



**Phytochemical screening test and measurement of total flavonoid levels in paku (*Nephrolepis biserrata*) extract with n-hexane, ethyl acetate, and water fractions.**

**Uji skrining fitokimia dan pengukuran kadar total flavonoid pada ekstrak paku (*Nephrolepis biserrata*) dengan fraksi n-heksana, etil asetat, dan air**

**Razoki<sup>1</sup>, Ruth Gaby Syahanaya Butar-Butar<sup>1</sup>, Elfia Neswita<sup>1</sup>, Novitaria Br Sembiring<sup>1</sup>, Erida Novriani<sup>1</sup>, Nerly Juli Pranita Simanjuntak<sup>1</sup>, Enni Halimahtussa'diyah Pakpahan<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi, Universitas Prima Indonesia, Sumatera Utara, Indonesia.

e-mail author: [razoki@unprimdn.ac.id](mailto:razoki@unprimdn.ac.id)

**ABSTRACT**

Ferns (*Nephrolepis biserrata*), including ferns and lycophytes, are a group of plants that have existed on Earth since ancient times, with over 12,000 species of ferns. Ferns (*Nephrolepis biserrata*) have a very important role in the ecosystem. They assist in the formation of humus, protect the soil from erosion, maintain soil moisture, and serve as the first plants in the early stages of forest ecosystem succession. Phytochemical screening tests can identify bioactive compounds that have not been seen through ordinary observations or simple examinations. This test enables rapid separation between natural ingredients that contain certain phytochemical compounds and those that do not. Extraction is the process of withdrawing soluble chemical compounds to separate them from insoluble materials. Various methods can be used in the extraction process, including using n-hexane to remove fat, ethyl acetate to extract semi-polar compounds, and water as a universal solvent. The methods used in this study included maceration, phytochemical screening, fractionation, and data analysis. The results of this study concluded that the leaves of Paku Uban (*Nephrolepis biserrata*) contain secondary metabolites such as alkaloids, phenolics, flavonoids, tannins, and triterpenoids based on phytochemical tests on the ethanol fraction. The n-hexane fraction also contains flavonoids, triterpenoids, phenolics, alkaloids, steroids, and tannins. The ethyl acetate fraction contains phenolics, tannins, alkaloids, flavonoids, and saponins, while the water fraction contains alkaloids, phenolics, flavonoids and tannins. The total content of flavonoids in the extract was 17.615 mg QE/g. The results of the analysis using a UV-Vis spectrophotometer showed that there was a transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  and  $n \rightarrow \pi^*$  in the samples tested.

Keywords: *Nephrolepis biserrata* Extract, Phytochemical Screening Test

**ABSTRAK**

Tumbuhan paku (*Nephrolepis biserrata*), termasuk ferns dan lycophyte, merupakan kelompok tumbuhan yang telah ada di Bumi sejak zaman purba, dimana terdapat lebih dari 12.000 spesies tumbuhan paku yang berbeda. Paku (*Nephrolepis biserrata*) memiliki peran yang sangat penting dalam ekosistem. Mereka membantu dalam pembentukan humus, melindungi tanah dari erosi, menjaga kelembapan tanah, dan berfungsi sebagai tumbuhan pertama dalam tahap awal suksesi ekosistem hutan.

Uji skrining fitokimia dapat mengidentifikasi senyawa bioaktif yang belum terlihat melalui pengamatan biasa atau pemeriksaan sederhana. Uji ini memungkinkan pemisahan cepat antara bahan alami yang mengandung senyawa fitokimia tertentu dan yang tidak mengandungnya. Ekstraksi adalah proses penarikan senyawa kimia yang larut sehingga dapat dipisahkan dari bahan yang tidak larut. Pada proses ekstraksi, terdapat berbagai metode yang dapat digunakan, termasuk penggunaan n-heksana untuk menghilangkan lemak, etil asetat untuk mengekstraksi senyawa semi polar, dan air sebagai pelarut universal. Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi maserasi, skrining fitokimia, fraksinasi, dan analisis data. Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa daun Paku Uban (*Nephrolepis biserrata*) mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan triterpenoid berdasarkan uji fitokimia pada fraksi etanol. Fraksi n-heksana juga mengandung alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, steroid, dan triterpenoid. Fraksi etil asetat mengandung fenolik, tanin, alkaloid, flavonoid, dan saponin, sedangkan fraksi air mengandung alkaloid, fenolik, flavonoid, dan tanin. Total kandungan flavonoid dalam ekstrak diperoleh sebesar 17,615 mg QE/g. Hasil analisis menggunakan instrument spektrofotometer UV-Visibel memperlihatkan adanya transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  dan transisi  $n \rightarrow \pi^*$  pada sampel yang diuji..

**Kata kunci:** Ekstrak *Nephrolepis Biseratta*, Kadar Flavonoid, Uji Skrining Fitokimia

## PENDAHULUAN

Tumbuhan paku (*Nephrolepis biserrata*) termasuk dalam kelompok tumbuhan ferns dan lycophyte yang telah ada sejak lama di planet ini. Terdapat lebih dari 12.000 jenis tumbuhan paku yang berbeda. Tumbuhan paku *Nephrolepis biserrata* memiliki peran yang penting dalam ekosistem atau lingkungan, adapun peran yang dapat dilakukan oleh tanaman ini yaitu mempercepat terbentuk humus, dapat mencegah tanah dari erosi, menstabilkan kelembapan dari tanah, dan berperan sebagai tumbuhan utama dalam tahap awal terbentuknya ekosistem hutan yang baik (Nugroho et al., 2018). Beberapa penelitian terbaru di bidang etnobotani dan farmakologi menunjukkan bahwa *Nephrolepis biserrata* memiliki senyawa bermanfaat metabolit sekunder yang memiliki potensi menjadi untuk dikembangkan lebih jauh menjadi senyawa obat (Singh dan Singh, 2012). Senyawa metabolit sekunder mayor yang ditemukan dalam tumbuhan paku uban adalah senyawa kelompok flavonoid. Senyawa kelompok flavonoid ini telah terbukti memiliki aktivitas sebagai senyawa antiinflamasi, adapun jalur mekanisme kerja yang telah di ketahui adalah dengan menghambat kerja pada jalur *cyclo oxygenase* (COX) baik COX-1 maupun COX-2. Selain itu, senyawa kelompok flavonoid juga memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang sangat kuat, aktifitas antikanker, dan aktifitas sebagai antimikroba (Pranowo et al., 2016).

*Nephrolepis*, salah satu genus tumbuhan paku yang mencakup *Nephrolepis biserrata*, dikenal memiliki jumlah spesimen yang paling banyak (Renjana et al., 2021). *Nephrolepis biserrata* termasuk dalam keluarga *Nephrolepidaceae* dan terdiri dari sekitar 20 spesies yang sebagian besar tersebar di daerah tropis (Xu dan Deng, 2017). Kelompok Paku uban umumnya tumbuh sebagai bentuk paku epifit atau setengah epifit yang sering ditemukan tumbuh pada batang palem dan juga dapat tumbuh di beberapa pohon besar dan rindang lainnya, paku nusa juga dapat ditemukan disekitar tepi sungai dan juga dapat ditemukan pada celah tebing. Paku uban memiliki rimpang tipis menyerupai akar. Tumbuhan ini memiliki *frond* yang dapat mencapai panjang 1,5 meter, dengan daun yang terdiri dari tangkai daun majemuk tunggal (pinna) yang menyerupai pedang atau ujung tombak. Beberapa jenis *Nephrolepis* yang sering dimanfaatkan adalah *Nephrolepis biserrata*, *N. cordifolia*, dan *N. hirsutula* sebagai sumber makanan dan tanaman hias (Nugroho et al., 2018).

Skrining fitokimia merupakan metode penting yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dalam bahan alami. Tahap skrining fitokimia merupakan langkah awal yang memberikan informasi tentang kandungan senyawa tertentu dalam bahan alami yang sedang diteliti. Metode skrining fitokimia dapat dilakukan secara kualitatif, semi kuantitatif, atau kuantitatif, tergantung pada tujuan penelitian yang ingin dicapai.

Salah satu metode skrining fitokimia kualitatif yang umum digunakan adalah penggunaan reaksi warna dengan pereaksi khusus. Dalam metode ini, sampel bahan alami diuji dengan pereaksi tertentu yang akan menghasilkan perubahan warna khas jika terdapat senyawa metabolit sekunder tertentu. Misalnya, pereaksi tertentu dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan senyawa lainnya. Perubahan warna yang terjadi dapat memberikan petunjuk awal tentang adanya senyawa-senyawa tersebut dalam sampel.

Selain itu, skrining fitokimia juga dapat dilakukan secara semi kuantitatif atau kuantitatif. Pada metode semi kuantitatif, dilakukan penilaian intensitas warna atau serapan menggunakan skala yang telah ditentukan, sedangkan pada metode kuantitatif, dilakukan pengukuran serapan dengan menggunakan instrumen analitik seperti spektrofotometer. Metode kuantitatif ini memungkinkan penentuan kadar senyawa secara lebih akurat.

Pemilihan metode skrining fitokimia yang tepat sangat penting dalam penelitian ini. Selain itu, pemilihan pereaksi yang sesuai dan pelarut yang optimal juga perlu diperhatikan. Pelarut yang dipilih harus mampu mengekstraksi senyawa-senyawa aktif yang diinginkan dari bahan alami, sementara pereaksi yang digunakan harus sensitif terhadap senyawa-senyawa tertentu yang ingin dideteksi.

Dengan melakukan skrining fitokimia, kita dapat memperoleh informasi awal tentang kandungan senyawa metabolit sekunder dalam bahan alami yang sedang diteliti. Informasi ini dapat menjadi dasar untuk penelitian lebih lanjut terkait aktivitas biologis dan potensi penggunaan bahan alami tersebut.

