

PENGEMBANGAN METODE ANALISIS KUERSETIN DALAM EKSTRAK ETANOL BUAH LEUNCA (*Solanum nigrum* L.) MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

*Analytical Method Development of Quercetin in The Ethanol Extract of Leunca Fruit (*Solanum nigrum* L.) by High Performance Liquid Chromatography*

Fitrotun Husnia, Aqnes Budiarti*
Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim

*E-mail korespondensi : aqnesliu@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.32382/mf.v17i2.2209>

Date submitted 2021-07-12, Accept Submission 2021-11-01

ABSTRACT

*Leunca fruit (*Solanum nigrum* L.) contains flavonoid compounds that are efficacious as antioxidants. The flavonoids in leunca fruit are mostly in the form of quercetin and its glycoside derivatives. Quercetin is polar and can be determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The purpose of this study was to develop a method for determining quercetin levels using HPLC and to apply the method to the ethanol extract of leunca fruit. Leunca fruit was extracted by maceration using 96% ethanol solvent and concentrated using a rotary evaporator. The HPLC system used was the Jasco type with a detector UV-Vis, the wavelength at 370 nm and C18 was used as stationary phase. The mobile phase consisted of aquabidest: methanol (41: 59, v/v) with isocratic delivery at a flow rate was 1 mL/minute. The assay method validation includes linearity, sensitivity, selectivity, precision and accuracy parameters. The results of this study showed that the quercetin assay method was validated with all parameters meeting the requirements. The linearity test resulted in a correlation value (r) = 0.99954, a limit of detection of 0.355 $\mu\text{g/mL}$ and a quantitation limit of 1.185 $\mu\text{g/mL}$, good selectivity, precision yielding RSD less than 2% and accuracy yielding recovery in the range 100.102-100.150%. The validated method was successful to be applied for determining quercetin in the ethanol extract of leunca fruit at 0.0086%.*

Keywords : *Quercetin, leunca, validation method*

ABSTRAK

Buah leunca (*Solanum nigrum* L.) mengandung senyawa flavonoid yang berkhasiat sebagai antioksidan. Flavonoid di dalam buah leunca sebagian besar berupa kuersetin dan turunan glikosidanya. Kuersetin bersifat polar dan dapat dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode penetapan kadar kuersetin menggunakan KCKT dan mengaplikasikan metode pada ekstrak etanol buah leunca. Buah leunca diekstraksi dengan pelarut etanol 96% secara metode maserasi dan dipekatkan menggunakan evaporator putar. Sistem KCKT yang digunakan adalah tipe Jasco dilengkapi detektor UV-Vis dengan panjang gelombang pada 370 nm. Fase diam yang digunakan adalah C₁₈. Fase gerak adalah campuran akuabides: metanol (41: 59, v/v) yang diantarkan secara isokratik dengan laju alir 1 mL/menit. Validasi metode penetapan kadar meliputi parameter linearitas, sensitivitas, selektivitas, presisi dan akurasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode penetapan kadar kuersetin tervalidasi dengan semua parameter memenuhi persyaratan. Uji linieritas menghasilkan nilai korelasi (r) = 0,99954, batas pendeteksian sebesar 0,355 $\mu\text{g/mL}$ dan batas kuantitasi sebesar 1,185 $\mu\text{g/mL}$, selektivitas baik, presisi menghasilkan RSD kurang dari 2% dan akurasi menghasilkan perolehan kembali pada rentang 100,102-100,150%. Metode tervalidasi dapat diaplikasikan untuk menetapkan kadar kuersetin dalam ekstrak etanol buah leunca sebesar 0,0086%.

Kata kunci : Kuersetin, leunca, validasi metode

PENDAHULUAN

Buah leunca mengandung metabolit sekunder yang terdiri dari flavonoid, fenolik,

kumarin, terpenoid, tanin, alkaloid, dan kuinon ([Hameed & Akhtar, 2018](#)). Penelitian [Gbadamosi dan Afolayan \(2016\)](#) melaporkan

kandungan flavonoid total dalam ekstrak etanol buah leunca sebesar 2,11 mg QAE/g. Sedangkan penelitian [Veerapagu et al. \(2018\)](#) menunjukkan kandungan flavonoid pada ekstrak metanol buah leunca sebesar 3,61 mg QAE/g. [Nur Alam et al. \(2012\)](#) menetapkan kadar flavonoid pada ekstrak etanol buah leunca sebesar 0,62 mg/g.

