidan berdasarkan pengujian DPPH. Hubungan antara kandungan senyawa bioaktif tersebut dengan aktivitas antioksidan ditunjukkan melalui grafik korelasi yang disajikan pada Gambar 5, 6, dan 7.



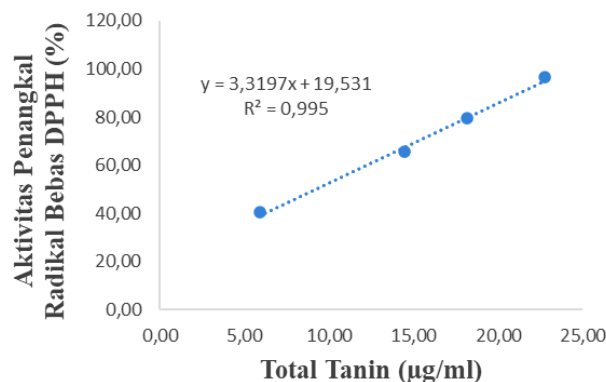
Gambar 5. Grafik hubungan antara fenolik dengan antioksidan

Berdasarkan Gambar 5, hubungan antara kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan menunjukkan persamaan regresi linear $y = 1,6326x + 29,274$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9685. Nilai R^2 yang tinggi tersebut mengindikasikan bahwa sebesar 96,85% variasi aktivitas penangkal radikal bebas DPPH dipengaruhi oleh kandungan total fenolik dalam sampel. Hubungan yang terbentuk bersifat linear positif, yang menunjukkan bahwa peningkatan kadar senyawa fenolik diikuti oleh peningkatan aktivitas antioksidan. Senyawa fenolik diketahui berperan sebagai antioksidan karena keberadaan gugus hidroksil yang mampu mendonorkan atom hidrogen atau elektron kepada radikal bebas, sehingga dapat menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme transfer elektron (Allo dkk., 2022).



Gambar 6. Grafik hubungan antara flavonoid dengan antioksidan

Berdasarkan Gambar 6, analisis hubungan antara kandungan total flavonoid dan aktivitas antioksidan menghasilkan persamaan regresi linear $y = 0,8513x + 29,827$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,999. Nilai R^2 yang mendekati satu menunjukkan bahwa sebesar 99,9% variasi aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh kandungan flavonoid, sehingga hubungan keduanya dapat dikategorikan sangat kuat. Flavonoid merupakan kelompok senyawa polifenol yang berperan sebagai antioksidan, terutama karena keberadaan gugus hidroksil dalam strukturnya (Raihan, 2022). Gugus hidroksil (-OH) tersebut memungkinkan flavonoid menstabilkan radikal bebas melalui mekanisme pendonoran atom hidrogen, sehingga radikal bebas berubah menjadi molekul nonradikal yang lebih stabil (Maanari dkk., 2014).



Gambar 7. Grafik hubungan antara tanin dengan antioksidan

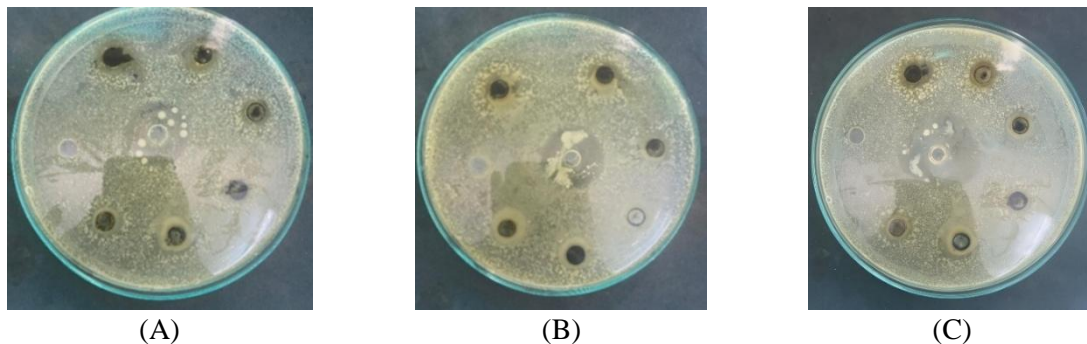
Berdasarkan Gambar 7, hubungan antara kandungan total tanin dan aktivitas antioksidan menunjukkan pola regresi linear dengan persamaan $y = 3,3197x + 19,531$ serta nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,995. Tingginya nilai R^2 menandakan bahwa sekitar 99,5% variasi aktivitas penangkal radikal bebas dipengaruhi oleh kadar tanin dalam sampel, sehingga korelasi yang terbentuk tergolong sangat kuat dan bersifat positif. Tanin diketahui memiliki sejumlah gugus hidroksil yang mampu berperan sebagai donor atom hidrogen terhadap radikal bebas, termasuk DPPH, sehingga membentuk senyawa DPPH-H yang lebih stabil dan tidak bersifat radikal (Hasan dkk., 2022).

