

Pengaruh Proses Pemanasan Terhadap Kandungan Rutin Pada Daun Singkong

The Effect Of The Heating Process On Rutin Content In Cassava Leaves

Winasih Rachmawati^{1*}, Anne Yuliantini¹, Ade Kurnia Saeful¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana, Bandung, Jawa Barat, Indonesia

*Email: winasih.rachmawati@bku.ac.id

ABSTRAK

Daun singkong diketahui mengandung rutin sebagai senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Telah dilakukan penelitian untuk mengevaluasi pengaruh perbedaan pengolahan daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) terhadap kandungan rutin. Adapun pengolahan daunnya adalah sebagai berikut: segar, dikukus dan direbus kemudian masing-masing ditetapkan kadar rutin di dalamnya dengan menggunakan spektrofotometer sinar tampak setelah dikompleksasi dengan aluminium klorida. Prosedur yang dilakukan telah divalidasi untuk larutan standar menunjukkan linieritas ($r > 0,99$) dengan batas deteksi dan batas kuantifikasi masing-masing sebesar 0,66 dan 2,21 $\mu\text{g/mL}$. Metode validasi spektrofotometri tampak untuk kuantifikasi rutin pada daun singkong memenuhi persyaratan linieritas, sensitif, presisi, spesifik, dan akurat. Kadar rutin pada daun singkong segar, kukus dan rebus masing-masing adalah 1,94, 1,7 dan 1,22% b/b. Dapat disimpulkan bahwa pengolahan daun singkong dapat menurunkan kadar rutin.

Kata Kunci : daun singkong, pengolahan, rutin, spektrofotometri sinar tampak

ABSTRACT

*Casava leaves is known containing rutin as bioactive compound as antioxidant. A study was carried out to evaluate the effect of differently processed of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves on rutin content. The processed leaves were as follows: fresh, steam and boiled, then the rutin levels is determined by a visible spectrophotometer after complexation with aluminum chloride. The procedure validated for standards showed linearity ($r > 0.99$) with limit of detection and limit of quantification 0.66 and 2.21 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Spectrophotometry visible method for the quantification of rutin in the casava leaves was linear, sensitive, precise, specific, and accurate. The rutin levels in fresh, steamed and boiled*

cassava leaves were 1.94, 1.7 and 1.22 % w/w respectively. It can be concluded that the processing of cassava leaves can reduce the levels of rutin.

Keywords : *casava leaves, rutin, processing, spectrophotometry*

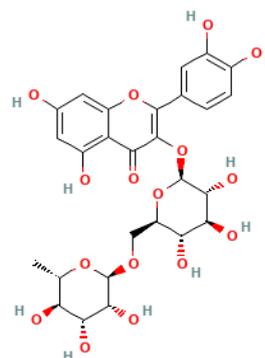
Corresponding Author: Winasih Rachmawati

Address: Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana

Email: winasih.rachmawati@bku.ac.id

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki potensi sumber daya alam baik flora maupun fauna, yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber pangan. Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan makanan adalah tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz) atau ketela pohon atau ubi kayu yang termasuk ke dalam famili Euphorbiaceae. Bagian tanaman singkong yang biasa dimanfaatkan masyarakat adalah bagian umbinya, bagian daunnya masih terbatas sebagai sayuran terutama kuncup muda, dan daun bagian bawah digunakan sebagai pakan ternak. Daun singkong diketahui memiliki kandungan senyawa aktif flavonoid dan fenolik. Salah satu senyawa flavonoid yang terkandung di dalam daun singkong adalah rutin (1).



Gambar 1. Struktur kimia rutin (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280805#section=2D-Structure>)

Rutin berupa serbuk hablur halus berwarna kuning pucat dan mengandung tidak kurang dari 95% dan tidak lebih dari 100,5% $C_{27}H_{30}O_{16}$ dihitung terhadap zat anhidrat.

Rutin termasuk ke dalam golongan flavonoid kuersetin dengan ikatan gula rutinosa sehingga mempunyai nama lain kuersetin-3-rutinosida. Rutin dapat dengan mudah terdegradasi karena reaksi hidrolisis menjadi aglikonnya yaitu kuersetin (2).

Rutin diketahui mempunyai aktivitas sebagai antikanker, antimikroba, antidiabetes, melindungi kerusakan organ tubuh dan antioksidan (3,4). Rutin dapat mempengaruhi oksidasi dari minyak. Sedangkan berdasarkan penelitian Puspitarini, rutin dalam daun singkong mempunyai aktivitas antioksidan dengan nilai EC_{50} sebesar 4,617 mg/ml. Beberapa penelitian terkait sifat antioksidan rutin ini telah dilakukan oleh Lee et.al. (2016) yang telah melakukan kombinasi rutin dengan kuersetin untuk mengurangi oksidasi tokoferol. Al Amin dkk (2017) juga telah melakukan perbandingan aktivitas antioksidan rutin dengan BHA dan mengategorikan rutin sebagai antioksidan kuat. (4-7). Antioksidan dapat meredam oksidasi dalam tubuh dengan cara memberikan satu elektron kepada radikal bebas sehingga menghambat pembentukan radikal bebas yang berantai. Kandungan rutin dalam daun singkong dapat berbeda berdasarkan tempat tumbuh, waktu panen, pemupukan dan pengolahan. Oleh karena itu pada penelitian ini perlu dilakukan analisis rutin pada daun

singkong setelah mengalami pengolahan untuk mengetahui apakah terdapat penurunan kandungan rutin setelah dilakukan pengolahan.