Flavonoid di dalam buah leunca sebagian besar berupa kuersetin dan turunan glikosidanya ([Nawwar et al., 1989](#)). Penelitian [Hameed dan Akhtar \(2018\)](#) melaporkan kadar kuersetin dalam ekstrak metanol buah leunca sebesar 2,77 µg/mg. Kadar kuersetin dalam buah leunca yang sangat kecil ini memerlukan metode analisis yang sensitif.

Senyawa kuersetin bersifat polar dan mengandung gugus kromofor yang dapat dianalisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dilengkapi detektor UV-Vis. KCKT sebagai metode analisis bersifat selektif dan sensitif ([Gandjar & Rohman, 2016](#)). KCKT memiliki kesesuaian untuk analisis komponen senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam suatu campuran seperti flavonoid.

[Nugraha dan Ghozali \(2014\)](#) telah menetapkan kadar kuersetin dalam ekstrak kulit apel hijau (*Pyrus malus* L.) menggunakan KCKT dengan fase diamnya C_{18} serta fase gerak adalah campuran akuabides dan metanol (59: 41, v/v) dengan laju alir 1,2 mL/menit serta panjang gelombang 371 nm. Metode penetapan kadar yang digunakan hanya divalidasi pada parameter linieritas dan selektivitas sehingga perlu dilakukan validasi pada parameter ketelitian, ketepatan dan sensitivitas untuk memberikan data yang lebih terjamin validitasnya. Penelitian ini juga tidak melakukan optimasi komposisi fase gerak dengan waktu retensi kromatogram yang dihasilkan relatif lama yaitu 6,138 menit.

[Dwiyoga \(2012\)](#) melakukan optimasi dan menetapkan kadar kuersetin yang terkandung dalam teh hijau menggunakan KCKT berfase terbalik dengan fase diam C_{18} serta fase gerak berupa campuran akuabides, metanol dan asam fosfat 5% (49: 50: 1, v/v) dengan laju alir 1 mL/menit pada panjang gelombang 370 nm. Metode dapat diaplikasikan untuk menetapkan kadar kuersetin walaupun waktu retensi kromatogram lama yaitu 15,495 menit.

[Sukmawati et al. \(2019\)](#) menggunakan KCKT untuk menetapkan kadar kuersetin dalam ekstrak etanol daun miana (*Plectranthus scutellarioides* L.). Fase diam yang digunakan C_{18} dan fase gerak berupa campuran akuabides dan metanol (41 : 59, v/v) dengan laju alir pada

1 mL/menit dan panjang gelombang 369,11 nm. Metode penetapan kadar memenuhi parameter linieritas namun belum divalidasi pada parameter presisi, akurasi, selektivitas dan sensitivitas. Kadar kuersetin dalam ekstrak etanol daun miana yang ditetapkan menggunakan metode ini sebesar 3,122 mg/g atau 0,3122%.

Berdasarkan hasil penelitian-penelitian di atas maka perlu dikembangkan metode penetapan kadar kuersetin tervalidasi menggunakan KCKT dengan optimasi fase gerak untuk menghasilkan waktu retensi yang cepat. Metode ini diharapkan dapat diaplikasikan pada ekstrak etanol buah leunca.

METODE

Jenis dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini berjenis non eksperimental laboratorium. Penelitian dilakukan pada bulan Juli 2020 – Januari 2021. Determinasi tanaman serta buahnya dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Biologi FMIPA Universitas Diponegoro. Ekstraksi dan penetapan kadar kuersetin dilaksanakan di Laboratorium Kimia pada Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim.

Alat dan Bahan

Alat yang dipakai dalam penelitian ini meliputi KCKT (Jasco) dilengkapi detektor UV-Vis, kolom C_{18} (LiChroCART) (125 x 4 mm), Spektrofotometer UV/Vis (1800 Shimadzu), injektor (Hamilton), membran penyaring 0,45 µm (Whatman), *ultrasonic cleaner* digital (Jeken), evaporator putar (Heidolph German), mikropipet (Socorex), timbangan analitik (Ohaus) dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium farmasi analisis.

Bahan yang dipakai dalam penelitian ini meliputi buah leunca dari budidaya PT. Benih Citra Asia yang berlokasi di Kecamatan Cimanggu Kabupaten Cilacap, kuersetin baku pembandingan, etanol 96%, metanol pro KCKT, akuabides, metanol, magnesium, asam klorida pekat dan bahan lain yang biasa dipakai di laboratorium farmasi analisis.