Aktivitas Antibakteri Limbah Daun Nilam Hasil Penyulingan

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran menggunakan dua bakteri uji, yaitu *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri Gram positif dan *Escherichia coli* sebagai bakteri Gram negatif. Sampel yang digunakan terdiri atas ekstrak etanol (EE) serta fraksi etil asetat (FEA) pada beberapa variasi konsentrasi (% b/v). Hasil pengujian dibandingkan dengan kontrol positif berupa ciprofloxacin dan kontrol negatif berupa akuades. Fraksi etil asetat dipilih untuk pengujian antibakteri karena menunjukkan aktivitas antioksidan paling tinggi pada pengujian sebelumnya. Nilai zona hambat yang dihasilkan oleh EE dan FEA daun nilam hasil penyulingan terhadap *S. aureus* dan *E. coli* disajikan pada Tabel 3 dan 4.

Tabel 3. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun nilam hasil penyulingan terhadap bakteri *S. aureus*

Perlakuan	Rara-Rata Diameter Zona Hambat (mm)	
	Ekstrak Etanol	Fraksi Etil Asetat
10%	11,10 ± 0,97 ^{bc}	10,17 ± 0,51 ^b
20%	12,55 ± 0,48 ^{cd}	13,13 ± 0,58 ^{de}
30%	14,73 ± 0,64 ^e	16,80 ± 0,96 ^f
Kontrol Positif	34,35 ± 0,77 ^g	
Kontrol Negatif	0,0 ± 0,00 ^a	



Gambar 8. Aktivitas antibakteri *S. aureus* dari EE dan FEA :Ulangan 1; (B) Ulangan 2; (C) Ulangan 3

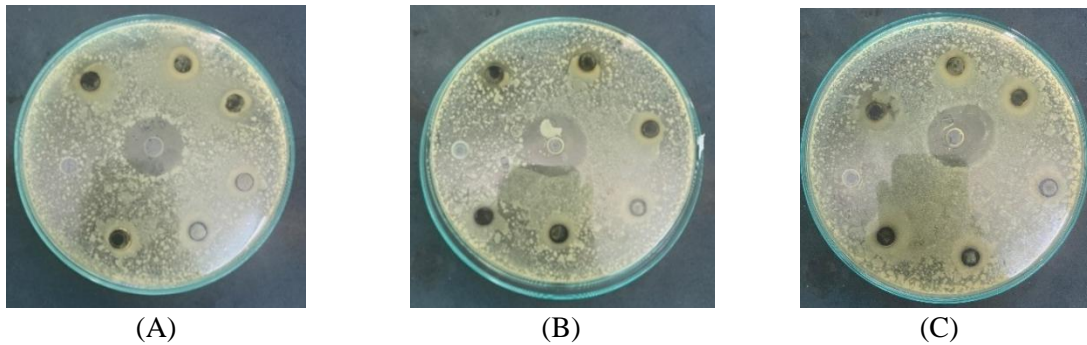
Hasil perbandingan kedua sampel menunjukkan bahwa daya hambat antibakteri dipengaruhi oleh variasi konsentrasi. Pada konsentrasi terendah (10%), ekstrak etanol (EE) menunjukkan diameter zona hambat yang sedikit lebih besar, yaitu sekitar 11,10 mm, dibandingkan fraksi etil asetat (FEA) yang menghasilkan zona hambat sekitar 10,17 mm. Namun, dengan meningkatnya konsentrasi, pola tersebut mengalami pergeseran. Pada konsentrasi tertinggi (30%), FEA memberikan efek penghambatan yang lebih kuat dengan diameter zona hambat mencapai sekitar 16,80 mm, sedangkan EE hanya menunjukkan zona hambat sekitar 14,73 mm. Hal ini sejalan dengan pernyataan Schlegel (1994) bahwa kemampuan suatu ekstrak dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme sangat dipengaruhi oleh konsentrasi senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat memiliki potensi antibakteri yang lebih tinggi terhadap *Staphylococcus aureus* dibandingkan ekstrak etanol.

