

PENETAPAN KADAR KUERSETIN EKSTRAK DAUN ALPUKAT BERDASARKAN WAKTU PANEN DENGAN KLT-DENSITOMETRI

DETERMINATION OF QUERCETIN CONTENT IN AVOCADO LEAVES BASED ON HARVEST TIME USING TLC-DENSITOMETRY

Rollando Rollando^{1*}, Eva Monica², Chusnul Kotimah³

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Ma Chung

²Program Studi Pendidikan Profesi Apoteker, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Ma Chung

³UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu

*Korespondensi: ro.llando@machung.ac.id

ABSTRAK

Daun alpukat (*Persea americana* Mill.) diketahui mengandung kuersetin, suatu senyawa flavonoid yang memiliki berbagai aktivitas farmakologis. Kandungan senyawa aktif dalam tanaman dapat bervariasi tergantung pada waktu panen, namun informasi mengenai waktu panen optimal untuk memperoleh kadar kuersetin tertinggi masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan kadar kuersetin dalam daun alpukat berdasarkan waktu panen (pagi, siang, dan sore) menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri (KLT-Densitometri) yang telah divalidasi.

Penelitian ini dilakukan dengan mengeringkan daun alpukat segar, mengekstraksinya menggunakan etanol 70%, kemudian menganalisis kadar kuersetinnya menggunakan sistem fase gerak kloroform:metanol:asam asetat (8:1,5:0,5) dengan pemindaian pada panjang gelombang maksimum 366 nm. Validasi metode menunjukkan hasil yang memenuhi syarat dengan koefisien korelasi (*r*) sebesar 0,9987, akurasi dalam rentang 98-101%, dan presisi yang baik (RSD < 2,5%). Data dianalisis menggunakan uji ANOVA untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar waktu panen.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar kuersetin tertinggi diperoleh dari daun yang dipanen pada siang hari, yaitu sebesar $5,84 \pm 0,12$ mg/g bahan kering, diikuti oleh sore hari ($4,26 \pm 0,10$ mg/g), dan terendah pada pagi hari ($3,12 \pm 0,08$ mg/g). Uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok waktu panen. Berdasarkan temuan ini, dapat disimpulkan bahwa waktu panen berpengaruh nyata terhadap kadar kuersetin dalam daun alpukat, dan panen pada siang hari merupakan waktu terbaik untuk memperoleh kadar kuersetin yang maksimal.

Kata kunci: Kuersetin, Daun alpukat, Waktu panen, KLT-densitometri, Flavonoid.

ABSTRACT

Avocado leaves (*Persea americana* Mill.) are known to contain quercetin, a flavonoid compound with various pharmacological activities. The content of active compounds in plants can be influenced by the time of harvest; however, information regarding the optimal harvest time to obtain the highest quercetin content remains limited. Therefore, this study aimed to determine the quercetin content in avocado leaves based on harvest time (morning, noon, and afternoon) using a validated Thin Layer Chromatography-Densitometry (TLC-Densitometry) method.

The avocado leaves were dried, extracted with 70% ethanol, and then analyzed for their quercetin content using a mobile phase system of chloroform:methanol:acetic acid (8:1.5:0.5) with scanning at a maximum wavelength of 366 nm. Method validation yielded satisfactory results with a correlation coefficient (*r*) of 0.9987, accuracy within the range of 98-101%, and precision with an RSD < 2.5%. Data were analyzed using ANOVA to determine the significance of differences among harvest times.

The results showed that the highest quercetin content was found in leaves harvested at noon (5.84 ± 0.12 mg/g dry weight), followed by afternoon (4.26 ± 0.10 mg/g), and the lowest in the morning (3.12 ± 0.08 mg/g). ANOVA analysis indicated a significant difference ($p < 0.05$) between harvest times. It can be concluded that harvest time significantly affects the quercetin content in avocado leaves, with noon being the optimal time to achieve the highest quercetin yield.

Keywords: Quercetin, Avocado leaf, Harvest time, TLC-densitometry, Flavonoid.

PENDAHULUAN

Alpukat (*Persea americana* Mill.) adalah tanaman tropis famili Lauraceae yang berasal dari Amerika Tengah dan kini dibudidayakan luas di daerah beriklim tropis dan subtropis. Selain buahnya bernilai gizi tinggi, berbagai bagian tanaman alpukat telah lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional. Dalam sistem pengobatan Ayurveda dan tradisi lainnya, praktisi menggunakan ekstrak daun alpukat untuk mengobati hipertensi, gangguan pencernaan (sakit perut dan diare), bronkitis, dan diabetes (Collignon *et al.*, 2024). Analisis fitokimia menunjukkan daun alpukat kaya akan senyawa bioaktif. Daun alpukat mengandung senyawa metabolit sekunder seperti saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, dan polisakarida (da Silva *et al.*, 2023). Kandungan flavonoid dalam daun tersebut diyakini berkontribusi pada efek farmakologinya (misalnya penurunan tekanan darah dan efek analgesik) sebagaimana dilaporkan dalam literatur (Hosseini *et al.*, 2021; Jennings *et al.*, 2024).

Salah satu flavonoid penting yang terdapat pada banyak tumbuhan, termasuk daun obat, adalah kuersetin. Kuersetin adalah senyawa flavonol polifenolik (2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksikromen-4-on, rumus molekul $C_{15}H_{10}O_7$) (da Silva *et al.*, 2023). Senyawa ini umum dijumpai pada sayuran dan buah-buahan (seperti bawang merah, apel, kubis, kacang-kacangan, dan teh). Kuersetin menunjukkan profil fisikokimia khas berupa kristal kuning dengan kelarutan tinggi dalam lemak dan alkohol serta kelarutan rendah dalam air dingin. Sejumlah studi farmakologi melaporkan kuersetin memiliki spektrum aktivitas biologis yang luas. Secara khusus, kuersetin menunjukkan aktivitas antioksidan kuat yang menetralkan radikal bebas dan menghambat peroksidasi lipid (Batiha *et al.*, 2020). Kuersetin menunjukkan berbagai aktivitas biologis penting, termasuk antikanker, antivirus, antialergi, antidiabetik, anti-inflamasi, dan proteksi terhadap sistem kardiovaskular, sehingga para peneliti dalam bidang kedokteran dan farmasi banyak menelitinya sebagai agen terapeutik potensial, misalnya sebagai antikanker, antivirus, hepatoprotektor, dan kardioprotektor (Batiha *et al.*, 2020).