Prosedur Kerja

Determinasi Tanaman

Determinasi dengan cara mencocokkan ciri pada morfologi tanaman leunca terhadap kunci-kunci determinan pada buku Flora of Java.

Penyiapan sampel

Buah leunca segar berwarna hijau dicuci bersih kemudian ditiriskan hingga kering. Buah leunca sebanyak 400 gr ditambah sedikit etanol 96% lalu diblender kasar. Hasil blender dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 3000 mL selama tiga hari sambil diaduk frekuensi tiap 8 jam. Campuran leunca dan etanol disaring dengan pompa vakum sehingga akan didapatkan maserat 1. Ampas direndam kembali dengan 1000 mL etanol selama 2 hari, lalu disaring dan didapatkan maserat 2. Maserat 1 dan juga 2 diinapkan semalam lalu dipisahkan dari residunya dan dipekatkan dengan alat evaporator putar pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak etanol yang kental.

Identifikasi Senyawa Flavonoid

Identifikasi senyawa flavonoid secara uji Shinoda. Sampel ekstrak ditimbang sebanyak 1 gram lalu dilarutkan dengan etanol PA kemudian disaring. Sebanyak 2 mL larutan ekstrak etanol dimasukkan ke dalam tabung untuk reaksi. Larutan sampel dan larutan kuersetin sebagai pembanding masing-masing ditambah asam klorida pekat (HCl) sebanyak dua tetes. Kemudian ditambahkan serbuk magnesium (Mg) lalu dikocok dan ditunggu sampai terjadinya reaksi perubahan warna. Ekstrak dinyatakan mengandung flavonoid dengan tanda berupa perubahan warna menjadi orange, merah, dan hijau ([Lisi, Runtuwene and Wewengkang, 2017](#)).

Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Zat baku kuersetin ditimbang sebanyak 100 mg dengan seksama lalu dimasukkan dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas. Larutan induk yang diperoleh dengan konsentrasi 1000 µg/mL ([Nugraha dan Ghozali 2014](#)).

Penentuan Panjang Gelombang Deteksi

Larutan induk kuersetin diencerkan dengan fase gerak campuran akuabides : metanol (46: 54, v/v) hingga didapatkan konsentrasi 6 µg/mL. Penyusuran panjang gelombang menggunakan instrumen spektrofotometer UV dengan rentang panjang gelombang 350-400 nm selanjutnya dipilih panjang gelombang maksimal.

Penentuan Kondisi Optimum Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kondisi optimum diperoleh dengan memilih komposisi fase gerak campuran akuabides dan metanol (41: 59, 46: 54 dan 39: 64, v/v) yang memberikan data optimal. Sistem

elusi fase gerak adalah isokratik pada laju alir sebesar 1,0 mL/menit.

Validasi Metode Analisis

Uji Linieritas

Larutan seri baku kuersetin dibuat konsentrasi pada 2; 4; 6; 8; 10; 12 µg/mL disuntikkan ke alat KCKT. Persamaan regresi terbaik dipilih dan juga digunakan untuk persamaan kurva baku dalam penetapan kadar sampel. Parameter uji linieritas dilakukan replikasi tiga kali.

Uji Sensitivitas

Uji sensitivitas atau kepekaan ditentukan dengan nilai batas deteksi atau LOD yang diperoleh berdasarkan persamaan $Y = Y_B + 3 S_B$ dan nilai batas kuantitasi atau LOQ yang diperoleh berdasarkan persamaan $Y = Y_B + 10 S_B$ ([Miller & Miller, 2005](#)).

Uji Selektivitas

Selektivitas ditentukan dengan mengamati kromatogram kuersetin dan menghitung nilai resolusi puncak kuersetin dengan puncak zat lain yang ikut terdeteksi.

Uji Presisi

Larutan kuersetin pada konsentrasi 6; 8 dan 10 µg/mL masing-masing disaring menggunakan membran ukuran 0,45 µm kemudian disuntikkan sebanyak 20 µL ke alat KCKT pada kondisi optimum. Replikasi dilakukan sebanyak 6 kali untuk kadar masing-masing. Selanjutnya menghitung nilai %RSD ([Gandjar & Rohman, 2007](#)).