Pemilihan pelarut dan metode ekstraksi juga merupakan faktor penting dalam proses skrining fitokimia. Pemilihan pelarut yang tepat sangat berpengaruh terhadap ekstraksi yang optimal dari senyawa aktif yang diinginkan (Vifta dan Advistasari, 2018). Dalam konteks tumbuhan *Nephrolepis biserrata*, proses ekstraksi memiliki peran penting dalam mendapatkan senyawa yang diinginkan. Pemilihan pelarut yang tepat dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi. Beberapa faktor yang perlu dipertimbangkan dalam pemilihan pelarut adalah selektivitas, kemampuan ekstraksi, toksisitas, kemudahan penghilangan pelarut, dan harga. Jenis pelarut yang dipilih harus sesuai dengan polaritas senyawa metabolit sekunder yang

ingin diekstraksi. Senyawa polar umumnya larut dalam pelarut polar seperti air, sementara senyawa non-polar lebih larut dalam pelarut non-polar seperti n-heksana dan etil asetat. Pelarut etanol 96% sering digunakan dalam ekstraksi senyawa dari bahan alami karena efektifitasnya (Lindawati dan Ma'ruf, 2020).

Di berbagai negara, tumbuhan *Nephrolepis biserrata*, yang dikenal sebagai paku uban, telah lama dimanfaatkan oleh penduduk setempat dengan berbagai tujuan. Di Afrika, wanita menggunakan daun *Nephrolepis biserrata* untuk menekan rasa sakit yang disebabkan karena *dysmenorrhoea* (Malan et al., 2015). Di kalangan penduduk Ghana, tumbuhan ini digunakan untuk mengobati sakit gigi, selain itu masyarakat Ghana juga sering mengkonsumsi tumbuhan ini sebagai minuman untuk penambah darah (Appiah et al., 2018). Di Chili, masyarakat disana sering menggunakan *Nephrolepis biserrata* untuk menyembuhkan katarak, penggunaannya dilakukan dengan menggosok-gosokkan rimpang tumbuhan ini pada mata (Tewari et al., 2019). Di Cina, seluruh bagian tumbuhan *Nephrolepis biserrata* dimanfaatkan untuk mengobati masuk angin, menurunkan demam, mengobati penyakit kronis seperti TBC dan enteritis, selain itu yang paling sering digunakan untuk menyembuhkan batuk (Hong et al., 2015).

Hasil penelitian ekstrak metanol dari daun paku *Nephrolepis biserrata* memiliki potensi sebagai antioksidan yang sangat kuat karena mengandung senyawa flavonoid. Selain itu, ekstrak tersebut juga memiliki aktivitas antiradikal bebas karena mengandung tanin, steroid, fitosterol, antrakuinon, saponin, alkaloid dan triterpenoid (Shah et al., 2014). Menurut Cambie dan Ash (dalam Renjana et al., 2021), daun paku *Nephrolepis biserrata* mengandung alkana C27-C33, triterpen 9(11)-feren, lilin, asam lemak, dan sterol.

Selain itu, telah terbukti bahwa ekstrak air dari bagian atas tumbuhan *Nephrolepis biserrata*, yaitu bagian tajuk, memiliki kemampuan yang menarik dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur patogen. Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak air ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhimurium* dengan zona hambat masing-masing sebesar  $25,10 \pm 0,10$  dan  $22,0 \pm 0,10$  mm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air dari tumbuhan paku ini memiliki potensi sebagai agen antimikroba

yang efektif. Selain itu, ekstrak air *Nephrolepis biserrata* juga terbukti efektif dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen seperti *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, dan *T. rebrum*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak air ini dapat membentuk zona hambat dengan diameter masing-masing sebesar  $10,10 \pm 0,10$ ,  $11,96 \pm 0,30$ , dan  $10,10 \pm 0,17$  mm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air dari bagian atas tumbuhan *Nephrolepis biserrata* memiliki potensi sebagai agen antijamur yang efektif. Temuan ini memberikan informasi penting tentang potensi penggunaan tumbuhan paku *Nephrolepis biserrata* sebagai sumber bahan antimikroba alami. Ekstrak air dari bagian tajuk tumbuhan ini dapat digunakan dalam pengembangan produk-produk antimikroba seperti obat-obatan, kosmetik, atau bahan pengawet alami. Dalam menghadapi tantangan resistensi antibiotik dan kebutuhan akan bahan antimikroba yang aman dan alami, penelitian lebih lanjut tentang potensi senyawa aktif dalam ekstrak air *Nephrolepis biserrata* menjadi penting untuk menjelajahi peluang baru dalam bidang pengobatan dan kesehatan (Renjana et al., 2021).

## METODE

Ekstrak dibuat dengan melakukan maserasi menggunakan etanol 96% karena pelarut ini efektif dalam menjaga kandungan flavonoid, perbandingan sampel pelarut yang digunakan yaitu 1:5 selama 3 hari, kemudian dilanjutkan dengan maserasi ulang menggunakan perbandingan 1:3 selama satu hari. Lapisan etanol kemudian dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator (Ariani et al., 2020; Ramadhani et al., 2020).

### Pembuatan Ekstrak

Ekstrak dibuat dengan metode dingin yaitu dengan metode meserasi menggunakan pelarut, pada proses maserasi yang dilakukan di gunakan etanol 96% dengan perbandingan 1:5 selama 3 hari, kemudian dilanjutkan dengan maserasi ulang menggunakan perbandingan 1:3 selama satu hari. Setelah itu, lapisan etanol dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator sesuai dengan metode yang telah dijelaskan sebelumnya (Ramadhani et al., 2020).

## Skrining Fitokimia

### 1. Uji Alkaloid

Sejumlah 4 mg sampel padat ditimbang dan dilarutkan menggunakan 3 mL metanol dan 5 mL amonia dengan pH sekitar 8-9. Proses ini dilakukan untuk melarutkan sampel dalam pelarut yang sesuai. Setelah itu, campuran tersebut disaring untuk memisahkan larutan dari padatan yang tidak larut. Tujuan dari proses penyaringan adalah untuk memisahkan larutan yang mengandung senyawa terlarut dari padatan yang tidak larut. Setelah penyaringan, 2 mL larutan HCl dengan konsentrasi 2M ditambahkan ke dalam filtrat dan dikocok. Langkah ini dilakukan untuk mengasamkan larutan dan membentuk senyawa yang dapat diamati dalam pengujian selanjutnya. Hasil dari langkah ini kemudian dibagi ke dalam empat tabung reaksi yang berbeda. Masing-masing tabung menerima lima tetes larutan. Tabung pertama berisi larutan blanko, yang digunakan sebagai kontrol dalam pengujian. Tabung kedua, ketiga, dan keempat dicampur dengan satu tetes pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff pada masing-masing tabung. Pereaksi ini digunakan untuk mengidentifikasi adanya senyawa-senyawa tertentu dalam larutan yang diuji. Hasil yang menunjukkan hasil positif dalam pengujian ini dapat diamati dengan adanya endapan putih, coklat, atau jingga pada masing-masing tabung atau larutan yang diuji. Endapan ini menunjukkan keberadaan senyawa-senyawa tertentu yang bereaksi dengan pereaksi yang ditambahkan. Warna dan jenis endapan yang terbentuk dalam masing-masing tabung dapat memberikan petunjuk tentang jenis senyawa yang hadir dalam sampel. (Oktavia, 2021).

### 2. Uji Flavonoid

Pengujian adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol padat, sebanyak 1 mg ekstrak etanol padat ditempatkan pada plat tetes. Selanjutnya, ditambahkan sepuluh tetes metanol untuk melarutkan ekstrak etanol padat tersebut. Campuran tersebut diaduk menggunakan spatula hingga terlarut dengan baik. Selanjutnya, diambil enam potongan pita magnesium (Mg) dan empat tetes HCl pekat ditambahkan ke dalam campuran tersebut. Jika flavonoid hadir dalam ekstrak, maka akan terjadi reaksi antara magnesium dan flavonoid yang menghasilkan kompleks berwarna. Munculnya warna kuning, biru, jingga, atau merah menunjukkan hasil positif dalam pengujian ini. (Octaviani, et al., 2019).



### 3. Uji Fenolik

Pengujian adanya senyawa fenolik, sebanyak 1 mg sampel padat ditempatkan pada plat tetes. Selanjutnya, ditambahkan sebanyak sepuluh tetes metanol untuk melarutkan sampel padat tersebut. Campuran tersebut diaduk menggunakan spatula hingga terlarut dengan baik. Setelah itu, enam tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  5% ditambahkan ke dalam campuran tersebut. Jika terlihat warna biru, hijau, ungu, atau kemerahan pada campuran tersebut, hal ini menunjukkan hasil positif dalam pengujian. Perubahan warna tersebut menandakan keberadaan senyawa fenolik dalam sampel, yang bereaksi dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  5% dan membentuk kompleks berwarna. Uji fenolik ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya senyawa fenolik dalam sampel dan memberikan informasi awal tentang potensi aktivitas antioksidan sampel tersebut. Namun, untuk analisis yang lebih rinci dan akurat, metode lain seperti kromatografi atau spektroskopi dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa fenolik secara spesifik dan menentukan konsentrasinya dengan lebih tepat. (Oktavia, 2021).

### 4. Uji Saponin

Sebanyak 1 mg ekstrak etanol padat ditempatkan dalam tabung reaksi dan kemudian ditambahkan 5 mL aquades. Kemudian, campuran tersebut digoyang selama 1 menit. Jika setelah digoyang terbentuk buih, maka ditambahkan empat tetes larutan HCl dengan konsentrasi 1M. Namun, jika tidak ada buih yang terbentuk, campuran tersebut dipanaskan selama sekitar  $\pm 3$  menit. Setelah proses pemanasan, campuran dibiarkan mendingin dan kemudian dikocok dengan kuat. Jika terbentuk buih yang stabil dalam waktu sekitar  $\pm 10$  menit, hal ini menunjukkan keberadaan senyawa saponin dalam sampel tersebut. Proses dimulai dengan menempatkan 1 mg ekstrak etanol padat dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 5 mL aquades untuk melarutkan ekstrak tersebut. Guncangkan tabung selama 1 menit untuk memperoleh homogenitas. Jika ada pembentukan buih setelah digoyang, menandakan kemungkinan keberadaan senyawa saponin dalam sampel. Untuk mengonfirmasi kehadirannya, tambahkan empat tetes larutan HCl dengan konsentrasi 1M ke dalam campuran. Namun, jika setelah digoyang tidak terbentuk buih, campuran tersebut dipanaskan selama sekitar  $\pm 3$  menit. Proses pemanasan bertujuan untuk merangsang reaksi dan memfasilitasi pembentukan buih. Setelah proses

pemanasan, campuran dibiarkan mendingin agar mencapai suhu ruangan. Setelah mencapai suhu yang sesuai, campuran tersebut dikocok dengan kuat untuk mengamati terbentuknya buih yang stabil. Apabila terbentuk buih yang stabil dalam waktu sekitar  $\pm 10$  menit, hal ini mengindikasikan adanya senyawa saponin dalam sampel yang sedang dianalisis. Buih yang stabil menunjukkan bahwa senyawa saponin tersebut memiliki sifat yang memungkinkannya membentuk busa yang tahan lama. Prinsip pengujian ini didasarkan pada reaksi kimia dan sifat-sifat senyawa saponin yang menghasilkan buih yang dapat diamati dan diidentifikasi sebagai tanda keberadaan senyawa tersebut dalam sampel. (Triwahyuono & Hidajati, 2020).