Ekstrak daun alpukat mengandung kuersetin sebagai salah satu metabolit sekunder utamanya. Kuersetin dan turunannya menyumbang sekitar 60-75% dari total flavonoid pada daun alpukat (Rustanti dan Lathifah, 2019). Hal ini menegaskan bahwa kuersetin merupakan komponen dominan dalam kelompok flavonoid daun alpukat. Kandungan kuersetin tersebut relevan dengan aktivitas farmakologis ekstrak; misalnya, kuersetin dikenal memiliki aktivitas antioksidan kuat sekaligus berperan sebagai agen pencerah kulit (Batiha *et al.*, 2020). Oleh karena itu, penetapan kadar kuersetin dalam daun alpukat penting untuk menilai potensi biologis ekstrak daun, serta sebagai salah satu parameter standarisasi mutu sediaan herbal yang berbahan daun alpukat (Rustanti dan Lathifah, 2019).

Kandungan metabolit sekunder pada tanaman bersifat dinamis dan dipengaruhi oleh kondisi lingkungan saat panen. Intensitas cahaya matahari dan ritme sirkadian tumbuhan secara khusus mempengaruhi sintesis senyawa fenolik dan flavonoid (Qaderi *et al.*, 2023). Pada umumnya, sinar matahari yang kuat (terutama pada siang hari) merangsang jalur biosintesis fenolik, sehingga kadar flavonoid dalam jaringan tanaman dapat mengalami puncak berbeda antara waktu pagi, siang, dan sore (Qaderi *et al.*, 2023). Selain itu, faktor suhu dan kualitas cahaya harian turut memodulasi akumulasi metabolit sekunder. Studi biokimia menunjukkan bahwa suhu dan intensitas cahaya berperan penting dalam menentukan kandungan total fenolik dan kapasitas antioksidan tanaman. Misalnya, *Peucedanum japonicum* menghasilkan total fenolik dan aktivitas penangkal radikal bebas (DPPH) lebih tinggi ketika ditumbuhkan pada intensitas cahaya $200-500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dan suhu rendah $18/14^\circ\text{C}$. Pada tanaman sayuran seperti selada dan kubis, intensitas cahaya sedang ($150-300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) meningkatkan kadar antioksidan, fenol, dan gula, sementara intensitas lebih tinggi ($350-450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) dengan spektrum biru-merah memperkuat akumulasi polifenol dan antosianin. Penelitian lain juga melaporkan bahwa suhu tinggi mampu meningkatkan kandungan fenolik total hingga 44% dan kapasitas antioksidan (FRAP) hingga 77%. Temuan-temuan ini menegaskan bahwa variasi lingkungan, khususnya cahaya dan suhu, secara signifikan memengaruhi kualitas bioaktif tanaman (Makarova *et al.*, 2021). Dengan demikian, waktu panen yang berbeda (pagi, siang, sore) berpotensi menghasilkan variasi kadar kuersetin dan senyawa metabolit sekunder lainnya pada daun alpukat.

Untuk mengukur kadar kuersetin secara akurat dalam ekstrak daun alpukat, digunakan metode kromatografi lapis tipis densitometri (KLT-densitometri). Metode KLT-densitometri adalah teknik analisis planar yang sederhana namun memiliki luaran tinggi. Dalam metode ini, ekstrak tanaman diaplikasikan pada plat kromatografi silika, dikembangkan dengan pelarut bergerak, kemudian noda kuersetin pada plat dipindai secara densitometrik pada panjang gelombang khusus (Sudjarwo *et al.*, 2019). Kelebihan KLT-densitometri antara lain kecepatan analisis dan kemampuan menganalisis banyak sampel sekaligus dengan biaya relatif rendah (Kowalska dan Sajewicz, 2022). Pendekatan ini telah terbukti valid untuk penetapan kuersetin dalam ekstrak daun tanaman obat lain; misalnya dalam validasi metode pada ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*),

KLT-densitometri dengan deteksi pada $\lambda=265$ nm memberikan linearitas, batas deteksi, dan akurasi yang memadai untuk kandungan kuersetin (Sudjarwo *et al.*, 2019). Oleh karena itu, KLT-densitometri dipilih sebagai metode untuk mengekstrak dan menentukan kadar kuersetin daun alpukat dalam penelitian ini, mengingat keandalannya dalam pemisahan dan kuantifikasi senyawa aktif pada ekstrak herbal (Sudjarwo *et al.*, 2019).

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan kuantitatif menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tujuan penelitian adalah menentukan kadar kuersetin dalam daun alpukat berdasarkan waktu panen. Analisis dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan analisis densitometri. Setiap kelompok perlakuan berupa perbedaan waktu panen dianalisis secara replikasi untuk memperoleh data kuantitatif yang valid dan dapat dibandingkan.

Alat

Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik Shimadzu AUW220D dengan ketelitian 0,0001 g untuk menimbang bahan kering, oven suhu rendah Memmert UN55 untuk proses pengeringan serbuk daun, serta blender Philips HR2115 untuk menghancurkan daun menjadi serbuk halus. Proses maserasi dilakukan menggunakan labu kaca Pyrex, sedangkan pemekatan ekstrak dilakukan dengan rotary evaporator Buchi R-300 pada suhu rendah. Analisis kromatografi dilakukan menggunakan plat KLT silica gel 60 F254 (Merck), chamber kromatografi Camag Twin Trough Chamber untuk pengembangan pelarut, lampu UV Camag UV Cabinet pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm untuk visualisasi noda, serta densitometer Camag TLC Scanner 4 untuk kuantifikasi noda. Selain itu, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV-1800 digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimum kuersetin. Alat gelas yang digunakan, antara lain gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, pipet tetes, dan corong, seluruhnya bermerek Pyrex/Iwaki.

Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah daun alpukat yang diperoleh dari UPT Laboratorium Herbal Materia Medica, Batu, Jawa Timur, dan dipanen pada tiga waktu berbeda, yaitu pagi hari (sekitar pukul 06.00), siang hari (sekitar pukul 12.00), dan sore hari (sekitar pukul 16.00). Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 70% (Merck, Jerman). Kuersetin standar (Sigma-Aldrich, USA) digunakan sebagai pembanding untuk kuantifikasi. Fase gerak yang diuji dalam optimasi metode meliputi kombinasi pelarut seperti kloroform (Merck, Jerman), metanol (Merck, Jerman), dan asam asetat glasial (Merck, Jerman). Pereaksi untuk skrining fitokimia meliputi larutan FeCl_3 1% (Merck, Jerman), reagen Dragendorff (Merck, Jerman), larutan magnesium dengan HCl pekat (Merck, Jerman), serta reagen *Liebermann-Burchard* (Merck, Jerman). Untuk visualisasi noda pada plat KLT, digunakan pereaksi seperti aluminium klorida (AlCl_3 , Merck, Jerman) dan kombinasi *Naturstoffreagenz-PEG* (NP/PEG, Merck, Jerman). Seluruh bahan kimia yang digunakan memiliki derajat kemurnian proanalisis (p.a.).