Hasil perbandingan kedua sampel menunjukkan bahwa efektivitas antibakteri dipengaruhi oleh variasi konsentrasi yang diberikan. Pada konsentrasi terendah (10%), ekstrak etanol (EE) menghasilkan diameter zona hambat yang sedikit lebih besar, yakni sekitar 10,50 mm, dibandingkan fraksi etil asetat (FEA) yang menunjukkan zona hambat sekitar 10,03 mm. Akan tetapi, peningkatan konsentrasi menyebabkan perubahan pola aktivitas antibakteri. Pada konsentrasi tertinggi (30%), FEA menunjukkan daya hambat yang lebih dominan dengan diameter zona hambat mencapai sekitar 15,25 mm, sedangkan EE menghasilkan zona hambat sekitar 13,47 mm. Hasil ini menguatkan pernyataan Rustama dkk. (2005) bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak berbanding lurus dengan besarnya zona hambat yang terbentuk.

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat memiliki potensi antibakteri yang lebih tinggi terhadap *Staphylococcus aureus* dibandingkan ekstrak etanol.

Tabel 4. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun nilam hasil penyulingan terhadap bakteri *E. coli*

Perlakuan	Rata-Rata Diameter Zona Hambat (mm)	
	Ekstrak Etanol	Fraksi Etil Asetat
10%	10,50 ± 0,44 ^b	10,03 ± 0,13 ^b
20%	12,05 ± 0,67 ^c	13,40 ± 0,88 ^c
30%	13,47 ± 0,68 ^c	15,25 ± 0,52 ^d
Kontrol Positif	35,13 ± 0,25 ^e	
Kontrol Negatif	0,0 ± 0,00 ^a	



Gambar 9. Aktivitas antibakteri *E. coli* dari EE dan FEA: (A) Ulangan 1; (B) Ulangan 2; (C) Ulangan 3

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antibakteri yang disajikan pada Tabel 3 dan 4, diketahui bahwa ekstrak etanol (EE) dan fraksi etil asetat (FEA) daun nilam hasil penyulingan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Tingkat aktivitas antibakteri suatu sampel ditentukan oleh besar kecilnya diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran. Menurut Davis dan Stout (1971), daya antibakteri diklasifikasikan menjadi beberapa kategori, yaitu lemah (≤ 5 mm), sedang (5–10 mm), kuat (10–20 mm), dan sangat kuat (≥ 20 mm). Berdasarkan kriteria tersebut, diameter zona hambat yang dihasilkan oleh EE dan FEA terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* termasuk dalam kategori kuat, sehingga menunjukkan bahwa kedua sampel memiliki aktivitas antibakteri yang baik.

Analisis Hasil Pengujian GC-MS

Identifikasi senyawa pada ekstrak daun nilam dilakukan menggunakan instrumen GC-MS untuk mengetahui jenis serta komposisi senyawa aktif yang terkandung, yang ditentukan berdasarkan nilai luas area puncak kromatogram yang terdeteksi.

Tabel 5. Hasil GC-MS daun nilam hasil penyulingan.

No	Waktu Retensi (min)	Berat Molekul (g/mol)	Rumus Kimia	Nama Senyawa	Area Sum %	SI
1	29,681	270.5	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Hexadecanoic acid, methyl ester	8,05	97,23
2	36,273	292.5	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)	4,62	96,31
3	37,751	296.5	C ₂₀ H ₄₀ O	Phytol	17,92	96,14
4	35,076	294.5	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)	4,51	93,38
5	27,76	222.37	C ₁₅ H ₂₆ O	Patchouli alcohol	3,55	90,16

Berdasarkan data pada Tabel 4, diperoleh sebanyak 5 senyawa metabolit yang masuk kriteria nilai kecocokan SI (Similarity index: SI>90). Nilai SI suatu komponen senyawa mendekati 100% menunjukkan bahwa senyawa yang teridentifikasi itu semakin mendekati senyawa standar (Rasyid, 2016). Hasil analisis menggunakan GC-MS terhadap fraksi etil asetat daun nilam hasil penyulingan menunjukkan bahwa fraksi tersebut mengandung senyawa dari golongan terpenoid dan asam lemak. Senyawa terpenoid yang teridentifikasi meliputi Phytol dan Patchouli alcohol, sedangkan senyawa dari golongan asam lemak antara lain Hexadecanoic acid, methyl ester, 9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester (Z,Z,Z), dan 9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester (E,E).

Penelitian yang dilaporkan oleh Misrahanum dkk. (2022) menyebutkan bahwa phytol dan beberapa turunan asam lemak, seperti 9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester serta hexadecanoic acid, methyl ester, memiliki aktivitas antibakteri. Aktivitas ini terutama berlangsung melalui mekanisme perusakan membran sel bakteri, yang menyebabkan keluarnya komponen intraseluler serta terganggunya proses metabolisme sel. Mekanisme tersebut dapat menjelaskan perbedaan sensitivitas bakteri uji, di mana bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* menunjukkan daya hambat yang lebih besar dibandingkan bakteri Gram negatif *Escherichia coli*, mengingat struktur dinding sel Gram positif yang relatif lebih sederhana dan lebih mudah ditembus oleh senyawa yang bersifat lipofilik.