### 5. Uji Tanin

Sebanyak 1 mg sampel padat dilarutkan dalam etanol dan kemudian ekstrak tersebut dipanaskan dengan air menggunakan penangas air. Proses ini bertujuan untuk menghasilkan ekstrak sampel yang larut dalam air. Selanjutnya, campuran tersebut disaring untuk memisahkan filtrat dari residu padat. Filtrat yang diperoleh kemudian ditambahkan tiga tetes  $\text{FeCl}_3$  dengan konsentrasi 1% ke dalamnya. Keberadaan gugus fenol dalam sampel dapat diidentifikasi melalui perubahan warna yang diamati setelah penambahan  $\text{FeCl}_3$ . Jika gugus fenol hadir dalam senyawa sampel, hal ini ditandai dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan. Metode ini digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan gugus fenol dalam sampel. Gugus fenol sering terkait dengan kehadiran senyawa polifenol, seperti tanin. Dalam proses ini, sampel padat dilarutkan dalam etanol untuk memperoleh ekstrak yang mengandung senyawa sampel yang larut dalam pelarut organik. Kemudian, ekstrak tersebut dipanaskan dengan air menggunakan penangas air untuk mendapatkan ekstrak sampel yang larut dalam air. Setelah itu, campuran tersebut disaring untuk memisahkan filtrat dari residu padat yang mungkin ada. Filtrat yang diperoleh kemudian ditambahkan tiga tetes  $\text{FeCl}_3$  dengan konsentrasi 1% ke dalamnya. Penambahan  $\text{FeCl}_3$  bertujuan untuk menghasilkan reaksi dengan gugus fenol yang ada dalam sampel. Jika terdapat gugus fenol dalam senyawa sampel, reaksi tersebut akan menghasilkan perubahan warna pada sampel. Warna biru tua atau hitam kehijauan yang terbentuk setelah penambahan  $\text{FeCl}_3$  menunjukkan hasil positif dalam identifikasi keberadaan gugus fenol

dalam sampel. Keberadaan gugus fenol ini menandakan adanya senyawa polifenol seperti tanin dalam sampel tersebut. (Jati, et al., 2019).

#### 6. Uji Steroid dan uji Triterpenoid (Uji Liebermann-Burchard)

Sebanyak 1 mg sampel padat di larutkan dalam etanol dan dipanaskan dengan air menggunakan penangas air. Setelah itu, campuran tersebut disaring untuk memisahkan filtrat. Kemudian, ditambahkan tiga tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1% ke dalam filtrat yang telah terpisah. Hasil positif dapat diamati melalui perubahan warna pada sampel, seperti terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan. Penggunaan FeCl<sub>3</sub> digunakan untuk mendeteksi keberadaan gugus fenol dalam sampel. Jika terdapat gugus fenol dalam senyawa tersebut, maka hal tersebut menunjukkan adanya tanin karena tanin merupakan senyawa polifenol (Jati, et al., 2019).

### Uji Flavonoid Total

#### 1. Preparasi larutan induk Kuersetin 100 ppm

Pada proses untuk membuat larutan induk, 10 mg kuersetin ditimbang dan dilarutkan dalam etanol 70% menggunakan labu ukur berkapasitas 100 mL. Dengan demikian, diperoleh larutan kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm

#### 2. Pembuatan larutan seri standar kuersetin

Dalam proses pembuatan larutan standar berturut-turut mulai dari konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; sampai 1 mL dari larutan induk dipipet menggunakan mikropipet ke dalam labu ukur berkapasitas 10 mL. Kemudian, volume larutan diisi dengan etanol 70% hingga mencapai tanda batas, sehingga terbentuk larutan dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm.

#### 3. Pembuatan larutan blanko

Larutan blanko dalam penelitian ini disiapkan dengan mencampurkan 4 mL etanol 70%, 0,2 mL n-heksana, dan 0,2 mL etilasetat. Selanjutnya, larutan tersebut diencerkan dengan penambahan 5,6 mL aquades. Campuran ini kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur berkapasitas 10 mL.

#### 4. Pengukuran $\lambda$ maks

Untuk menentukan serapan  $\lambda$  maksimum, dilakukan penyiapan larutan standar dengan konsentrasi 4 ppm. Larutan standar sebanyak 0,5 mL ditambahkan ke dalam labu ukur berkapasitas 10 mL. Selanjutnya, ditambahkan etanol 70% sebanyak 1,5 mL, n-heksana 10% sebanyak 0,1 mL, etil asetat 1 M sebanyak 0,1 mL, dan air suling

sebanyak 2,8 mL. Campuran tersebut dikocok hingga homogen. Setelah itu, absorbansi larutan diukur pada rentang  $\lambda$  350 sampai 500 nm.

#### 5. Pembuatan kurva kalibrasi

Untuk menentukan  $\lambda$  maks, dilakukan pembuatan kurva kalibrasi. Larutan standar dengan konsentrasi berturut-turut mulai dari 2, 4, 6, 8, sampai konsentrasi 10 ppm diambil sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan ke dalam labu ukur berkapasitas 10 mL. Kemudian, ditambahkan etanol 70% sebanyak 1,5 mL, n-heksana 10% sebanyak 0,1 mL, etil asetat 1 M sebanyak 0,1 mL, dan air suling sebanyak 2,8 mL. Campuran tersebut dikocok hingga homogen. Larutan kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Setelah itu, absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya.

#### 6. Pembuatan larutan dari ekstrak sampel daun Paku uban

Prose pembuatan larutan sampel ekstrak tumbuhan paku, dimulai dengan diambil 10 mg ekstrak yang ditimbang dan larutkan dalam 5 mL etanol 70% menggunakan gelas kimia berkapasitas 100 mL. Larutan tersebut diaduk menggunakan batang pengaduk, kemudian ditransfer ke dalam labu ukur berkapasitas 10 mL. Gelas kimia yang digunakan kemudian dibilas dengan menggunakan etanol 70% untuk membersihkannya. Cairan hasil pembilasan tersebut ditransfer ke dalam labu ukur hingga mencapai tanda batas, sehingga diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 1000 ppm. Setelah mendapatkan larutan sampel dengan konsentrasi 1000 ppm, dilakukan pengenceran dengan cara memipet 1 mL larutan sampel 1000 ppm dan mentransfernya ke dalam labu ukur berkapasitas 10 mL. Dalam labu ukur tersebut, larutan sampel tersebut kemudian ditambahkan dengan pelarut tambahan hingga mencapai tanda batas, sehingga terbentuk larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah, yaitu 100 ppm. Kemudian, larutan tersebut diencerkan dengan menambahkan etanol 70% hingga mencapai tanda batas, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya, diambil 0,5 mL larutan tersebut dan ditransfer ke dalam labu ukur berkapasitas 10 mL. Larutan tersebut kemudian ditambahkan dengan 1,5 mL etanol 70%, 0,1 mL n-heksana 10%, 0,1 mL etil asetat 1 M, dan 2,8 mL air suling. Campuran tersebut diaduk hingga merata dan larutan dibiarkan inkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Setelah itu, absorbansi larutan

diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang sesuai. Selanjutnya, dilakukan perhitungan kadar flavonoid menggunakan rumus metode yang telah dijelaskan oleh Chang dan rekan-rekan (2002).

$$\text{Kandungan Flavonoid (\%)} \\ = \frac{C \times V \times Fp \times 10^{-3}}{m} \times 100\%$$

Keterangan :

- C = Kesetaraan Kuersetin (mg/L)  
V = Volume total ekstrak etanol (mL)  
Fp = Faktor Pengenceran  
m = Berat sampel (mg)

### Fraksinasi ekstrak

Pada proses fraksinasi, digunakan tiga pelarut yaitu n-heksana, etil asetat, dan air. Ekstrak kental yang dihasilkan dari proses maserasi dimasukkan ke dalam corong pisah dan dilarutkan dalam 250 mL etanol. Dari larutan tersebut, diambil 100 mL untuk difraksinasi menggunakan perbandingan n-heksana dan etil asetat 1:2. Fraksinasi menggunakan n-heksana dilakukan secara berulang hingga fraksi n-heksana menjadi jernih dan mendekati penampilan awal. Kemudian, fraksi n-heksana dipisahkan dan fraksi etanol difraksinasi kembali dengan menggunakan pelarut etil asetat dalam perbandingan 1:2. Proses fraksinasi diulang beberapa kali untuk menghasilkan fraksi etil asetat dan fraksi etanol. Fraksinasi kemudian dilanjutkan dengan menggunakan pelarut air dengan metode yang sama, dan pemisahan dilakukan sampai tidak ada lagi lapisan yang terbentuk pada setiap fraksi. Setelah itu, hasil dari masing-masing fraksi diuapkan dari pelarutnya untuk mendapatkan hasil akhir.

### Analisis Data

Data yang dikumpulkan berdasarkan nilai dari pengukuran kadar flavonoid dalam ekstrak etanol dari tumbuhan paku uban. Data tersebut diperoleh dengan menggunakan persamaan garis lurus yaitu  $y = bx + a$ , di mana  $y$  merupakan nilai

dari absorbansi,  $b$  adalah gradien kemiringan (*slope*),  $x$  adalah konsentrasi yang dicari, dan  $a$  adalah intersep. Untuk menentukan nilai konsentrasi, data absorbansi sampel yang diperoleh dari spektrofotometer diinterpolasikan. Hasilnya kemudian disajikan dalam bentuk grafik untuk memberikan visualisasi yang lebih jelas. Sedangkan data deskriptif hasil pengamatan di buat dalam bentuk narasi, selain itu data tersebut di ubah bentuk tabel sehingga mudah di lihat.