Prosedur Penelitian

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Alpukat

Daun alpukat yang telah dikumpulkan dari pohon yang sama pada tiga waktu panen (pagi, siang, dan sore) dicuci bersih dan dikeringkan pada suhu ruang ($\pm 25-27$ °C) yang terlindung dari sinar matahari langsung. Setelah kering, daun digiling menggunakan blender hingga menjadi serbuk halus. Serbuk daun sebanyak 100 gram diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 70% sebagai pelarut selama tiga hari (3×24 jam). Proses maserasi dilakukan dalam wadah tertutup dengan pengadukan secara berkala setiap hari pada suhu ruang. Setelah tiga hari, filtrat disaring dan pelarut diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu rendah sekitar 40 °C hingga diperoleh ekstrak kental (Rollando *et al.*, 2022).

Penetapan Kadar Air

Kadar air serbuk daun alpukat ditentukan dengan metode gravimetri. Serbuk alpukat sebanyak 2 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam cawan porselen, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C hingga berat konstan tercapai. Setelah pengeringan, sampel ditimbang kembali dan kadar air dihitung berdasarkan selisih berat awal dan akhir, lalu dinyatakan dalam persen (Wijaya dan Noviana, 2022).

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak etanol daun alpukat untuk mengidentifikasi keberadaan golongan senyawa metabolit sekunder. Uji kualitatif meliputi uji flavonoid menggunakan reagen magnesium dan HCl pekat (uji *Shinoda*), uji alkaloid menggunakan reagen *Dragendorff*, uji tanin dengan larutan FeCl_3 ,

uji saponin melalui pengamatan terbentuknya busa stabil, serta uji steroid dan triterpenoid dengan reagen *Liebermann-Burchard*. Setiap reagen ditambahkan ke dalam larutan ekstrak dan diamati perubahan warna atau reaksi spesifik yang menunjukkan adanya senyawa tertentu (Nugrahani *et al.*, 2016).

Optimasi Metode: Pemilihan Fase Gerak

Pemilihan fase gerak dilakukan untuk mendapatkan sistem pelarut yang mampu memberikan pemisahan noda kuersetin secara optimal pada plat KLT. Beberapa sistem fase gerak diuji, yaitu kloroform:metanol:asam asetat (8:1,5:0,5), toluena:etil asetat:asam format (5:4:1), dan n-heksana:etil asetat (7:3). Masing-masing sistem diuji dengan pengembangan plat berisi larutan standar kuersetin dan ekstrak etanol daun alpukat. Setelah pengembangan, plat dikeringkan dan diamati di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Fase gerak terbaik dipilih berdasarkan nilai R_f kuersetin yang berada dalam kisaran ideal (0,3–0,7), ketajaman dan keterpisahan noda, serta kestabilan visualisasi (Wardani *et al.*, 2024).

Penentuan Panjang Gelombang

Panjang gelombang maksimum untuk deteksi kuersetin ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Larutan standar kuersetin dalam metanol diukur serapannya dalam rentang 200–400 nm untuk menentukan λ_{maks} . Panjang gelombang maksimum inilah yang kemudian digunakan dalam pemindaian densitometri pada plat KLT, umumnya ditemukan pada 254 nm atau 366 nm tergantung pada sistem visualisasi yang digunakan (Rollando *et al.*, 2019).

Validasi Metode

Selektivitas

Selektivitas metode diuji dengan membandingkan spektrum absorbansi dan nilai R_f antara noda kuersetin standar dan ekstrak daun alpukat. Jika spektrum kedua larutan menunjukkan kemiripan tinggi dan nilai R_f serupa, maka metode dianggap selektif dalam mendeteksi kuersetin dalam matriks ekstrak (Andayani *et al.*, 2024).

Linearitas

Linearitas diuji dengan menyiapkan larutan standar kuersetin dalam beberapa konsentrasi, misalnya 2, 4, 6, 8, dan 10 $\mu\text{g/mL}$. Setiap konsentrasi diaplikasikan ke plat KLT dalam volume yang sama dan dikembangkan menggunakan fase gerak terpilih. Setelah pemindaian dengan densitometer, luas area noda diplot terhadap konsentrasi untuk membentuk kurva kalibrasi. Linearitas dinyatakan dari nilai koefisien korelasi (r), yang idealnya mendekati 1,000 (Andayani *et al.*, 2024).

Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Batas deteksi dan batas kuantitasi ditentukan secara statistik menggunakan deviasi standar dari replikasi konsentrasi rendah dan kemiringan (slope) kurva kalibrasi. Perhitungannya mengikuti rumus: $\text{BD} = 3,3 \times (\text{SD}/\text{slope})$ dan $\text{BK} = 10 \times (\text{SD}/\text{slope})$. Nilai ini menunjukkan kemampuan metode untuk mendeteksi dan mengukur jumlah minimum kuersetin secara akurat (Andayani *et al.*, 2024).

Penentuan Akurasi dan Presisi

Akurasi metode dinilai melalui uji pemulihan (*recovery*) dengan menambahkan kuersetin standar ke dalam sampel ekstrak pada tiga level konsentrasi (80%, 100%, dan 120%). Persentase pemulihan dihitung untuk menilai ketepatan metode. Sementara itu, presisi diuji dengan melakukan replikasi pengukuran intra-day (dalam hari yang sama) dan inter-day (hari berbeda), lalu menghitung nilai % *Relative Standard Deviation* (RSD) (Andayani *et al.*, 2024).

Penetapan Kadar Kuersetin dalam Ekstrak

Larutan ekstrak dari daun alpukat hasil panen pagi, siang, dan sore masing-masing diaplikasikan pada plat KLT bersamaan dengan larutan standar kuersetin. Plat dikembangkan menggunakan fase gerak yang telah dioptimasi, kemudian dikeringkan dan disemprot pereaksi visualisasi. Noda kuersetin dianalisis dengan densitometer pada panjang gelombang yang telah ditentukan. Luas area masing-masing noda dibandingkan dengan kurva kalibrasi untuk menghitung kadar kuersetin dalam setiap sampel ekstrak, dan hasilnya dinyatakan dalam mg/g bahan kering. Perbandingan kadar antar waktu panen selanjutnya dianalisis untuk mengetahui waktu panen terbaik dalam menghasilkan kuersetin tertinggi (Andayani *et al.*, 2024).

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pemindaian densitometri berupa nilai luas area dari masing-masing noda kuersetin pada plat KLT, baik dari larutan standar maupun ekstrak daun alpukat yang dipanen pada pagi, siang, dan sore hari. Nilai area dari larutan standar digunakan untuk menyusun kurva kalibrasi dengan cara memplot hubungan antara konsentrasi kuersetin ($\mu\text{g/mL}$) terhadap luas area. Kurva kalibrasi tersebut digunakan sebagai dasar untuk menghitung kadar kuersetin dalam sampel berdasarkan persamaan regresi linear yang dihasilkan.

Kadar kuersetin dari masing-masing waktu panen dihitung dan dinyatakan dalam satuan mg per gram bahan kering. Semua pengukuran dilakukan setidaknya dalam tiga kali pengulangan (triplo) untuk memperoleh nilai rerata, standar deviasi (SD), dan koefisien variasi (%CV).