Uji Akurasi

Uji dilakukan secara metode penambahan baku atau *standard addition method*. Larutan sampel ditetapkan kadar kuersetinnya lalu ditambah kuersetin baku pembanding dengan kadar 80%, 100% 120% dari kadar kuersetin yang telah ditetapkan dalam larutan sampel. Replikasi sebanyak 3 kali selanjutnya dihitung persen perolehan kembalinya ([Snyder dkk., 2010](#)). Larutan baku pembanding kuersetin yang ditambahkan dengan konsentrasi 3; 3,5 dan 4 µg/mL setara terhadap kadar kuersetin di dalam ekstrak etanol buah leunca sebesar 88,31%, 103,03% dan 117,75%.

Penetapan Kadar Kuersetin

Sampel ekstrak etanol buah leunca ditimbang seksama 1000 mg lalu dimasukkan ke dalam labu takar ukuran 25 mL kemudian ditambah metanol hingga tanda batas. Larutan diultrasonikasi selama 15 menit. Larutan disaring lalu ditambah aquades hingga 50 mL kemudian digojok. Larutan diambil 1,0 mL lalu dimasukkan ke dalam labu takar ukuran 10 mL

kemudian ditambah metanol hingga mencapai tanda batas. Larutan disentrifugasi dengan vortex selama waktu 10 menit kemudian disaring dengan membran penyaring 0,45 µm. Larutan sampel dengan volume 20 µl diinjeksikan ke sistem KCKT.

Pengolahan dan Analisis Data

Data penelitian berupa kromatogram. Metode analisis dinyatakan valid jika hasil uji tiap parameter validasi memenuhi persyaratan. Kadar sampel ditentukan dengan cara luas area kromatogram sampel diplotkan pada persamaan regresi linear dari kurva baku kuarsetin.

HASIL

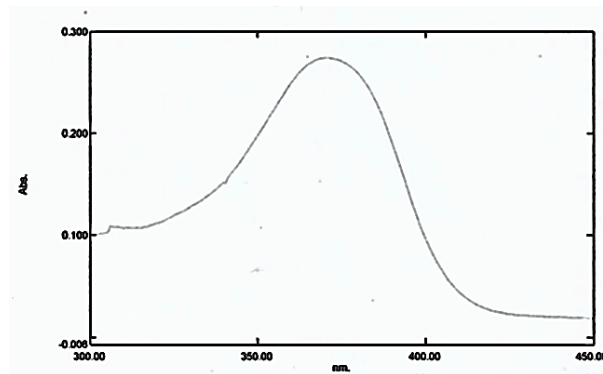
Rendamen Ekstrak

Tabel 1. Rendemen Ekstrak Etanol Buah Leunca

Berat Simplisia Kering (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen Ekstrak Kental (%)
400	40,58	10,15%

Sumber : Data Primer 2020

Panjang Gelombang Maksimal Kuarsetin.



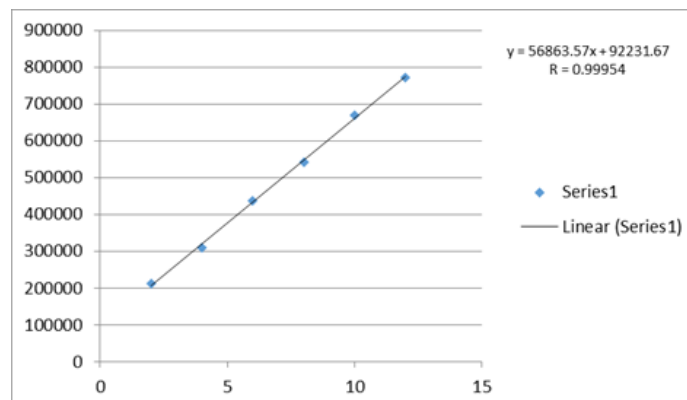
Gambar 1. Penelusuran Panjang Gelombang Kuarsetin.

Optimasi Fase Gerak.