### HASIL

#### 1. Preparasi simplisia Sampel Daun Paku Uban (*Nephrolepis biserrata*)

Dalam proses preparasi sampel menjadi simplisia di peroleh total 180 g simplisia halus dengan warna hijau tua dari total sampel basah daun paku uban yang digunakan.

#### 2. Hasil penentuan Kadar Air Serbuk simplisia halus Daun Paku Uban

Penentuan kadar sampel dilakukan dengan memanaskan sampel pada suhu 105°C, dan hasilnya menunjukkan kadar sebesar 6,73%.

#### 3. Hasil ekstrasi

Dalam penelitian ini, serbuk halus sebanyak 180 gram diekstraksi menggunakan etanol 96% selama dua kali dengan waktu ekstraksi masing-masing selama 24 jam. Proses ekstraksi dilakukan pada suhu 40°C dengan menggunakan alat rotary evaporator. Hasilnya adalah ekstrak etanol dengan warna kehijauan dengan berat sebanyak kurang lebih 6 gram.

#### 4. Hasil fraksinasi sampel ekstrak daun Paku Uban

Uji flavonoid dilakukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan menggunakan larutan kuersetin yang memiliki konsentrasi berturut-turut dari 20, 30, 40, 50, sampai 60 ppm. Pengukuran serapan dilakukan dalam rentang panjang gelombang 400 hingga 450 nm. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum pada larutan standar kuersetin adalah 435 nm. Semua pengukuran dilakukan tiga kali untuk memastikan keakuratan hasil.

**Tabel 1** Presentase Rendemen Ekstrak dan Fraksi Daun Paku Uban (*Nephrolepis biserrata*)

No	Jenis Ekstrak	Berat (gram)	Rendemen (%)
1	Ekstrak total etanol	6	3,333
2	Fraksi <i>n</i> -heksan	2	1,111
3	Fraksi etil asetat	2	1,111
4	Fraksi air	1	0,556

#### 5. Uji Skrining Fitokimia

Dalam penelitian ini, uji skrining fitokimia dilakukan pada sampel yang di dapat dari hasil ekstraksi dengan metode maserasi dari simplisia daun paku uban (*Nephrolepis biserrata*). Hasil uji skrining fitokimia menunjukkan adanya indikasi keberadaan kandungan senyawa-senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, fenolik, steroid, alkaloid, tannin, dan juga senyawa golongan saponin.

**Tabel 2** Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol *N. Biserrata*

Jenis Senyawa	Jenis Ekstrak			
	Ekstrak kasar etanol	Fraksi <i>n</i> -heksana	Fraksi etil asetat	Fraksi air
Alkaloid	+	+	+	+
Fenolik	+	+	+	+
Flavonoid	+	+	+	+
Saponin	-	-	+	-
Steroid	-	+	-	-
Tanin	+	+	+	+
Triterpenoid	+	+	-	-

#### 6. Kandungan Flavonoid Total

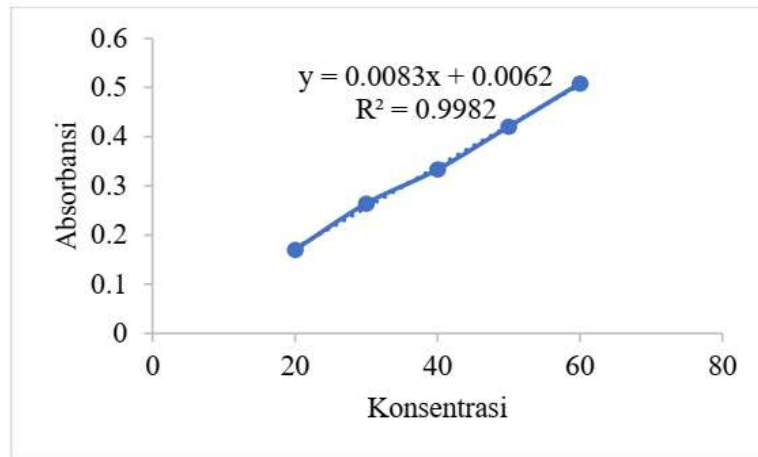
Flavonoid dianalisis menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan menggunakan larutan kuersetin yang memiliki deret konsentrasi berturut-turut mulai dari 20, 30, 40, 50, sampai 60 ppm. Pengukuran serapan dilakukan pada rentang panjang gelombang antara 400 hingga 450 nm. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum pada larutan standar kuersetin terletak pada 435 nm. Semua pengukuran dilakukan dalam tiga kali ulangan (triplo) untuk memastikan hasil yang lebih akurat.

**Tabel 3** Hasil pengukuran Larutan Standar Kursetin

Konsentrasi larutan kuersetin (ppm)	Absorbansi			
	1	2	3	A rata-rata
20	0,168	0,170	0,172	0,17
30	0,262	0,264	0,266	0,264
40	0,331	0,335	0,333	0,333
50	0,417	0,423	0,420	0,420
60	0,509	0,507	0,508	0,508

Kandungan flavonoid total diukur menggunakan persamaan regresi linear  $y = 0,0083x + 0,0062$ , dengan nilai  $R^2$  sebesar 0,9982 dan nilai  $r$  sebesar 0,999. Hasil pengukuran absorbansi ekstrak etanol daun paku *Nephrolepis biserrata* secara berurutan adalah 0,7370; 0,7374; dan 0,7372. Rata-rata nilai absorbansi yang diperoleh adalah 0,7372.



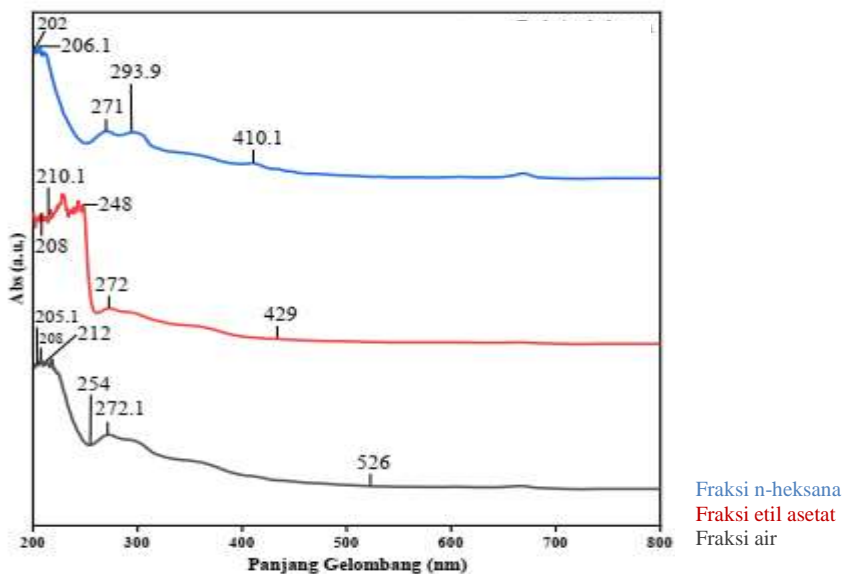


**Gambar 1** Kurva kalibrasi Baku Larutan Kuersetin

Dalam penelitian ini, berhasil dibuat kurva standar larutan flavonoid kuersetin dengan konsentrasi 88,072 µg/mL. Selain itu, kandungan flavonoid total dalam ekstrak etanol *Nephrolepis biserrata* terukur sebesar 17,615 mg QE/g ekstrak.

7. Identifikasi senyawa metabolit sekunder menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Gambar 5.10 menampilkan data serapan λ maksimum dari ekstrak atau fraksi daun Paku Uban yang telah diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Visibel.



**Gambar 2** Hasil UV-Vis ekstrak/fraksi daun Paku Uban

**Tabel 4** Hasil pengukuran  $\lambda$  maks dengan spektrofotometer UV-Vis dari sampel ekstrak daun Paku Uban, fraksi air (FA), fraksi etil asetat (FEA), dan fraksi n-heksana (FNH)

Panjang Gelombang (nm)				Jenis transisi elektronik	Gugus fungsi	Perkiraan senyawa*
FA	FEA	FNH	Range Pustaka			
526	429	410,1	300-550a	$n \rightarrow \pi^*$	C=O	Flavonoid
254	248	271	240-285a	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C terkonjugasi	Flavonoid
212	210,1	-	< 215b	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C tak terkonjugasi	Saponin
272,1	272	293,9	250-350c	$n \rightarrow \pi^*$	C=O	Tanin
205,1	-	206,1	200-225d	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C tak terkonjugasi	Steroid
208	208	202	< 215b	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C tak terkonjugasi	Triterpenoid

Dari Tabel 4, dapat disimpulkan bahwa terdapat bukti adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksana berdasarkan adanya serapan pada pita I dan pita II.

## PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, tumbuhan yang digunakan adalah *Nephrolepis biserrata*, yang juga dikenal sebagai daun paku uban. Untuk mempersiapkan sampel daun paku uban, dilakukan proses pencucian untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada sampel. Kemudian, sampel tersebut dikeringkan untuk mengurangi kadar air yang ada, sehingga memungkinkan penyimpanan dalam jangka waktu yang lebih lama dan mencegah pertumbuhan mikroba. Tahap terakhir adalah penghalusan sampel, yang bertujuan untuk memperluas permukaan dari sampel partikel simplisia karena dengan luas permukaan sampel simplisia maka akan lebih banyak permukaan sampel yang bersentuhan dengan pelarut pada proses ekstraksi. Selama proses penghalusan, sampel juga disaring menggunakan ayakan dengan ukuran 90 mesh untuk memastikan ukurannya seragam. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa dari 1000 gram sampel basah yang digunakan, didapat hasil sebanyak 180 gram simplisia halus berwarna hijau tua.