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar kuersetin yang signifikan berdasarkan waktu panen, data kadar kuersetin dianalisis menggunakan analisis varians satu arah (ANOVA *one-way*). Jika hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik ($p < 0,05$), maka dilakukan uji lanjut *Tukey HSD* atau uji *post hoc* lain yang sesuai untuk mengetahui pasangan kelompok mana yang menunjukkan perbedaan bermakna (Setiawan *et al.*, 2020).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air merupakan langkah penting untuk menilai mutu dan kestabilan simplisia sebelum digunakan dalam proses ekstraksi atau formulasi sediaan herbal. Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (FHI), kadar air maksimum yang diperbolehkan untuk simplisia kering umumnya adalah tidak lebih dari 10%, kecuali dinyatakan secara khusus dalam monografi masing-masing tanaman obat (Djoko *et al.*, 2020). Dalam penelitian ini, kadar air serbuk daun alpukat diperoleh sebesar $7,85 \pm 0,12\%$, yang berarti masih berada di bawah batas maksimum yang ditetapkan FHI. Hasil ini menunjukkan bahwa serbuk daun telah dikeringkan secara memadai dan memenuhi persyaratan mutu simplisia kering sesuai standar nasional. Kadar air yang rendah ini juga menandakan bahwa serbuk daun memiliki stabilitas penyimpanan yang baik, serta minim risiko kontaminasi mikroba atau degradasi senyawa aktif. Selain itu, kesesuaian kadar air ini dengan standar FHI memperkuat validitas penggunaan simplisia sebagai bahan baku dalam pengembangan produk fitofarmaka atau sediaan herbal lainnya. Dengan demikian, serbuk daun alpukat dapat dinyatakan memenuhi kriteria kualitas simplisia berdasarkan ketentuan Farmakope Herbal Indonesia.

Skrining Fitokimia

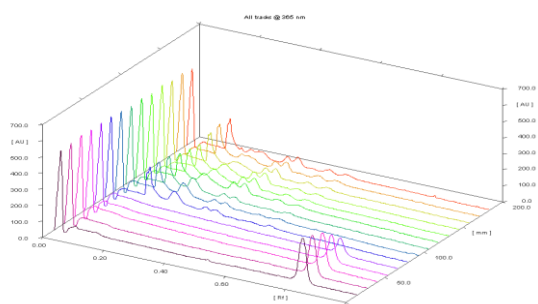
Skrining fitokimia merupakan tahap awal dalam identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder yang berperan penting dalam aktivitas farmakologis tanaman obat. Hasil skrining terhadap ekstrak etanol daun alpukat menunjukkan adanya lima golongan metabolit sekunder utama, yaitu flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan triterpenoid, sedangkan golongan steroid tidak terdeteksi. Metode uji kualitatif yang digunakan memberikan indikasi visual terhadap keberadaan masing-masing senyawa (Handayani *et al.*, 2020). Flavonoid terdeteksi melalui uji Shinoda yang menghasilkan perubahan warna merah muda, menandakan reaksi positif terhadap flavonoid, termasuk kemungkinan adanya kuersetin sebagai salah satu komponennya (Kartikasari *et al.*, 2022). Alkaloid teridentifikasi dengan terbentuknya endapan jingga pada penambahan reagen Dragendorff, sedangkan tanin memberikan reaksi positif berupa warna biru kehitaman setelah ditetesi larutan FeCl_3 , mengindikasikan adanya senyawa polifenol yang bersifat astringen (Agustin dan Gunawan, 2019). Saponin menghasilkan busa stabil setinggi $\pm 1-10$ cm yang bertahan lebih dari 10 menit pada uji busa, sehingga menunjukkan karakteristiknya sebagai detergen alami (Septiadi *et al.*, 2013). Triterpenoid menghasilkan warna hijau kebiruan pada uji *Liebermann-Burchard*, yang mengonfirmasi keberadaannya di dalam ekstrak (Puspa *et al.*, 2017). Ketidakterdeteksian steroid menandakan bahwa fraksi ini tidak terdapat dalam jumlah yang cukup untuk menghasilkan reaksi positif. Secara keseluruhan, profil fitokimia ini mendukung dugaan bahwa ekstrak daun alpukat memiliki potensi farmakologis, terutama yang berkaitan dengan kandungan flavonoid, termasuk kuersetin, yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi.

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun alpukat

Golongan Senyawa	Metode Uji	Hasil Pengamatan	Keterangan
Flavonoid	Uji <i>Shinoda</i>	Terjadi perubahan warna menjadi merah muda	Positif (+)
Alkaloid	Reagen <i>Dragendorff</i>	Terbentuk endapan berwarna jingga	Positif (+)
Tanin	Larutan FeCl_3	Larutan berubah warna menjadi biru kehitaman	Positif (+)
Saponin	Uji Busa	Muncul busa stabil selama lebih dari 10 menit	Positif (+)
Triterpenoid	Reagen <i>Liebermann-Burchard</i>	Larutan berubah warna menjadi hijau kebiruan	Positif (+)
Steroid	Reagen <i>Liebermann-Burchard</i>	Tidak ada perubahan warna signifikan	Negatif (–)

Optimasi Metode: Pemilihan Fase Gerak

Optimasi metode kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk memperoleh sistem fase gerak yang mampu memisahkan senyawa kuersetin secara optimal dari komponen lain dalam ekstrak daun alpukat. Tiga kombinasi fase gerak diuji, yaitu kloroform:metanol:asam asetat (8:1.5:0.5), toluena:etil asetat:asam format (6:3:1), dan n-heksan:etil asetat (7:3). Hasil pengujian menunjukkan bahwa sistem kloroform:metanol:asam asetat menghasilkan pemisahan terbaik dengan nilai *retardation factor* (Rf) kuersetin sebesar 0,56. Nilai ini berada dalam rentang ideal Rf (0,3-0,7), yang menunjukkan bahwa senyawa terpisah dengan baik dari komponen lainnya (Fajriaty *et al.*, 2018). Noda kuersetin yang dihasilkan juga tampak jelas, tajam, dan tidak menyatu dengan senyawa lain, menunjukkan spesifisitas dan resolusi yang tinggi. Oleh karena itu, sistem fase gerak kloroform:metanol:asam asetat (8:1.5:0.5) dipilih sebagai sistem optimum dan digunakan dalam seluruh analisis KLT lanjutan.