Tabel 2. Hasil Optimasi Komposisi Fase Gerak

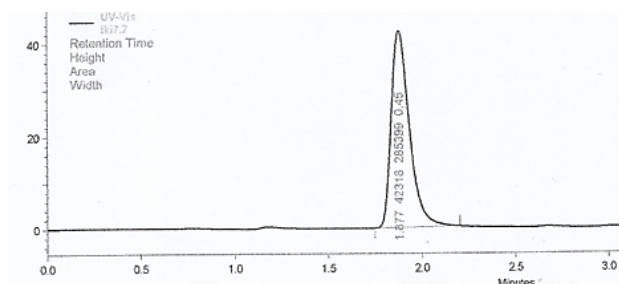
Komposisi Fase Gerak (akuabides : metanol, v/v)	RT (menit)	Luas Puncak	Keterangan
36: 64	1,880	238094	
41: 59	1,887	254917	Optimum
46: 54	1,890	211624	

Kurva Baku.



Gambar 2. Kurva Baku Kuarsetin

Uji Selektivitas Metode



Gambar 3. Kromatogram Kuersetin Dalam Ekstrak Etanol Buah Leunca

Uji Presisi Metode

Tabel 3. Hasil uji presisi

No	Kadar (µg/mL)	Replikasi	Kadar Rata-Rata (µg/mL)	SD	%RSD
1	6	6	6,0960	0,0494	0,810
2	8	6	8,0060	0,0049	0,065
3	10	6	10,0205	0,0132	0,131

Uji Akurasi Metode

Tabel 4. Hasil uji presisi

No	Penambahan Baku Pembanding (%)	Replikasi	Rata-Rata Perolehan Kembali (%)
1	88,31	3	100,102
2	103,03	3	100,133
3	117,75	3	100,150

1. Penetapan Kadar Kuersetin dalam Ekstrak Etanol Buah Leunca

Tabel 5. Hasil uji penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak

No	Luas Kromatogram (unit)	Kadar Kuersetin (µg/mL)	Kandungan Kuersetin dalam Ekstrak (%)
1	285399	3,397	0,0085
2	285160	3,393	0,0085
3	286461	3,416	0,0085
4	287473	3,434	0,0086
5	287844	3,440	0,0086
6	288654	3,454	0,0086
Rata-rata			0,0086
SD			0,00006
RSD			0,698%

PEMBAHASAN

Determinasi tanaman dan buah leunca bertujuan untuk memastikan kebenaran identitas sampel. Determinasi menghasilkan informasi bahwa buah yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian yaitu buah Leunca (*Solanum nigrum* L.).

Buah leunca diekstraksi secara maserasi dengan etanol 96% sebagai pelarut. Pemilihan metode ekstraksi maserasi karena dapat menjaga senyawa tidak tahan panas dari kerusakan seperti flavonoid yang merupakan senyawa target pada penelitian ini. Selain itu, maserasi mudah dilakukan.

Identifikasi senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol buah leunca dilakukan dengan uji shinoda. Perubahan warna larutan sampel dan larutan baku pembanding kuersetin dari hijau menjadi merah setelah ditambah reagen menandakan adanya kandungan flavonoid. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang memperlihatkan adanya perubahan larutan menjadi orange, merah, dan hijau tergantung pada jenis flavonoid yang dikandungnya ([Kristanti et al., 2008](#)). Reagen berisi logam Mg dan dua tetes HCl pekat untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada rumus bangun flavonoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah ataupun merah lembayung ([Ridho Asra et al., 2019](#)). Penelitian [Hameed dan Akhtar \(2018\)](#) melaporkan bahwa buah leunca mengandung flavonoid, satu di antaranya adalah kuersetin yang merupakan golongan flavonol.

Penelusuran panjang gelombang menggunakan instrumen spektrofotometri UV menghasilkan panjang gelombang maksimal 370.30 nm. Hasil ini hampir sama dengan penelitian [Dwiyoga \(2012\)](#) yang melaporkan panjang gelombang maksimal kuersetin adalah 370 nm. Panjang gelombang maksimal memiliki kepekaan maksimal karena terjadi perubahan absorbansi paling besar untuk tiap satuan konsentrasi ([Gandjar & Rohman, 2012](#)).

Optimasi fase gerak bertujuan untuk mendapatkan daya elusi terbesar. Fase gerak terdiri dari berbagai macam campuran pelarut yang dapat bercampur secara keseluruhan yang mempunyai peran sebagai daya elusi resolusi ([Gandjar & Rohman, 2012](#)). Selektivitas metode dapat dicapai di antaranya dengan cara jenis pelarut penyusun fase gerak dirubah ([Snyder et al., 1997](#)). Fase gerak terpilih adalah campuran akuabides dan metanol (41: 59, v/v) karena menghasilkan area kromatogram terluas, waktu retensi tercepat dan tidak terjadi tailing. Perbandingan komposisi fase gerak ini sama dengan hasil optimasi fase gerak oleh [Sukmawati et al., \(2019\)](#) yaitu perbandingan akuabides dan metanol (41: 59, v/v).