Penentuan kandungan air dilakukan untuk mengukur jumlah air yang terdapat dalam sampel. Informasi ini penting dalam mengevaluasi kualitas dan stabilitas sampel terhadap potensi terjadinya cemaran selama waktu penyimpanan. Kandungan air yang tinggi lebih dari 10% dari berat ekstrak maka akan dapat menyebabkan percepatan

pertumbuhan mikroba dan juga mengurangi stabilitas dari ekstrak karena kemungkinan mempercepat proses hidrolisis dengan adanya air (Saifuddin et al., 2011). Untuk menentukan kandungan air dalam sampel daun paku uban, sampel tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C untuk mempercepat penguapan air di dalamnya. Setelah proses pengeringan, terjadi perubahan berat pada cawan maupun pada sampel simplisia karena terjadinya proses penguapan air. Hasil penentuan kandungan air pada serbuk halus daun paku uban menunjukkan kandungan air sebesar 6,73%. Hasil ini menunjukkan bahwa kandungan air dalam serbuk halus daun paku uban memenuhi standar yang ditetapkan oleh Depkes RI (1994), di mana batas maksimum kandungan air yang diperbolehkan adalah 10%.

Dalam tahap ekstraksi, pelarut yang digunakan adalah etanol 96% karena memiliki sifat polar yang memungkinkannya untuk melarutkan senyawa baik yang bersifat polar maupun non-polar (Afifah, 2015). Pelarut ini mampu melarutkan berbagai komponen polar, semi-polar, dan nonpolar yang terdapat dalam bahan alami, serta dapat menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa aktif (Mohamad et al., 2015). Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi, di mana sampel direndam dalam pelarut sehingga membran dan dinding sel terpecah akibat perbedaan tekanan antara lingkungan luar dan dalam sel. Hal ini memungkinkan senyawa

metabolit sekunder dalam sampel larut dalam pelarut organik. Setelah itu, ekstrak hasilnya dikonsentrasikan menggunakan alat rotary evaporator pada suhu 40°C. Hasil akhir adalah ekstrak etanol total berwarna hijau dengan berat sebesar 6 gram.

Metode fraksinasi cair-cair digunakan dalam penelitian ini untuk memisahkan komponen dalam ekstrak kasar etanol berdasarkan perbedaan kepolaran dan bobotnya. Prinsipnya adalah fraksi yang memiliki bobot lebih berat akan terletak di bagian bawah, sementara fraksi yang memiliki

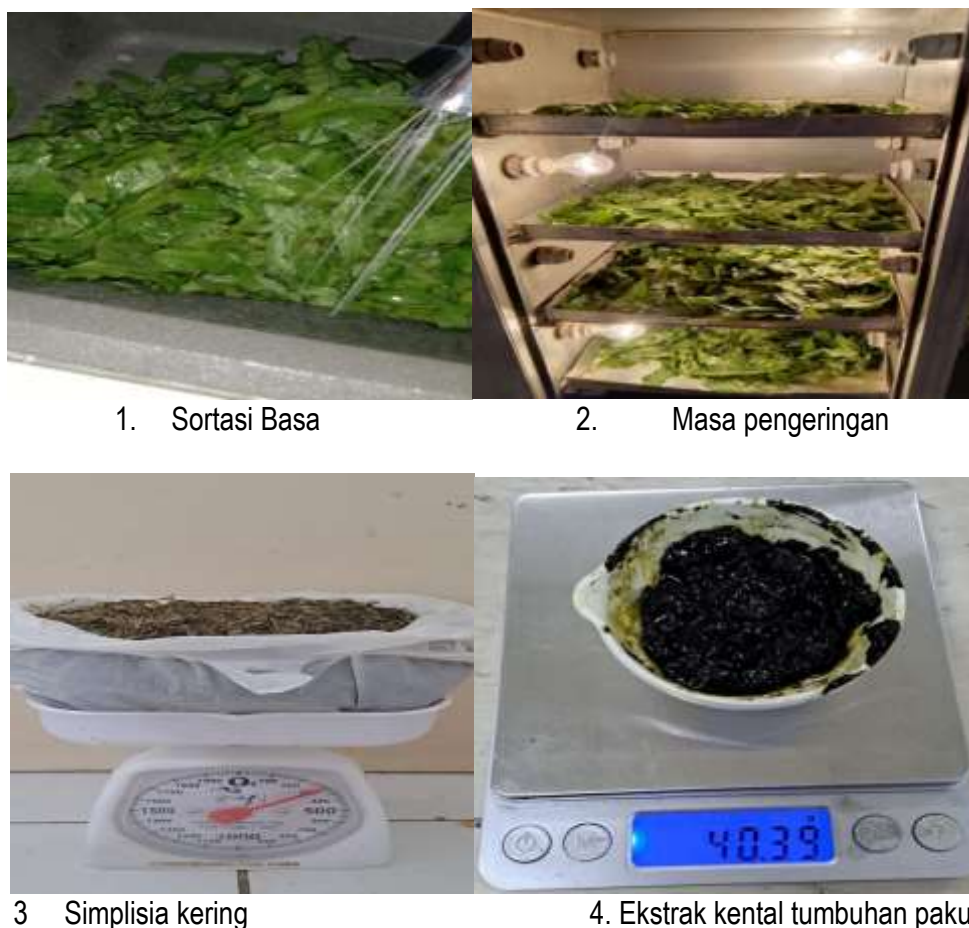
bobot lebih ringan akan terletak di atas (Soegiharjo, 2013). Dalam penelitian ini, dilakukan fraksinasi berturut-turut menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan air. Setelah proses fraksinasi selesai, dilakukan pemekatan menggunakan rotary evaporator untuk menghilangkan pelarutnya. Hasil dari fraksinasi ini menghasilkan 2 gram fraksi n-heksana, 2 gram fraksi etil asetat, dan 1 gram fraksi air. Informasi lebih rinci mengenai massa ekstrak dan fraksi daun Paku Uban dapat ditemukan pada Tabel 5.1.:

**Tabel 1.** Persentase rendemen ekstrak dan fraksi daun Paku Uban (*Nephrolepis biserrata*)

No	Jenis Ekstrak	Berat (gram)	Rendemen (%)
1	Ekstrak total etanol	6	3,333
2	Fraksi n-heksan	2	1,111
3	Fraksi etil asetat	2	1,111
4	Fraksi air	1	0,556

Dalam penelitian ini, metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi karena memiliki beberapa keunggulan, seperti kemudahan pelaksanaan dan penggunaan peralatan yang sederhana. Metode maserasi terbukti efektif dalam mengekstraksi senyawa dari bahan alami. Proses maserasi melibatkan pemecahan dinding dan membran sel pada sampel tanaman, menciptakan perbedaan tekanan antara dalam dan luar sel. Akibatnya, senyawa metabolit sekunder larut dalam pelarut organik yang digunakan. Salah satu keuntungan utama metode maserasi adalah bahwa tidak memerlukan pemanasan selama proses ekstraksi. Hal ini memungkinkan senyawa metabolit sekunder yang dianalisis tetap terjaga dengan baik selama proses ekstraksi. Pemanasan dapat menyebabkan degradasi atau modifikasi senyawa aktif yang diinginkan, sehingga metode maserasi lebih diutamakan untuk mempertahankan keaslian

senyawa alami yang diekstraksi. Proses maserasi dilakukan dengan menempatkan sampel tanaman dalam pelarut organik, kemudian mengaduk atau merendamnya dalam waktu yang cukup lama. Dalam proses ini, senyawa-senyawa aktif yang diinginkan secara perlahan larut ke dalam pelarut organik. Setelah proses maserasi selesai, ekstrak diperoleh dengan memisahkan sampel tanaman dari pelarut organik yang mengandung senyawa metabolit sekunder yang diinginkan. Dengan demikian, metode maserasi merupakan metode ekstraksi yang efektif dan praktis untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder dari bahan alami. Keunggulan metode ini terletak pada kemudahan pelaksanaan, penggunaan peralatan sederhana, dan kemampuan untuk menjaga keaslian senyawa alami yang diekstraksi tanpa memerlukan pemanasan selama proses ekstraksi. (Pasaribu, 2009).



**Gambar 3.** Proses pembuatan ekstrak tumbuhan paku

Tabel 2 menampilkan data hasil uji fitokimia ekstrak daun alamanda, yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang ada berdasarkan jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi:

**Tabel 2.** Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol *N. Biserrata*

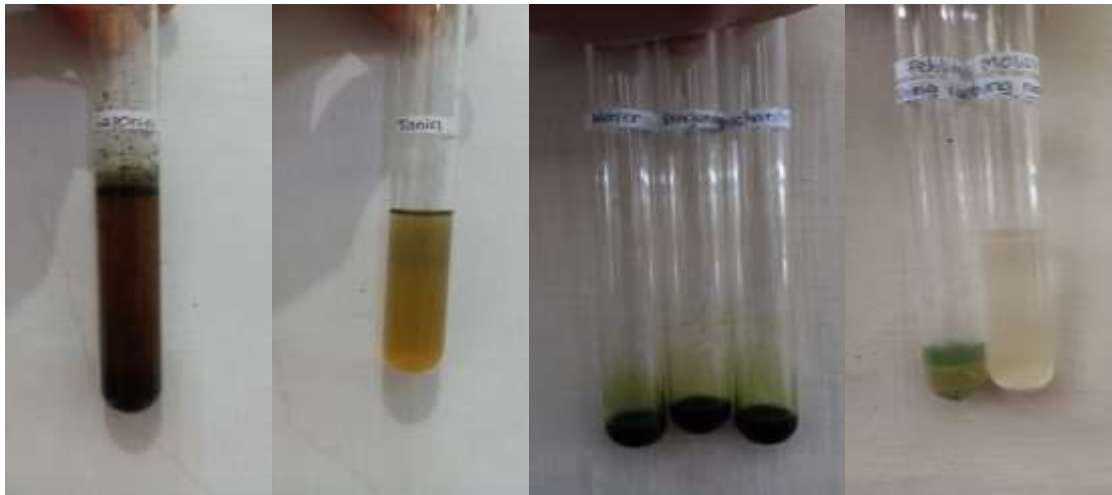
Jenis Senyawa	Jenis Ekstrak			
	Ekstrak kasar etanol	Fraksi <i>n</i> -heksana	Fraksi etil asetat	Fraksi air
Alkaloid	+	+	+	+
Fenolik	+	+	+	+
Flavonoid	+	+	+	+
Saponin	-	-	+	-
Steroid	-	+	-	-
Tanin	+	+	+	+
Triterpenoid	+	+	-	-

Ket: (+) = Teridentifikasi

(-) = Tidak Teridentifikasi

Berdasarkan data yang diperoleh dari pengujian fitokimia, dapat disimpulkan bahwa terdapat keberadaan senyawa metabolit sekunder dalam beberapa fraksi sampel etanol daun paku

uban (*Nephrolepis biserrata*). Senyawa-senyawa tersebut meliputi flavonoid, alkaloid, fenolik, steroid, saponin, dan tanin. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel berikut.