Selain berperan sebagai antibakteri, beberapa senyawa yang teridentifikasi juga dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan. Mazumder dkk. (2020) menyatakan bahwa senyawa seperti hexadecanoic acid, methyl ester; 9,12-octadecadienoic acid, methyl ester (E,E); 9-octadecenoic acid, methyl ester (Z); serta 9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester (Z,Z,Z) menunjukkan potensi sebagai antioksidan. Aktivitas tersebut berkaitan dengan kemampuannya dalam menghambat proses peroksidasi lipid dan menetralkan radikal bebas. Asam lemak tak jenuh beserta ester metilnya berperan sebagai chain-breaking antioxidants dengan mendonorkan atom hidrogen atau menstabilkan radikal peroksil, sehingga dapat mencegah kerusakan oksidatif pada membran sel. Keberadaan ikatan rangkap dalam struktur senyawa, khususnya pada 9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester, turut meningkatkan efektivitas penangkapan radikal bebas dan berkontribusi dalam menurunkan tingkat stres oksidatif. Dengan demikian, keberadaan senyawa-senyawa tersebut mendukung potensi daun nilam sebagai sumber antioksidan alami yang efektif dalam mencegah kerusakan sel akibat oksidasi.

KESIMPULAN

Daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) hasil penyulingan menunjukkan aktivitas penangkal radikal bebas terhadap DPPH, dengan persentase peredaman tertinggi diperoleh pada fraksi etil asetat sebesar 96,61%. Selain itu, hasil pengujian antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak etanol (EE) dan fraksi etil asetat (FEA) daun nilam hasil penyulingan memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Aktivitas antibakteri cenderung meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi sampel. Daya hambat tertinggi diamati pada konsentrasi 30%, masing-masing sebesar 16,80 mm (FEA) dan 14,73 mm (EE) terhadap *Staphylococcus aureus*, serta 15,25 mm (FEA) dan 13,47 mm (EE) terhadap *Escherichia coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Allo, I. S., Suryanto, E., & Koleangan, H. S. 2022. aktivitas antioksidan fenolik bebas dan terikat dari dari tepung cangkang pala (*myristica fragrans* houtt). *Chemistry Progress*. 15(2): 83-92.
- Aryani, F., Sari, N. M., Syaumi, A., Paurru, P., & Zamroni, A. 2022. Penapisan Fitokimia Limbah Padat Penyulingan Minyak Nilam (*Pogostemon heyneatus*). *Buletin loupe*. 18(02): 60-65.
- Burda, S., & Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49(6): 2774-2779.
- Daniati, E., Mastura, M., & Hasby, H. 2021. Isolasi dan Penentuan Kadar Minyak Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) Asal Peunaron Kabupaten Aceh Timur Menggunakan GC-MS. *Jurnal Penelitian Kimia dan Pendidikan Kimia*. 4(1): 14-22.
- Davis, W. W., & Stout, T. R. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay: I. Factors influencing variability and error. *Applied microbiology*. 22(4): 659-665.