Gambar 1. Profil kromatogram ekstrak dan kuersetin pada 366 nm dengan fase gerak kloroform:metanol:asam asetat (8:1.5:0.5)

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) merupakan tahap krusial dalam analisis spektrofotometri dan densitometri, karena menentukan pada panjang gelombang berapa senyawa target menunjukkan serapan cahaya tertinggi. Dalam penelitian ini, spektrum absorbansi larutan standar kuersetin dalam pelarut metanol menunjukkan puncak serapan maksimum pada panjang gelombang 366 nm. Nilai ini sesuai dengan karakteristik senyawa flavonoid secara umum, yang diketahui memiliki dua pita serapan utama: pita B (sekitar 250-280 nm) yang berasal dari cincin benzena A, dan pita A (sekitar 350-385 nm) yang berasal dari sistem kromofor pada cincin B yang tersubstitusi (Lestari *et al.*, 2024).

Panjang gelombang 366 nm yang teridentifikasi sebagai λ_{maks} kuersetin menandakan bahwa senyawa tersebut memiliki struktur konjugasi aromatik yang kuat, yang mampu menyerap energi dalam spektrum ultraviolet secara signifikan. Nilai λ_{maks} ini juga konsisten dengan berbagai laporan literatur yang menyebutkan bahwa kuersetin memiliki λ_{maks} dalam kisaran 360-370 nm tergantung pada jenis pelarut yang digunakan (Utomo *et al.*, 2009).

Nilai λ_{maks} yang telah diperoleh ini kemudian digunakan sebagai dasar dalam pemindaian densitometri terhadap plat KLT yang telah dikembangkan dengan fase gerak optimum. Dengan menggunakan panjang gelombang ini, deteksi kuersetin pada ekstrak daun alpukat dapat dilakukan secara spesifik dan sensitif. Pemindaian pada λ_{maks} memastikan bahwa kuantifikasi dilakukan pada titik maksimum serapan senyawa, sehingga meningkatkan akurasi dan presisi pengukuran (Dahlia *et al.*, 2022).

Pemilihan panjang gelombang yang sesuai juga penting untuk menghindari gangguan dari senyawa lain yang mungkin memiliki absorbansi pada panjang gelombang berbeda. Oleh karena itu, penggunaan λ_{maks} 366 nm memberikan jaminan bahwa sinyal absorbansi yang terukur terutama berasal dari kuersetin, bukan dari senyawa lain dalam ekstrak. Hal ini mendukung validitas metode analisis yang digunakan untuk kuantifikasi kandungan kuersetin dalam ekstrak daun alpukat secara kromatografi lapis tipis densitometri.

Validasi Metode

Selektivitas

Selektivitas merupakan parameter penting dalam validasi metode analisis, yang menunjukkan kemampuan metode untuk membedakan dan secara spesifik mengidentifikasi senyawa target di tengah keberadaan senyawa lain dalam matriks kompleks, seperti ekstrak tanaman (Aryantini dan Hardini, 2024). Dalam penelitian ini, selektivitas metode dikonfirmasi melalui dua pendekatan utama: kesamaan nilai *retardation factor* (Rf) dan kesamaan spektrum serapan.

Noda kuersetin pada ekstrak daun alpukat menunjukkan nilai R_f sebesar 0,56, identik dengan nilai R_f yang diperoleh dari standar kuersetin pada sistem fase gerak yang telah dioptimalkan (kloroform:metanol:asam asetat, 8:1.5:0.5). Selain itu, spektrum serapan UV yang diperoleh dari pemindaian densitometri terhadap noda kuersetin pada ekstrak menunjukkan profil yang sangat mirip dengan spektrum dari standar kuersetin, terutama pada panjang gelombang maksimum di sekitar 366 nm. Kesesuaian ini mengindikasikan bahwa noda tersebut memang berasal dari senyawa kuersetin, bukan senyawa lain yang kebetulan memiliki R_f serupa.

Kombinasi bukti berupa kesamaan nilai R_f dan spektrum serapan UV memberikan keyakinan bahwa metode yang digunakan memiliki selektivitas tinggi dalam mengidentifikasi kuersetin di antara berbagai senyawa metabolit sekunder lain yang mungkin terdapat dalam ekstrak etanol daun alpukat. Hal ini penting, mengingat matriks ekstrak tumbuhan umumnya sangat kompleks dan terdiri dari berbagai senyawa dengan struktur kimia yang saling tumpang tindih. Oleh karena itu, selektivitas metode KLT-densitometri ini dinilai memadai untuk digunakan dalam analisis kuantitatif maupun kualitatif kandungan kuersetin dalam simplisia atau ekstrak tanaman obat.

Linearitas

Linearitas merupakan parameter validasi yang menunjukkan kemampuan metode analisis untuk memberikan hasil yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam rentang tertentu (Wahyuningsih *et al.*, 2024). Dalam penelitian ini, kurva kalibrasi kuersetin dibuat dengan menggunakan lima konsentrasi larutan standar dalam rentang 2-10 $\mu\text{g/mL}$, dan pemindaian dilakukan pada panjang gelombang maksimum 366 nm menggunakan densitometri. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat hubungan linier yang sangat kuat antara konsentrasi kuersetin dan luas area noda yang terdeteksi pada plat KLT, dengan persamaan regresi $y = 205,34x + 312,9$ dan nilai koefisien korelasi $r = 0,9987$.

Nilai koefisien korelasi (r) yang mendekati 1 menunjukkan bahwa variabel konsentrasi (x) dan respon area (y) memiliki hubungan yang hampir sempurna dalam rentang konsentrasi yang diuji (Suarantika *et al.*, 2024). Persamaan regresi tersebut juga menunjukkan bahwa metode ini mampu memberikan hasil yang konsisten dan presisi terhadap perubahan konsentrasi kuersetin, sehingga cocok untuk digunakan dalam analisis kuantitatif. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa metode KLT-densitometri yang digunakan memiliki tingkat linearitas yang sangat baik, yang merupakan prasyarat penting untuk keakuratan dan ketelusuran hasil kuantifikasi kandungan kuersetin dalam sampel ekstrak daun alpukat.

Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) merupakan parameter penting dalam validasi metode analisis, yang mencerminkan sensitivitas metode dalam mendeteksi dan mengukur senyawa target dalam konsentrasi rendah (Minarsih dan Roni, 2023). Berdasarkan perhitungan dari kurva kalibrasi kuersetin, diperoleh nilai BD sebesar 0,42 $\mu\text{g/mL}$ dan BK sebesar 1,29 $\mu\text{g/mL}$. Nilai-nilai ini menunjukkan bahwa metode kromatografi lapis tipis densitometri yang digunakan memiliki sensitivitas tinggi dan mampu mendeteksi keberadaan kuersetin meskipun dalam jumlah yang sangat kecil.