**Gambar 4.** Uji skrining fitokimia daun simplisia paku

Pengujian pada ekstrak etanol daun *Nephrolepis biserrata* mengindikasikan keberadaan senyawa alkaloid. Hal ini terlihat dari pembentukan endapan berwarna putih saat menggunakan pereaksi Mayer, endapan coklat saat menggunakan pereaksi Wagner, dan endapan jingga saat menggunakan pereaksi Dragendorff. Pembentukan endapan tersebut terjadi karena adanya kompleksasi antara senyawa alkaloid dengan ion kalium ( $K^+$ ). Senyawa alkaloid memiliki atom nitrogen yang memiliki pasangan elektron bebas yang dapat berikatan dengan ion  $K^+$  yang terdapat dalam pereaksi alkaloid (McMurry & Fay, 2004).

Metode pengujian kualitatif flavonoid pada daun paku uban *Nephrolepis biserrata* melibatkan penggunaan pelarut metanol 50% yang dipanaskan untuk melarutkan sampel. Selanjutnya, larutan tersebut ditambahkan dengan serbuk logam magnesium (Mg) dan asam klorida (HCl) pekat. Penambahan magnesium dan asam klorida memiliki tujuan untuk menghidrolisis senyawa-senyawa golongan flavonoid sehingga menjadi senyawa aglikon yang lebih sederhana, senyawa aglikon akan menghasilkan pembentukan senyawa kompleks yaitu garam flavilium. Warna kompleks ini dapat bervariasi, antara lain merah, kuning, atau jingga. Hasil uji kualitatif juga menunjukkan perubahan warna larutan menjadi jingga, yang disebabkan oleh terbentuknya senyawa kompleks antara ion magnesium dengan ion fenoksida pada senyawa golongan flavonoid. Reduksi senyawa golongan flavonoid ini dalam ekstrak menggunakan magnesium ( $Mg^{2+}$ ) dan asam klorida pekat menghasilkan pembentukan senyawa kompleks

$[Mg(OAr)_6]^{4-}$ , yang memiliki warna jingga (Marliana, 2005).

Pada uji flavonoid, hasil positif dapat dilihat dari perubahan warna menjadi kuning pada ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksana. Perubahan warna ini menunjukkan adanya keberadaan senyawa flavonoid dalam sampel yang diuji. Perubahan warna tersebut dapat dijadikan indikator kualitatif adanya flavonoid dalam sampel tersebut. Senyawa golongan flavonoid adalah senyawa polar yang umumnya mudah larut dalam pelarut polar. Namun, terdapat beberapa jenis flavonoid seperti flavanon, flavon, isoflavon, dan flavanol yang memiliki sifat nonpolar sehingga lebih mudah larut dalam pelarut nonpolar seperti etil asetat dan n-heksana. Oleh karena itu, dalam proses fraksinasi, flavonoid cenderung terlarut dalam pelarut etil asetat dan n-heksana. Hal ini dapat diamati dari perubahan warna menjadi kuning pada fraksi-fraksi tersebut, menunjukkan adanya kandungan flavonoid dalam larutan fraksi (Hendryani et al., 2015).

Dalam penelitian ini, teramati bahwa ekstrak etanol dari daun *Nephrolepis Biserrata* mengalami perubahan warna menjadi ungu, yang menunjukkan adanya senyawa fenolik dalam sampel. Perubahan warna tersebut terjadi karena adanya interaksi antara ion ferri ( $Fe^{3+}$ ) dan ion fenoksida dalam senyawa kompleks yang disebut  $[Fe(OAr)_6]^{3-}$ . Senyawa fenolik umumnya memiliki sifat aromatik dan mengandung satu atau lebih gugus hidroksil (OH). Karena sifat polaritasnya, senyawa fenolik biasanya larut dalam air. Ketika senyawa fenolik bereaksi dengan ion ferri, terjadi



perubahan warna yang dapat diamati. Dalam hal ini, terjadi perubahan warna menjadi kuning pada ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksana, menunjukkan adanya senyawa fenolik atau flavonoid yang larut dalam pelarut-pelarut tersebut (Harborne, 1987).

Dalam uji "Forth" untuk senyawa saponin, ditemukan bahwa hasil pengujian menunjukkan terbentuknya busa yang stabil dengan tinggi sekitar 2 cm dalam waktu sekitar 10 menit. Busa terbentuk karena adanya senyawa saponin yang memiliki dua sifat bertentangan dalam strukturnya. Ketika terjadi pengocokan, gugus hidrofil dalam senyawa saponin berinteraksi dengan air, sedangkan gugus hidrofob berinteraksi dengan udara. Interaksi ini menyebabkan pembentukan busa yang stabil. Selain itu, kehadiran glikosida yang mengalami hidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lain juga berperan penting dalam pembentukan busa di dalam air. Proses terbentuknya busa dimulai dengan adanya senyawa saponin yang mengandung gugus hidrofil dan hidrofob. Ketika senyawa ini terpapar dengan air dan terjadi pengocokan, gugus hidrofil berinteraksi dengan molekul air melalui gaya tarik antara gugus polar dan molekul air yang polar juga. Di sisi lain, gugus hidrofob dalam senyawa saponin tidak larut dalam air dan cenderung berinteraksi dengan udara di atas permukaan larutan. Interaksi antara gugus hidrofil dengan air dan gugus hidrofob dengan udara menghasilkan struktur busa yang stabil. Gugus hidrofil terlarut dalam air dan membentuk lapisan luar busa yang berinteraksi dengan air di sekitarnya, sementara gugus hidrofob tertarik satu sama lain dan membentuk inti busa yang terisolasi di dalamnya. Selain itu, kehadiran glikosida juga berperan penting dalam pembentukan busa. Glikosida, yang hadir dalam senyawa saponin, mengalami hidrolisis di dalam larutan dan menghasilkan glukosa serta senyawa lainnya. Reaksi hidrolisis ini menghasilkan produk yang dapat meningkatkan stabilitas busa dan menghasilkan lebih banyak gelembung. Dengan demikian, terbentuknya busa dalam air dipengaruhi oleh sifat dual senyawa saponin, interaksi antara gugus hidrofil dan hidrofob, serta peran glikosida yang mengalami hidrolisis dalam meningkatkan stabilitas busa. (Nugrahani et al., 2016). Dalam pengujian tersebut, ditemukan bahwa ekstrak etanol dan juga dari sampel ekstrak fraksi etil asetat menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya busa yang stabil dan tidak

menghilang. Namun, fraksi n-heksana tidak menghasilkan busa yang terdeteksi.

Setelah dilakukan pengujian pada ekstrak etanol *Nephrolepis biserrata* dengan penambahan larutan  $FeCl_3$ , terjadi perubahan warna menjadi larutan hijau kehitaman. Perubahan warna ini mengindikasikan terbentuknya senyawa kompleks antara tanin dan ion  $Fe^{3+}$ . Hasil positif dari pengujian ini menunjukkan adanya senyawa golongan fenol dalam sampel, dan kemungkinan salah satu senyawa tersebut adalah senyawa tanin karena senyawa tanin merupakan salah satu jenis senyawa golongan polifenol. Warna hijau gelap yang terbentuk akibat terjadinya kompleksasi antara senyawa tanin dengan ion  $Fe^{3+}$ , yang menunjukkan adanya interaksi antara keduanya (Ergina et al., 2014).

Hasil pengujian senyawa steroid pada ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun paku uban menunjukkan hasil positif dengan perubahan warna larutan menjadi hijau. Dalam eksperimen ini, digunakan kloroform sebagai pelarut untuk melarutkan senyawa steroid yang terdapat dalam sampel. Asam asetat anhidrat berperan dalam pembentukan gugus asetil dalam senyawa tersebut (Alfiyaturrohmah, 2013). Senyawa steroid mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam yang dapat menyebabkan perubahan warna menjadi biru hingga hijau (Mukhlisoh, 2010). Perubahan warna ini terjadi karena terjadi reaksi oksidasi pada senyawa steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (Sriwahyuni, 2010).

Dalam pengujian senyawa steroid pada ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun paku uban, penggunaan kloroform berperan penting sebagai pelarut untuk melarutkan senyawa steroid yang memiliki sifat nonpolar. Selanjutnya, penambahan asam asetat anhidrat memungkinkan terbentuknya gugus asetil pada senyawa steroid. Reaksi oksidasi yang terjadi pada golongan steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi menghasilkan perubahan warna larutan menjadi hijau. Perubahan warna ini menjadi indikator positif adanya senyawa steroid dalam sampel ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun paku uban.).

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun paku uban mengandung senyawa triterpenoid. Keberadaan triterpenoid dapat dikonfirmasi melalui perubahan warna pada perbatasan antara dua pelarut, yang menjadi cincin kecoklatan. Perubahan

warna terjadi karena terjadi reaksi oksidasi pada senyawa terpenoid tertentu, yang menyebabkan terbentuknya ikatan rangkap terkonjugasi. Proses ini menghasilkan gugus kromofor, yang bertanggung jawab atas perubahan warna. Selama proses ini, terjadi reaksi kondensasi di mana molekul-molekul terpenoid menggabungkan diri dan melepaskan molekul air (H<sub>2</sub>O), serta bergabung dengan karbokation (Sugiyanto, 2018).

Triterpenoid dan steroid memiliki sifat nonpolar, sehingga keduanya lebih mudah larut dalam pelarut nonpolar seperti n-heksana. Fraksi etil asetat dari daun paku uban juga menunjukkan hasil positif mengandung triterpenoid, meskipun kelarutannya sedikit lebih rendah dibandingkan dengan fraksi n-heksana. Selain itu, dalam ekstrak etanol daun paku uban, terdapat juga triterpenoid dan steroid. Keberadaan senyawa ini dalam ekstrak etanol disebabkan oleh ikatan dengan gugus glikosida, sehingga dapat diekstraksi bersama dengan etanol yang bersifat polar. Dengan demikian, hasil uji fitokimia memperkuat adanya kandungan triterpenoid dalam ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun paku uban serta memberikan informasi tentang sifat dan kelarutan senyawa tersebut dalam berbagai pelarut.