Uji linieritas menghasilkan tiga persamaan regresi linier dengan nilai korelasi (r) ketiganya memenuhi persyaratan. Uji linieritas memenuhi persyaratan jika nilai r lebih besar dari 0,997 ([Gandjar & Rohman, 2012](#)). Persamaan regresi linier dengan nilai r terbesar dipilih sebagai persamaan kurva baku untuk menetapkan kadar kuersetin yaitu $Y = 6863.57X + 92231.67$ dan nilai $r = 0,99954$. Nilai r yang didapat lebih besar dari nilai r pada penelitian [Nugraha dan Ghozali \(2014\)](#) yaitu 0,9989 dan nilai r yang diperoleh [Sukmawati](#)

(2019) sebesar 0,9970. Dengan demikian, metode analisis yang dikembangkan pada penelitian ini lebih linier. Linearitas menunjukkan kemampuan suatu metode untuk mendapatkan hasil-hasil uji yang proporsional secara langsung dengan kisaran konsentrasi analit ([Gandjar dan Rohman, 2016](#)).

Sensitivitas metode analisis dinyatakan dengan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ). Kedua nilai ini dihitung menggunakan persamaan pada kurva baku menghasilkan nilai LOD sebesar 0,355 $\mu\text{g/mL}$ dan LOQ sebesar 1,185 $\mu\text{g/mL}$. Nilai LOD ini lebih kecil daripada nilai LOD yang diperoleh [Dwiyoga \(2012\)](#) yaitu 0,370 $\mu\text{g/mL}$. [Gandjar dan Rohman \(2016\)](#) menyatakan bahwa nilai LOD dan LOQ semakin kecil maka metode analisis tersebut semakin sensitif.

Selektivitas merupakan kemampuan suatu metode untuk menganalisis zat tertentu dengan seksama dan cermat dengan kemungkinan adanya komponen lain dalam sampel ([Harmita, 2004](#)). Metode yang divalidasi pada penelitian ini selektif karena kromatogram menunjukkan hanya puncak kuersetin yang terdeteksi dalam ekstrak etanol buah leunca sehingga tidak memerlukan penghitungan nilai resolusi (R). Nilai memenuhi persyaratan yaitu pemisahan antar puncak, $R \geq 2,00$ ([Snyder, et al., 1997](#)).

Presisi metode ditentukan dengan menghitung nilai %RSD waktu retensi, tinggi puncak dan luas puncak kromatogram larutan uji. Metode analisis pada penelitian ini memiliki presisi atau ketelitian yang nilai memenuhi persyaratan nilai RSD yang dapat diterima yaitu $\geq 2\%$ ([Harmita, 2004](#)). Hal ini juga menunjukkan bahwa metode yang divalidasi mampu menghasilkan kadar yang mendekati sama atau sama jika dilakukan secara berulang-ulang dalam satu seri pengukuran.

Akurasi menunjukkan kedekatan hasil penetapan kadar dengan kadar sebenarnya. Pada penelitian ini, uji akurasi dilakukan dengan cara menambahkan baku. Hasil uji akurasi memenuhi persyaratan dengan nilai perolehan kembali pada rentang 100,102%-100,150%. Menurut [Harmita \(2004\)](#) nilai perolehan kembali untuk senyawa dengan konsentrasi 0,001% dalam matriks memenuhi syarat pada rentang 90-107%.

Hasil penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak etanol buah leunca menggunakan metode yang telah dikembangkan adalah 0,0086% atau 0,086 $\mu\text{g/mg}$ dengan nilai SD sebesar 0,0006 dan RSD 0,698%. Sedangkan penelitian [Hameed dan Akhtar \(2018\)](#)

melaporkan kadar kuersetin dalam ekstrak metanol buah lenca sebesar 2,77 µg/mg.

KESIMPULAN

Metode penetapan kadar kuersetin menggunakan KCKT dengan fase diam C₁₈ dan fase gerak berupa campuran akuabides dan metanol (41:59 v/v) dengan laju alir 1 mL/menit memenuhi persyaratan validasi. Metode yang dikembangkan dapat diaplikasikan pada ekstrak etanol buah lenca dengan kadar kuersetin sebesar 0,0086%.