- Halliwell, B. 2012. Free Radicals and Antioxidant: Updating a Personal View. *Nutrition Review*. 70(5): 257-265.
- Hasan, H., Thomas, N. A., Hiola, F., Ramadhani, F. N., & Ibrahim, A. S. 2022. Skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) dengan metode 1, 1-diphenyl-2-picrylhidrazyl (DPPH). *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*. 2(1): 67-73.
- Ionita, P. 2021. The chemistry of DPPH: free radical and congeners. *International journal of molecular sciences*. 22(4): 1-15.
- Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Jo, S.C., Nam, K.C., Ahn, D.U., & Lee, S.C. 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from Citrus Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(11): 3389-3393.
- Julkunen-Tiitto, R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*. 33(2): 213-217.
- Maanari, C. P., Suryanto, E., & Pontoh, J. 2014. Aktivitas Penangkal Radikal Hidroksil Fraksi Flavonoid dari Limbah Tongkol Jagung pada Tikus Wistar. *Jurnal MIPA*. 3(2): 134-138.
- Magani, A. K., Tallei, T. E., & Kolondam, B. J. 2020. Uji Antibakteri Nanopartikel Kitosan terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Bios Logos*. 10(1): 7-12.
- Mazumder, K., Nabila, A., Aktar, A., & Farahnaky, A. 2020. Bioactive variability and in vitro and in vivo antioxidant activity of unprocessed and processed flour of nine cultivars of Australian lupin species: a comprehensive substantiation. *Antioxidants*. 9(4): 1-23.
- Meda, A., C. E. Lamien, Romito & M. Millogo J., O. G. Nacoulma. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honeys as well as their radical scavenging activity. *J. Food Chem*. 91(3): 571-577
- Misna, M., & Diana, K. 2016. Aktivitas antibakteri ekstrak kulit bawang merah (*Allium cepa* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmasi Galenika*. 2(2): 138-144.
- Misrahanum, M., Zahira, C. A. D., & Saidi, N. 2022. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Gaharu (*Aquilaria Malaccensis* Lamk.) Dan Identifikasi Senyawa Dengan Metode GC-MS. *Jurnal Pharmascience*. 9(2): 310-318.
- Noviyanty, Y., Agustian, Y. 2020. Identifikasi Dan Penetapan Kadar Senyawa Tanin Pada Ekstrak Daun Biduri (*Calotropis Gigantea*) Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 6(1): 57-64.
- Nurdyansyah, F., & Widyastuti, D. A. 2020. Comparison of antioxidant activity of ethanolic, methanolic, n-hexan, and aqueous extract of *Parkia speciosa* peel based on half-maximal inhibitory concentration through free radical inhibition. *Advance Sustainable Science, Engineering and Technology*. 2(2): 343559.
- Pelu, A. D., Tunny, R., & Latuconsina, B. 2020. Skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol bulu babi (*Diadema setosum*) terhadap pertumbuhan *staphylococcus aureus* di perairan desa pelauw. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 4(2): 01-15.
- Purnomo, H. Y., & Azzahra, F. 2021. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Alpukat (*Persea americana* M) Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Kefarmasian Akfarindo*. 6(2): 7-14.
- Raihan, G. I. D. 2022. Uji Sitotoksisitas Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Journal of Health and Medical Science*. 187-202.
- Rondonuwu, S.D.J., Suryanto, E., Sudewi, S. 2017. Kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan dari fraksi pelarut sagu baruk (*Arenga microcharpa*). *Chemistry Progress*. 10(1): 29-32.
- Rosamah, E., Awaliyan, H.M.R., dan Sukaton, E. 2017. Karakteristik Tanin dari Ekstrak Kulit Kayu Leda (*Eucalyptus deglupta* Blume.). *Jurnal Hutan Tropis*. 1(1): 16-28.
- Rudiana, T., Fitriyanti dan Adawiah. 2018. Aktivitas Antioksidan dari Batang Gandaria (*Bouea macrophylla* Griff). *Jurnal Kimia dan Pendidikan*. 3(2): 195-205.
- Rustama, M. M., Rahayuningsih, S. R., Kusmoro, J., & Safitri, R. 2005. Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak air dan etanol bawang putih (*Allium sativum* L.) terhadap bakteri Gram negatif dan Gram positif. *BIOTIKA Jurnal Ilmiah Biologi*. 4(2).
- Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S. 1990. *Dietary Tannins Consequences and Remedies*. CRC Press, Boca Raton.

- Sanit, E. M., Adu, R. E. Y., Kolo, M. M., & Korbafo, E. 2023. Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Kain Tenun Timor Setelah Mordanting dengan Biomordan Tanin Kulit Biji Asam. *Jurnal Saintek Lahan Kering*. 6(1): 1-3.
- Schlegel H. G., 1994. *Mikrobiologi Umum*. Penerjemah Tedjo Baskoro. Edisi keenam Gajah Mada University Press: Yogyakarta
- Sernita, S., Nurhadia, N., & Seripaica, S. 2021. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Nilam (*Pogostemon Cablin Benth.*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Analisis Kesehatan Kendari*. 3(2): 86-92.
- Tjakra, G. M., Suryanto, E., & Aritonang, H. F. 2022. Analisis GC-MS dan Aktivitas Antioksidan Asap Cair dari Limbah Cangkang Biji Pala. *Chemistry Progress*. 15(2): 93-99.
- Verawati, V., Nofiandi, D., & Petmawati, P. 2017. Pengaruh metode ekstraksi terhadap kadar Fenolat total dan aktivitas antioksidan daun Salam (*Syzygium polyanthum (Wight) Walp.*). *Jurnal Katalisator*. 2(2): 53-60.
- Winahyu, D.A., Retnaningsih, A. dan Aprilia, M. 2019. Penetapan Kadar Flavonoid pada Kulit Batang Kayu Raru (*Cotylelobiummelanoxyylon P*) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Analisis Farmasi*. 4(1): 29-36.