Flavonoid dianalisis menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Dalam penelitian ini, kuersetin dipilih sebagai larutan standar untuk penentuan kandungan flavonoid total dan sebagai standar pembanding karena memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Lindawati & Ma'ruf, 2020). Untuk menghitung konsentrasi sampel, dibuat larutan kurva baku kuersetin menggunakan persamaan regresi linier (Gandjar & Rohman, 2007).

Dalam penelitian ini, metode kolorimetri dengan menggunakan aluminium klorida digunakan untuk identifikasi flavonoid. Metode ini relatif sederhana dan dapat digunakan untuk menguji flavonoid dan turunannya seperti flavon dan kelompok flavonol yang memberi reaksi dengan penambahan Al (III) (Octaviani, et al., 2019). Hasil identifikasi senyawa golongan flavonoid dalam daun *Nephrolepis biserrata* menunjukkan perubahan warna menjadi jingga pada reaksi Shinoda. Warna jingga tersebut mengindikasikan adanya golongan senyawa flavonoid turunannya seperti golongan flavon, golongan senyawa auron, maupun flavonoid golongan khalkon (Winarti, et al., 2007). Selain itu, untuk golongan senyawa flavonoid lainnya akan membentuk reaksi warna

seperti golongan flavonol akan berwarna merah muda, golongan 2,3 dihidroflavonol akan berwarna merah, dan flavonoid golongan xanthone akan berwarna ungu (Depkes, 1989).

Metode spektrofotometri UV-Vis dan metode kolorimetri dengan aluminium klorida memberikan informasi penting tentang adanya flavonoid dalam daun *Nephrolepis biserrata*. Dengan penggunaan larutan standar kuersetin, dapat dihitung konsentrasi flavonoid dalam sampel, sementara perubahan warna pada reaksi Shinoda dan warna karakteristik pada golongan flavonoid lainnya membantu mengidentifikasi jenis flavonoid yang hadir dalam daun tersebut.

Dalam penelitian ini, digunakan kuersetin sebagai larutan standar dengan variasi konsentrasi berturut-turut mulai dari 20, 30, 40, 50, sampai 60 ppm untuk menentukan kadar flavonoid total dalam sampel. Penggunaan variasi konsentrasi ini penting karena metode yang digunakan melibatkan pembuatan kurva baku. Kurva baku dibuat dengan membuat beberapa deret konsentrasi agar dapat menghasilkan persamaan linier yang digunakan untuk menghitung persentase kadar flavonoid. Kuersetin dipilih sebagai larutan standar karena termasuk dalam golongan flavonoid dan flavonol dimana senyawa ini sama-sama memiliki gugus keto pada C-4, hadirnya gugus hidroksil pada atom C-3 maupun hadirnya gugus hidroksil pada atom C-5 yang hadirnya sangat berdekatan dengan gugus flavonol (Azizah dan Faramayuda, 2014: 48). Pengukuran serapan dilakukan pada rentang panjang gelombang 400 hingga 450 nm. Rentang ini dipilih karena flavonoid umumnya menunjukkan serapan pada panjang gelombang ini. Dengan melakukan pengukuran serapan pada rentang yang tepat, dapat diidentifikasi keberadaan flavonoid dalam sampel berdasarkan intensitas serapannya.

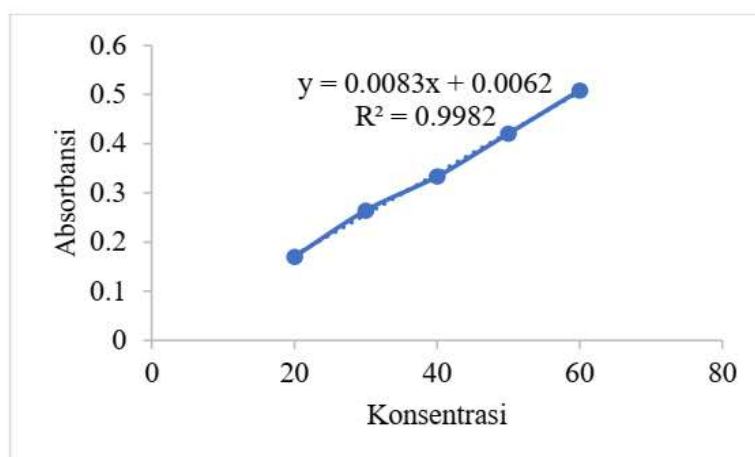
Hasil pengujian menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum standar baku kuersetin terletak pada panjang gelombang 435 nm. Panjang gelombang ini digunakan sebagai acuan untuk mengukur serapan pada sampel ekstrak etanol daun paku uban (*Nephrolepis biserrata*). Pengukuran dilakukan secara triplo, yaitu tiga kali pengukuran untuk setiap sampel. Untuk meningkatkan akurasi eksperimen, pengukuran ini dilakukan dengan mengulangnya beberapa kali. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar kuersetin dicatat dalam Tabel 5.3. Data tersebut digunakan untuk membangun kurva kalibrasi yang menghubungkan absorbansi dengan konsentrasi

larutan kuersetin. Dengan menggunakan persamaan regresi linier, dapat dihitung konsentrasi larutan sampel berdasarkan nilai absorbansi yang diukur. Kurva kalibrasi ini penting untuk mengkonversi data absorbansi menjadi konsentrasi

yang akurat dan dapat digunakan untuk menghitung kadar flavonoid dalam sampel yang sedang diteliti. Kurva kalibrasi baku ini ditampilkan dalam Gambar 5.9.

**Tabel 3.** Hasil Larutan Standar Kuersetin

Konsentrasi larutan kuersetin (ppm)	Absorbansi			
	1	2	3	A rata-rata
20	0,168	0,170	0,172	0,17
30	0,262	0,264	0,266	0,264
40	0,331	0,335	0,333	0,333
50	0,417	0,423	0,420	0,420
60	0,509	0,507	0,508	0,508



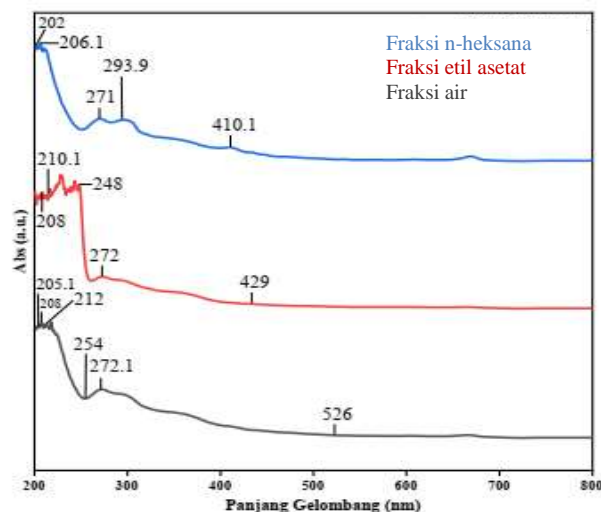
**Gambar 1.** Kurva Baku Larutan kuersetin

Dalam penelitian ini, dilakukan pengukuran kandungan flavonoid total dengan menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva baku, seperti yang terlihat pada Gambar 5.9. Persamaan tersebut adalah  $y = 0,0083x + 0,0062$ , dengan  $R^2$  sebesar 0,9982 dan  $r$  sebesar 0,999. Terdapat hubungan linear yang jelas antara konsentrasi larutan kuersetin dan nilai serapannya, seperti yang dapat dilihat dari grafik kurva kalibrasi yang telah dibuat. Dengan menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva kalibrasi, konsentrasi flavonoid total dalam ekstrak etanol *Nephrolepis biserrata* dapat dihitung. Berdasarkan hasil pengukuran absorbansi ekstrak etanol daun paku *Nephrolepis biserrata*, nilai absorbansi secara berurutan adalah 0,7370, 0,7374, dan yang terakhir adalah 0,7372. Rata-rata absorbansi yang diperoleh dengan nilai sebesar 0,7372. Dengan menggunakan persamaan regresi

linier, konsentrasi flavonoid total dalam ekstrak etanol dapat diestimasi berdasarkan nilai absorbansi tersebut.

Dari data kurva baku larutan kuersetin, diperoleh nilai konsentrasi sebanyak 88,072  $\mu\text{g/mL}$ . Dalam analisis kandungan flavonoid total dalam ekstrak etanol *Nephrolepis biserrata*, faktor pengenceran juga diperhitungkan. Hasilnya menunjukkan bahwa kandungan senyawa flavonoid total dalam ekstrak etanol *Nephrolepis biserrata* adalah sebesar 17,615 mg QE/g ekstrak. Temuan ini konsisten dengan hasil skrining fitokimia sebelumnya yang menunjukkan hadirnya senyawa-senyawa golongan fenolik dan senyawa golongan flavonoid dan turunannya dalam ekstrak sampel.

Gambar 5.10 memperlihatkan nilai  $\lambda$  maksimum dari sampel ekstrak atau fraksi daun Paku Uban yang diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis.