Batas deteksi merupakan konsentrasi minimum senyawa yang masih dapat dikenali keberadaannya namun belum dapat dikuantifikasi secara presisi, sedangkan batas kuantitasi adalah konsentrasi minimum senyawa yang dapat diukur secara kuantitatif dengan akurasi dan presisi yang memadai. Nilai BD dan BK yang rendah ini memperkuat bukti bahwa metode analisis yang digunakan sangat sesuai untuk pengujian senyawa kuersetin dalam sampel ekstrak yang umumnya memiliki kompleksitas tinggi dan kadar senyawa aktif yang bervariasi (Primadiastri *et al.*, 2021). Oleh karena itu, metode ini tidak hanya selektif dan linier, tetapi juga memiliki kepekaan yang memadai untuk aplikasi dalam penapisan atau pengawasan mutu sediaan herbal yang mengandung kuersetin.

Akurasi dan Presisi

Akurasi dan presisi merupakan parameter esensial dalam validasi metode analisis untuk memastikan bahwa metode mampu menghasilkan data yang benar (akurat) dan konsisten (presisi) (Andayani *et al.*, 2024). Uji akurasi dilakukan melalui pengujian pemulihan (*recovery test*) dengan cara menambahkan standar kuersetin ke dalam sampel ekstrak daun alpukat pada tiga level konsentrasi, yaitu 80%, 100%, dan 120% dari kadar teoritis. Hasil uji *recovery* menunjukkan persentase pemulihan sebesar 98,76%, 101,32%, dan 99,87% secara berturut-turut, yang semuanya berada dalam rentang yang dapat diterima secara internasional (95-105%). Hasil ini membuktikan bahwa metode yang digunakan mampu mengukur kuersetin secara tepat dalam matriks kompleks ekstrak tanaman.

Presisi metode dinyatakan dalam bentuk persentase *relative standard deviation* (%RSD), yang mengukur variasi hasil antara pengulangan pengukuran. Pengujian presisi dilakukan secara *intra-day* (dalam hari yang sama) dan *inter-day* (antar hari yang berbeda). Hasil %RSD sebesar 1,94% untuk *intra-day* dan 2,31% untuk

inter-day menunjukkan bahwa variasi pengukuran sangat rendah dan konsisten. Nilai %RSD ini berada jauh di bawah batas maksimum yang ditetapkan dalam pedoman validasi analisis, yaitu <5%, sehingga dapat disimpulkan bahwa metode ini sangat presisi.

Secara keseluruhan, nilai pemulihan yang mendekati 100% dan nilai %RSD yang rendah menunjukkan bahwa metode KLT-densitometri yang digunakan untuk analisis kuersetin dalam ekstrak daun alpukat telah memenuhi kriteria akurasi dan presisi yang dipersyaratkan dalam validasi metode analisis fitokimia.

Penetapan Kadar Kuersetin dalam Ekstrak Daun Alpukat

Penetapan kadar kuersetin dilakukan pada ekstrak daun alpukat yang dipanen pada tiga waktu berbeda. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Kadar kuersetin dalam ekstrak daun alpukat

Waktu Panen	Kadar Kuersetin (mg/g BK)	Keterangan
Pagi (± 06.00)	$3,12 \pm 0,08$	Terendah
Siang (± 12.00)	$5,84 \pm 0,12$	Tertinggi
Sore (± 16.00)	$4,26 \pm 0,10$	Sedang

Hasil penetapan menunjukkan perbedaan kadar yang signifikan tergantung pada waktu panen. Penetapan kadar kuersetin dalam ekstrak daun alpukat menunjukkan adanya variasi konsentrasi yang signifikan antar waktu panen. Berdasarkan hasil analisis, daun yang dipanen pada siang hari (± 12.00) menghasilkan kadar kuersetin tertinggi sebesar $5,84 \pm 0,12$ mg/g, diikuti oleh panen sore ($4,26 \pm 0,10$ mg/g), dan yang terendah adalah panen pagi ($3,12 \pm 0,08$ mg/g). Nilai-nilai ini menunjukkan bahwa waktu panen secara nyata mempengaruhi kandungan senyawa aktif kuersetin dalam daun alpukat.

Hasil ini diperkuat oleh analisis varians satu arah (ANOVA) yang menunjukkan perbedaan kadar kuersetin antar waktu panen adalah signifikan secara statistik ($p < 0,05$). Uji lanjut menggunakan Tukey HSD mengindikasikan bahwa kelompok siang hari memiliki perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan kelompok pagi dan sore. Ini berarti bahwa siang hari merupakan waktu panen yang paling optimal untuk mendapatkan kuersetin dalam konsentrasi tertinggi.

Secara fisiologis, temuan ini konsisten dengan pemahaman bahwa biosintesis flavonoid, termasuk kuersetin, sangat dipengaruhi oleh paparan cahaya matahari, terutama sinar UV. Intensitas cahaya yang tinggi pada siang hari dapat merangsang aktivitas enzim fenilalanin amonia liase (PAL), yang merupakan enzim kunci dalam jalur biosintesis fenilpropanoid dan flavonoid. Aktivasi enzim ini akan meningkatkan produksi kuersetin sebagai senyawa antioksidan alami dalam jaringan tanaman, terutama sebagai respons terhadap stres oksidatif akibat paparan cahaya (Hasan *et al.*, 2017).

Sementara itu, kadar kuersetin yang rendah pada daun yang dipanen pagi hari dapat dikaitkan dengan rendahnya aktivitas enzimatis pada saat intensitas cahaya masih minimal. Adapun penurunan kadar kuersetin pada sore hari meskipun intensitas cahaya cukup tinggi sebelumnya, diduga disebabkan oleh proses degradasi termal atau fotooksidatif yang terjadi seiring lamanya paparan sinar matahari. Kuersetin diketahui relatif tidak stabil terhadap suhu tinggi dan paparan sinar UV berkepanjangan, sehingga kandungannya bisa menurun menjelang akhir hari (Rohmah dan Yuanita, 2022).

Hasil ini selaras dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa waktu panen memiliki pengaruh langsung terhadap kandungan metabolit sekunder tanaman. Penelitian terhadap tanaman *Camellia sinensis* dan *Ocimum sanctum* menunjukkan bahwa kadar flavonoid lebih tinggi ketika daun dipanen pada siang hari dibandingkan pagi atau sore. Penelitian lain juga mendukung temuan tersebut. Studi pada *Rheum khorasanicum* menunjukkan bahwa ekstrak yang dikumpulkan pada bulan April memiliki kandungan fenolik dan flavonoid total tertinggi, serta aktivitas antioksidan yang lebih signifikan dibandingkan panen pada bulan lainnya (Mehrabani *et al.*, 2023). Selain itu, penelitian terhadap *Glycyrrhiza glabra* (akar licorice) mengungkapkan bahwa waktu panen dan lokasi budidaya berpengaruh kuat terhadap profil metabolit khusus, terutama flavanon dan dehidrostilben, yang berdampak pada aktivitas antioksidan dan antiaging ekstraknya (Docimo *et al.*, 2024). Oleh karena itu, waktu panen merupakan parameter penting yang harus dipertimbangkan dalam standarisasi mutu bahan baku herbal, terutama bila tujuan utamanya adalah untuk memperoleh senyawa aktif dalam konsentrasi optimal (Anjarsari, 2022).