SARAN

Setelah melakukan pengembangan metode penetapan kadar dengan teknik isokratik dan mengaplikasikannya, diharapkan selanjutnya untuk dikembangkan dengan teknik gradien.

DAFTAR PUSTAKA

- A.M. Nawwar, M., M.D. El-Mousallamy, A. and Barakat, H. H. 1989, *Quercetin 3-Glycosides From The Leaves of Solanum nigrum*, *Phytochemistry*, 28(6), pp. 1755–1757. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97839-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97839-7).
- Dwiyoga, A. R. H., 2012, *Optimasi Dan Validasi Metode Penetapan Ptimasi Dan Validasi Metode Penetapan Kadar Kuersetin Menggunakan Kromatografi Adar Kuersetin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Fase Terbalik Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Fase Terbalik Dalam Teh Hijau*.
- Gandjar, I.G. and Rohman, A., 2016, *Kimia Farmasi Analisis*, Yogyakarta, Pustaka Pelajar.
- Gandjar, I.G. and Rohman, A., 2012, *Analisis Obat secara Spektroskopi dan Kromatografi*, 70-72, Yogyakarta, Pustaka Pelajar.
- Gbadamosi, I. and Afolayan, A. 2016, *In Vitro Anti-Radical Activities Of Extracts Of Solanum nigrum (L.) From South Africa*, *Journal of Applied Biosciences*, 98(0), p. 9240. doi: 10.4314/jab.v98i1.1.
- Hameed, A. and Akhtar, N. 2018, *Comparative Chemical Investigation And Evaluation Of Antioxidant And Tyrosinase*

Inhibitory Effects Of Withania somnifera (L.) Dunal And Solanum nigrum (L.) Berries, *Acta Pharmaceutica*, 68(1), pp. 47–60. doi: 10.2478/acph-2018-0007.

- Harmita, 2004, *Petunjuk Pelaksanaan Validasi dan Cara Penggunaannya*, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), p. 117.
- Kristanti Alfinda N., Aminah Nanik S., Tanjung M., dan Kurniadi B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Penerbit Airlangga University Press: Surabaya.
- Miller, J.C. and Miller, J.N., 1998, *Statistika untuk Kimia Analisis*. Diterjemahkan oleh Drs. Suroso., M. Sc, ITB, Bandung, 111.
- Lisi, A.K.F., Runtuwene, M.R.J., Wewengkang, D. S. 2017, *Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Metanol Bunga Soyogik (Saurauia Bracteosa Dc.)*, *Pharmakon*, 6(1). doi: 10.35799/pha.6.2017.15005.
- Nugraha, A., and Ghazali, M. T., 2014, *Penetapan Kadar Flavonoid Kuersetin Ekstrak Kulit Buah Apel Hijau (Pyrus Malus L.) Dengan Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja., Skripsi*, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.1-6.
- Nur Alam, M. et al. 2012, *Antioxidant activity of the ethanolic extracts of leaves, stems and fruits of Solanum nigrum*, *Pharmacognosy Communications*, 2(3), pp. 67–71. doi: 10.5530/pc.2012.3.14.
- Ridho Asra et. Al, 2019, *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Fraksi Heksan , Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Air*, *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 2(1), pp. 30–37.
- Snyder.L., Kirkland, J., and dolan, J., 2010, *Introduction To Modern Liquid Chromatography. third edition*, John Wiley&sons inc., New Jersey.
- Snyder, R.L. Kirkland, J.J. and Glajch, J.L. 1997, *Practical HPLC Method Development, 2nd Edition*, John Wiley & Son, Inc., New York.
- Sukmawati, S., Widiastuti, H. and

Miftahuljanna, M. 2019, *Analisis Kadar Kuersetin Pada Ekstrak Etanol Daun Miana (Plectranthus scutellarioides (L.) R.Br.) Secara HPLC (High Performance Liquid Chromatography)*, Jurnal Ilmiah As-Syifaa, 11(1), pp. 38–44. doi: 10.33096/jifa.v11i1.462.

Veerapagu, M. *et al.* 2018, *In Vitro Antioxidant Properties Of Methanolic Extract of Solanum nigrum L. fruit*, The Pharma Innovation Journal, 7(5), pp. 371–374. Available at: www.thepharmajournal.com.