**Gambar 2.** Hasil UV-Vis ekstrak/fraksi daun Paku Uban

**Tabel 4.** Hasil pengukuran  $\lambda$  maksimum dari spektrum UV-Vis sampel ekstrak fraksi air (FA), fraksi etil asetat (FEA), dan fraksi n-heksana (FNH) daun Paku Uban

Panjang Gelombang (nm)				Transisi elektronik	Gugus fungsi	perkiraan senyawa*
FA	FEA	FNH	Range Pustaka			
526	429	410,1	300-550a	$n \rightarrow \pi^*$	C=O	Flavonoid
254	248	271	240-285a	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C terkonjugasi	Flavonoid
212	210,1	-	< 215b	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C tak terkonjugasi	Saponin
272,1	272	293,9	250-350c	$n \rightarrow \pi^*$	C=O	Tanin
205,1	-	206,1	200-225d	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C tak terkonjugasi	Steroid
208	208	202	< 215b	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C tak terkonjugasi	Triterpenoid

**Ket:** \*perkiraan senyawa yang mungkin berdasarkan data hasil uji fitokimia

Dari data hasil pengukuran spektra UV-Vis, terdapat indikasi bahwa dalam ekstrak fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksana terdapat senyawa flavonoid yang menunjukkan serapan pada pita I dan pita II. Pita I, dengan daerah Panjang gelombang atau  $\lambda$  berkisar antara 300 sampai 550 nm, mengindikasikan terjadi transisi elektron dari keadaan orbital  $n$  ke orbital  $\pi^*$  yang disebabkan oleh gugus dari C=O yang tidak berikatan dengan orbital anti-ikatan. Sedangkan serapan pada pita II terjadi pada daerah  $\lambda$  dengan rentang dari 245 sampai 285 nm dan

mengindikasikan adanya senyawa-senyawa flavonoid dengan gugus fenol. Pita II ini disebabkan oleh transisi elektron dari orbital  $\pi$  ke orbital  $\pi^*$ , yang dipengaruhi oleh kromofor dari C=O dan juga kromofor C=C dari gugus aromatik yang terkonjugasi pada gugus flavonol-3-OH yang tersubstitusi. Selain itu, adanya puncak serapan pada  $\lambda$  dengan nilai di bawah 215 nm yang sangat mungkin menunjukkan terjadinya transisi elektronik dari keadaan  $\pi \rightarrow \pi^*$ , yang disebabkan oleh gugus kromofor alkena (C=C) yang tidak terkonjugasi. Temuan ini mendukung

dugaan adanya senyawa saponin pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat berdasarkan penelitian Rachman et al. (2015), yang menemukan puncak serapan pada panjang gelombang 211 nm untuk senyawa saponin. Selain itu, dugaan adanya senyawa tanin juga didukung oleh hasil pengukuran serapan panjang gelombang yang tertera pada Tabel 4.4. Serapan pada rentang panjang gelombang 250-350 nm menunjukkan transisi elektron dari keadaan  $n \rightarrow \pi^*$ , yang mengindikasikan adanya ikatan C=O. Senyawa tanin juga diduga memiliki transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  yang menandakan adanya ikatan rangkap dari C=C yang terkonjugasi, serta transisi yang melibatkan kromofor dari ikatan C=O. Serapan pada rentang panjang gelombang 210-285 nm menunjukkan transisi elektron dari keadaan  $\pi \rightarrow \pi^*$ , yang mengindikasikan adanya ikatan rangkap dari C=C yang terkonjugasi. Temuan ini mendukung penelitian Sari et al. (2015), yang menyatakan bahwa senyawa tanin memiliki puncak serapan pada 346,5 nm dan 347 nm yang mengindikasikan adanya ikatan rangkai dari C=C yang terkonjugasi dan kromofor dari ikatan C=O.

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa daun Paku Uban (*Nephrolepis biserrata*) mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder. Uji fitokimia pada fraksi etanol menunjukkan adanya senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan triterpenoid. Fraksi n-heksana mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, steroid, dan triterpenoid. Fraksi etil asetat mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, dan tanin, sedangkan fraksi air mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, dan tanin. Kandungan senyawa flavonoid dan turunannya dengan total dalam ekstrak ditemukan sebesar 17,615 mg QE/g ekstrak. Hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan adanya transisi elektronik dari keadaan orbital  $\pi \rightarrow \pi^*$  dan dari keadaan orbital  $n \rightarrow \pi^*$ , yang mengindikasikan adanya senyawa-senyawa flavonoid dalam sampel tersebut.

## REFERENSI

- Appiah, K.S., Oppong, C.P., Mardani, H.K., Omari, R.A., Kpabitey, S., Amoatey, C.A., Onwona-Agyeman, S., Oikawa, Y., Katsura, K. & Fujii, Y. (2018). Medicinal plants used in the Ejisu-Juaben Municipality, Southern Ghana: An ethnobotanical study. *Medicines (Basel)*, 6 (1).
- Ariani, N., Febrianti, D. R., & Niah, R. (2020). Uji Aktivitas Ekstrak Etanolik Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. *Jurnal Pharmascience*, 7(1), 107–115.
- Ceri, B., Lovadi, I., & Linda, R. (2014). Keanekaragaman Jenis Paku-Pakuan (Pteridophyta) Di Mangrove Muara Sungai Peniti Kecamatan Segedong Kabupaten Pontianak. *Protobiont*, 3(2), 240–246.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Haeria, H. & Andi, T., 2016. Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus spinachristi* L.). *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Science*, 1(2), 57-61.
- Hong, L., Zhuo, J., Lei, Q., Zhou, J., Ahmed, S., Wang, C., Long, Y., Li, F. & Long, C. (2015). Ethnobotany of wild plants used for starting fermented beverages in Shui Communities of Southwest China. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11 (42), 1–21.
- Jati, N., Prasetya, A. T. & Mursiti, S., 2019. Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Alkaloid Pada Daun Pepaya. *Jurnal MIPA*, 42(1), 1-6.
- Lindawati, N. & Ma'ruf, S., 2020. Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) secara Spektrofotometri Visibel. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 6(1), 83-91.
- Malan, D.F., Neuba, D.F. & Kouakou, K.L. (2015). Medicinal plants and traditional healing practices in Ehotile people, around the Aby Lagoon (*Eastern Littoral of Côte d'Ivoire*). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11 (21), 1–18.
- Nugroho, C., Larasati, D., Endah Yulawati P.S, Ramadhan, N., Sarah, Savira, Sabrina, T.I., Sedayu, A. & Ristanto, R.H. (2018). Karakteristik tumbuhan paku (Pteridophyta) di jalur Ciwalen Taman Nasional Gunung Gede Pangrango, Cisarua, Jawa Barat. *Biodidaktika: Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*, 13 (1), 28–37.



- Oktavia, F. D., & Sutoyo, S. (2021). Skrining Fitokimia, Kandungan Flavomoid Total, dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Tumbuhan *Selaginella doederleinii*. *Jurnal Kimia Riset*, 6(2), 141–153.
- Octaviani, M., Fadhli, H. & Yuneistya, E., 2019. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol dari Kulit Bawang Merah (*Allium cepa* L.) dengan Metode Difusi Cakram. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(1), 62-68.
- Pranowo, D., Noor, E., Haditjaroko, L. & Maddu, A. (2016). Optimasi ekstraksi flavonoid total daun geddi (*Abelmoschus manihot* L.) dan uji aktivitas antioksidan. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, 27 (1), 37–46.
- Purnawati, U., Turnip, M., & Lovadi, I. (2014). Eksplorasi Paku-Pakuan (Pteridophyta) Di Kawasan Cagar Alam Mandor Kabupaten Landak. *Protobiont*, 3(2), 155–165.
- Ramadhani, M. A., Hati, A. K., Lukitasari, N. F., & Jusman, A. H. (2020). Skrining Fitokimia Dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Serta Fenolik Total Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) Dengan Maserasi Menggunakan Pelarut Etanol 96%. *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 3(1).
- Renjana, Elga., Nikmatullah, M., Firdiana, Elok R., Ningrum, L.W., dan Angio, M. H. 2021. Potensi *Nephrolepis* spp. sebagai Tanaman Obat Koleksi Kebun Raya Purwodadi Berdasarkan Kajian Etnomedisin dan Fitokimia. *Bul. Plasma Nutrafah* 27(1):1–10.
- Shah, M.D., Yong, Y.S. & Iqbal, M. (2014). Phytochemical investigation and free radical scavenging activities of essential oil, methanol extract and methanol fractions of *Nephrolepis biserrata*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (9), 269–277.
- Setiabudi, D. & Tukiran, 2017. Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Klampok Watu (*Syzygium litorale*). *Unesa Journal of Chemistry*, 6(3), 155-160.
- Simaremare, E., 2014. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). *Pharmacy*, 11(1), 98-107.
- Singh, S. & Singh, R. (2012). Ethnomedicinal use of pteridophytes in reproductive health of tribal women of Pachmarhi Biosphere Reserve, Madhya Pradesh, India. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3 (12), 4780–4790.
- Sopiah, B., Muliastari, H., & Yuanita, E. (2019). Skrining Fitokimia dan Potensi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Hijau dan Daun Merah Kastuba. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 17(1), 27-33.
- Susanti, E., Syafrudin, M., Mulawarman, U., & Timur, K. (2021). Biomassa dan Cadangan Karbon Tiga Jenis Tumbuhan Herba (*Cyclosorus interruptus*, *Nephrolepis biserrata*, dan *Digitaria didactyla*) pada Periode Penyiangan Berbeda sebagai gulma yang perlu dikendalikan, ternyata antara lain dimanfaatkan untuk pakan terna. *Jurnal Hutan Tropis*, 5, 73-79.
- Tewari, D., Samoilă, O., Gocan, D., Mocan, A., Moldovan, C., Devkota, H.P., Atanasov, A.G., Zengin, G., Echeverría, J., Vodnar, D., Szabo, B. & Crişan, G. (2019). Medicinal plants and natural products used in cataract management. *Frontiers in Pharmacology*, 10 (466), 1–22.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur G. & Kaur H. (2012). Phytochemical Screening and Extraction: A Review, *International Pharmaceutica Scientia*, 1, 1, 98-106.
- Tjitrosoepomo, Gembong. (2014). Taksonomi Tumbuhan (Schizophyta, Thallophyta, Bryophyta, Pteridophyta). Yogyakarta: Gadjah Mada. University Press.
- Trinovita, Y., Mundriyastutik, Y., Fanani, Z. & Fitriyani, A. N., 2019. Evaluasi Kadar Flavonoid Total Pada Ekstrak Etanol Daun Sangketan (*Achyranthes Aspera*) Dengan Spektrofotometri. *Indonesia Jurnal Farmasi*, 4(1), 12-18.
- Triwahyuno, D. & Hidajati, N., 2020. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Mahoni (*Swietenia mahagoni* Jacq). *Unesa Journal of Chemistry*, 9(1), 54-57.
- Vifta, R. L. dan Advistasari, Y. D. 2018. Skrining Fitokimia, Karakterisasi, dan Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.). *In Prosiding Seminar Nasional Unimus*. Vol.1, pp. 8–14.
- Xu, Z. & Deng, M. (2017) Identification and control of common weeds. Volume 2. Dordrecht, Springer.