Temuan ini tidak hanya memberikan informasi ilmiah yang relevan, tetapi juga memiliki implikasi praktis. Industri herbal dan fitofarmaka yang memanfaatkan daun alpukat sebagai bahan baku dapat mengatur waktu panen secara spesifik untuk meningkatkan kualitas produk akhir. Selain itu, hasil ini juga penting dalam

pengembangan prosedur standar operasional (SOP) budidaya dan pascapanen tanaman obat berbasis bukti ilmiah.

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil menunjukkan bahwa waktu panen berpengaruh signifikan terhadap kadar kuersetin dalam daun alpukat (*Persea americana* Mill.). Analisis menggunakan metode KLT-densitometri yang telah tervalidasi menunjukkan bahwa daun yang dipanen pada siang hari memiliki kadar kuersetin tertinggi ($5,84 \pm 0,12$ mg/g bahan kering) dibandingkan pagi dan sore hari. Temuan ini menegaskan bahwa siang hari merupakan waktu panen optimal untuk memperoleh kadar kuersetin maksimal. Metode KLT-densitometri terbukti valid, selektif, dan andal untuk analisis kuersetin, serta layak digunakan dalam skala laboratorium maupun industri herbal kecil. Namun, penelitian ini belum mempertimbangkan faktor lingkungan lain yang dapat memengaruhi kadar senyawa, sehingga studi lanjutan diperlukan untuk mengkaji variabel tersebut secara lebih komprehensif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Program Studi Farmasi Universitas Ma Chung, khususnya Laboratorium Fitokimia dan UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, atas dukungan fasilitas dan bahan kimia selama pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, V., Gunawan, S., 2019. Uji fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak mentimun (*Cucumis sativus*). *Tarumanagara Med. J.* 1:62–667. <https://doi.org/10.24912/tmj.v2i1.5844>
- Andayani, R., Andira, R.P., Armin, F., 2024. Optimasi dan Validasi Metode KLT-Densitometri Fase Terbalik untuk Analisis Oksibenzon dalam Losion Tabir Surya. *Indones. J. Pharm. Sci. Technol.* 11:323–331. <https://doi.org/10.24198/ijpst.v11i3.43555>
- Anjarsari, I.R.D., 2022. Rekayasa budidaya dan penanganan pascapanen untuk meningkatkan kualitas teh Indonesia sebagai minuman fungsional kaya antioksidan. *Kultivasi.* 21: 152–158. <https://doi.org/10.24198/kultivasi.v21i2.36027>
- Aryantini, D., Hardini, P., 2024. Penetapan Kandungan Kurkumin secara KLT Densitometri Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) Berdasarkan Perbedaan Tempat Tumbuh. *KUNIR J. Farm. Indones.* 2: 30–36. <https://doi.org/10.36308/kjfi.v2i2.715>
- Batiha, G.E.-S., Beshbishy, A.M., Ikram, M., Mulla, Z.S., El-Hack, M.E.A., Taha, A.E., Algamal, A.M., Elewa, Y.H.A., 2020. The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. *Foods* 9:374. <https://doi.org/10.3390/foods9030374>
- Collignon, T.E., Webber, K., Piasecki, J., Rahman, A.S.W., Mondal, A., Barbalho, S.M., Bishayee, A., 2024. Avocado (*Persea americana* Mill) and its phytoconstituents: potential for cancer prevention and intervention. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 64:13072–13092. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2260474>
- da Silva, V.A.P., Abboud, R. de S., Contreiras, E.C., Boaventura, G.T., Chagas, M.A., 2023. Avocado Oil (*Persea americana*) Reduces Epithelial Proliferation on Benign Prostatic Hyperplasia. *J. Am. Nutr. Assoc.* 42:783–789. <https://doi.org/10.1080/27697061.2023.2179552>
- Dahlia, A.A., Amima, N.Q., Arum, A.R., Syarif, R.A., Ahmad, A.R., 2022. Kadar Fenolik Dan Flavonoid Total Dalam Ekstrak Metanol Daun Cemba (*Acacia rugata* (Lam.) Fawc. Rendle). *J. Fitofarmaka Indones.* 9:15–19. <https://doi.org/10.33096/jffi.v9i1.808>
- Djoko, W., Taurhesia, S., Djamil, R., Simanjuntak, P., 2020. Standardisasi Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella asiatica*). *Sainstech Farma J. Ilmu Kefarmasian* 13:118–123. <https://doi.org/10.37277/sfj.v13i2.765>
- Docimo, T., Celano, R., Lambiase, A., Di Sanzo, R., Serio, S., Santoro, V., Coccetti, P., Russo, M., Rastrelli, L., & Piccinelli, A. L. 2024. Exploring influence of production area and harvest time on specialized metabolite content of *Glycyrrhiza glabra* leaves and evaluation of antioxidant and anti-aging properties. *Antioxidants.* 13(1):93. <https://doi.org/10.3390/antiox13010093>
- Fajriaty, I., Ih, H., Andres, A., Setyaningrum, R., 2018. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis dari Ekstrak Etanol Daun Bintangur (*Calophyllum soulattri* Burm. F.). *J. Pendidik. Inform. Dan Sains.* 54–67. <https://doi.org/10.31571/saintek.v7i1.768>

- Handayani, S.N., Purwanti, A., Windasari, W., Ardian, M.N., 2020. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kencana Ungu (*Ruellia tuberosa* L.). *Walisongo J. Chem.* 3:66–70. <https://doi.org/10.21580/wjc.v3i2.6119>
- Hasan, F., Aziz, S.A., Melati, M., 2017. Perbedaan Waktu Panen Daun terhadap Produksi dan Kadar Flavonoid Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). *J. Hortik. Indones. JHI* 8:136–145. <https://doi.org/10.29244/jhi.8.2.136-145>
- Hosseini, A., Razavi, B.M., Banach, M., Hosseinzadeh, H., 2021. Quercetin and metabolic syndrome: A review. *Phytother. Res. PTR* 35:5352–5364. <https://doi.org/10.1002/ptr.7144>
- Jennings, A., Thompson, A.S., Tresserra-Rimbau, A., O'Neill, J.K., Hill, C., Bondonno, N.P., Kühn, T., Cassidy, A., 2024. Flavonoid-Rich Foods, Dementia Risk, and Interactions With Genetic Risk, Hypertension, and Depression. *JAMA Netw. Open* 7:e2434136. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2024.34136>
- Kartikasari, D., Rahman, I.R., Ridha, A., 2022. Uji Fitokimia pada Daun Kesum (*Polygonum minus* Huds.) dari Kalimantan Barat. *J. Insan Farm. Indones.* 5:35–42. <https://doi.org/10.36387/jifi.v5i1.912>
- Kowalska, T., Sajewicz, M., 2022. Thin-Layer Chromatography (TLC) in the Screening of Botanicals—Its Versatile Potential and Selected Applications. *Molecules* 27:6607. <https://doi.org/10.3390/molecules27196607>
- Lestari, D., Syamsul, E.S., Mentari, I.A., 2024. Penetapan Kadar Rutin pada Ekstrak Etanol Daun Pidada Merah (*Sonneratia caseolaris*) dengan KLT Densitometer. *J. Ris. Kefarmasian Indones.* 6: 467–478. <https://doi.org/10.33759/jrki.v6i3.559>
- Makarova, K., Sajkowska-Kozielewicz, J.J., Zawada, K., Olchowik-Grabarek, E., Ciach, M.A., Gogolewski, K., Dobros, N., Ciechowicz, P., Freichels, H., Gambin, A., 2021. Harvest time affects antioxidant capacity, total polyphenol and flavonoid content of Polish St John's wort's (*Hypericum perforatum* L.) flowers. *Sci. Rep.* 11:3989. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83409-4>
- Mehrabani, M., Raeiszadeh, M., Yazdinezhad, A., Sadeghi, S., & Jahanbakhsh, S. 2023. The influence of harvest time on total phenolic and flavonoid content, antioxidant, antibacterial, and cytotoxic potential of *Rheum khorasanicum*. *BMC Complementary Medicine and Therapies.* 23(1): 447. <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04216-0>
- Minarsih, T., Roni, A., 2023. Validasi dan Analisis Allopurinol dan Deksamethason pada Jamu Pegal Linudi Kabupaten Semarang dengan KLT dan Spektrofotometri UV-Vis. *J. Sains Dan Kesehat.* 5:75–82.
- Nugrahani, R., Andayani, Y., Hakim, A., 2016. Skrining Fitokimia dari Ekstrak Buah Buncis (*Phaseolus vulgaris* L) dalam Sediaan Serbuk. *J. Penelit. Pendidik. IPA* 2. <https://doi.org/10.29303/jppipa.v2i1.38>
- Primadiastri, I.Z., Wulansari, E.D., Suharsanti, R., 2021. Perbandingan Kandungan Fenolik Total, Flavonoidtotal dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Bol (*Syzigium malaccense* L.) dan Daun Jambu Air Kancing (*Syzigium aqueum*). *Media Farm. Indones.* 16: 1170–1676. <https://doi.org/10.53359/mfi.v16i2.180>
- Puspa, O.E., Syahbanu, I., Wibowo, M.A., 2017. Uji Fitokimia dan Toksisitas Minyak Atsiri Daun Pala (*Myristica fragans* Houtt) dari Pulau Lemukutan. *J. Kim. Khatulistiwa* 6:12-24.
- Qaderi, M.M., Martel, A.B., Strugnell, C.A., 2023. Environmental Factors Regulate Plant Secondary Metabolites. *Plants.* 12:447. <https://doi.org/10.3390/plants12030447>
- Rohmah, U.N., Yuanita, L., 2022. The Effect of Harvest Time on Total Flavonoid Content and Anti-Inflammatory Activities of Yacon Leaf Ethanol Extract (*Smallanthus sonchifolius*). *Unesa J. Chem.* 11: 136–142. <https://doi.org/10.26740/ujc.v11n2.p136-142>
- Rollando, R., Ardanareswari, A., Susanto, F.H., Monica, E., 2022. Efek Afrodisiaka dari Ekstrak Batang Bajakah Kalalawit (*Uncaria gambir* Roxb.) terhadap Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus novergicus*). *J. Pharmascience* 9:213–224. <https://doi.org/10.20527/jps.v9i2.13289>
- Rollando, R., Embang, E.D., Monica, E., 2019. Penetapan Kadar Fenilbutazon dan Parasetamol didalam Jamu Pegal Linu yang Beredar di Kota Malang secara Kromatografi Lapis Tipis Densitometri. *J. Insan Farm. Indones.* 2:126–138.
- Rustanti, E., Lathifah, Q., 2019. Identifikasi Senyawa Kuersetin dari Fraksi Etil Asetat Ekstrak Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.). *ALCHEMY* 6(38). <https://doi.org/10.18860/al.v6i2.6768>
- Septiadi, T., Pringgenies, D., Radjasa, O.K., 2013. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antijamur Ekstrak Teripang Keling (*Holothuria atra*) Dari Pantai Bandengan Jepara Terhadap Jamur *Candida albicans*. *J. Mar. Res.* 2: 76–84. <https://doi.org/10.14710/jmr.v2i2.2355>

- Setiawan, H.K., Kahar, N.M., Stephanie, S., Sukarti, E., 2020. Validasi Metode Identifikasi Sildenafil Sitrat, Tadalafil dan Fenilbutazon dalam Jamu Obat Kuat Secara Kromatografi Lapis Tipis – Densitometri. *J. Farm. Sains Dan Terap. J. Pharm. Sci. Pract.* 7:1–7. <https://doi.org/10.33508/jfst.v7i1.2389>
- Suarantika, F., Akbar, N.H., Patricia, V.M., 2024. Validasi Metode Analisis Senyawa Metabolit Sekunder pada *Moringa Oleifera* Lam., dan *Eucalyptus Globulus* Labill. *J. Inkofar* 8. <https://doi.org/10.46846/jurnalinkofar.v8i1.330>
- Sudjarwo, S., Alfi, M., Annuryanti, F., 2019. Validation and Development of TLC-Densitometry Method For Standardization Of Soursop Leaf Extract (*Annona Muricata* Linn.) with Quercetin. *J. Pharm. Sci.* 10:686. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(2\).686-91](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(2).686-91)
- Utomo, A.D., Rahayu, W.S., Dhiani, B.A., 2009. Pengaruh beberapa Metode Pengeringan terhadap Kadar Flavonoid Total Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata*). *Pharm. J. Farm. Indones.* <https://doi.org/10.30595/pharmacy.v6i01.402>
- Wahyuningsih, E., Amannillah, V.L.P., Febriananda, G., Aliyyah, Z.N., Wijatmoko, F.A.Z., 2024. Optimasi Metode dan Penentuan Batas Deteksi untuk Analisis Kadar Fukosantin dalam *Sargassum ilicifolium* (Turner) C.Agardh Menggunakan KLT-Densitometri. *Camellia Clin. Pharm. Anal. Pharm. Community J.* 3: 171–179. <https://doi.org/10.30651/cam.v3i1.22837>
- Wardani, T.K., Ahwan, Qonitah, F., 2024. Penetapan Kadar Kuersetin Ekstrak Etanol Pada Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L) Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *J. Farm. Sains Dan Teknol.* 2:13–23.
- Wijaya, A., Noviana, N., 2022. Penetapan Kadar Air Simplisia Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) Berdasarkan Perbedaan Metode Pengeringan. *J. Ris. Kefarmasian Indones.* 4:185–194. <https://doi.org/10.33759/jrki.v4i2.246>