Berbagai metode telah digunakan untuk menganalisis rutin dalam bahan alam, diantaranya KLT densitometri (8), kromatografi cair kinerja tinggi (1,5,9,10), dan spektrofotometri sinar tampak (11). Metode spektrofotometri dengan penambahan pereaksi geser seperti aluminium klorida dapat digunakan karena metode ini selektif untuk analisis flavonoid. Selain itu metodenya mudah digunakan dan preparasi sampelnya juga lebih sederhana.

Penelitian ini bertujuan menentukan kadar rutin pada daun singkong serta mempelajari pengaruh pemanasan (direbus, dikukus) terhadap kandungan rutin tersebut menggunakan metode spektrofotometri sinar tampak dengan penambahan pereaksi geser.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi: daun singkong, rutin

(Merck), aluminium klorida (Bratachem), natrium asetat (Merck), serbuk magnesium, asam klorida, etanol 96%, amil alkohol, dan akuades. Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi: spektrofotometer ultraviolet-visibel (*Shimadzu UV-1800*), kuvet kuarsa, neraca analitik (*Mettler toledo*), volume pipet, kertas saring dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Persiapan dan Pengolahan Sampel

Daun singkong diperoleh dari daerah Kabupaten Bandung Barat yang dipanen pada umur tiga bulan. Selanjutnya daun dibersihkan terlebih dahulu dan dicuci dengan air mengalir sampai tidak terdapat lagi kotoran yang melekat. Daun singkong diangin-anginkan selama enam jam hingga layu, kemudian diberikan dua perlakuan yang berbeda. Pertama sampel dikukus selama 30 menit kemudian dirajang. Sedangkan perlakuan kedua, daun singkong direbus selama 30 menit pada suhu 100°C kemudian dirajang.

Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 1 gram daun singkong segar di masukan ke dalam gelas kimia lalu dimasukkan air panas sebanyak 100 ml, didiamkan dan saring dengan waktu 5 menit. Sebanyak 5 ml filtrat ditambahkan serbuk magnesium dan 2 ml asam klorida-etanol dengan perbandingan (1:1), selanjutnya dikocok tambahkan amil alkohol 10 ml, reaksi positif jika terbentuk warna jingga, kuning atau merah pada lapisan amil alkohol (12).

Larutan Aluminium Klorida 10%

Aluminium klorida 2,5 g dilarutkan akuades di dalam labu 25 ml kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas, lalu homogenkan.

Larutan Natrium Asetat 1 M

Natrium asetat 2,05 g dilarutkan akuades dalam labu ukur 25 mL, dihomogenkan kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas.

Pembuatan Larutan Induk Rutin 100 µg/ml

Sejumlah 50 mg rutin ditambahkan dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dengan etanol 96% hingga tanda batas. Larutan tersebut diencerkan 10 kali hingga didapatkan konsentrasi 100 µg/ml.

Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum Rutin

Sebanyak 2,0 mL dari larutan induk rutin dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml lalu ditambahkan dengan etanol 96 % sampai tanda batas. Larutan tersebut dipipet sebanyak 1 ml lalu ditambahkan 1,5 ml etanol 96 %, 0,1 ml AlCl₃ 10 %, 0,1 ml natrium asetat 1 M dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian digenapkan dengan akuades hingga tanda batas dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400-800 nm (13).

Pembuatan Larutan Kerja Rutin

Larutan kerja rutin dengan rentang 2-7 µg/ml dibuat dengan cara dipipet sejumlah volume larutan induk sebanyak 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 serta 0,7 ml, masukkan kedalam labu ukur

10 ml. Ke dalam setiap labu tambahkan 1,5 ml etanol, 0,1 ml aluminium klorida 10 %, 0,1 ml natrium asetat 1 M dan ditambahkan akuades sampai tanda batas.

Validasi Metode Analisis

Parameter validasi yang dilakukan meliputi: selektivitas, linieritas, batas deteksi dan kuantisasi, akurasi dan presisi.

1. Uji selektivitas

Pada pengujian ini dibuat tiga larutan dengan komposisi sesuai Tabel 1 berikut:

Tabel 1. Larutan uji selektivitas

Larutan	Perlakuan
1	AlCl ₃ + Na Asetat
2	Rutin + Na asetat
3	Rutin + AlCl ₃ + Na Asetat

Masing-masing larutan diukur pada rentang 200-800 nm. Hasil spektrum *dioverlay* untuk melihat perbedaan panjang gelombang serapan maksimumnya. Spektrum hasilnya terlihat pada rentang 240-285 nm (pita II) dan 300-550 nm (pita I) maka analit merupakan senyawa flavonoid dan selanjutnya dilakukan penambahan pereaksi geser aluminium klorida dan natrium asetat

lalu diamati pergeseran panjang gelombang maksimum sesudah dilakukan penambahan pereaksi geser.

2. Linearitas

Larutan kerja diukur serapannya menggunakan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang serapan maksimum rutin. Absorbansi yang didapat diinterpolasikan terhadap konsentrasi kemudian dibuat persamaan liniernya. Nilai r dari persamaan tersebut menggambarkan linieritas.

3. Uji Sensitivitas

Uji sensitivitas meliputi penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. dihitung dari data kurva kalibrasi dengan rumus sebagai berikut:

$$BD = \frac{3 (Sy/x)}{b}$$

$$BK = \frac{10 (Sy/x)}{b}$$

4. Uji Perolehan Kembali

Uji perolehan kembali dilakukan menggunakan metode standar adisi dengan cara menambahkan larutan baku terhadap sampel. Larutan sampel dibuat dengan cara sebagai berikut:

Sebanyak 10 g daun singkong segar digerus dengan 50 mL etanol 96%, filtratnya dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan digenapkan dengan etanol 96% hingga tanda batas.

Akurasi

Larutan sampel diambil sebanyak 0,1 mL kemudian ditambahkan larutan induk rutin sebanyak 0,15; 0,2 dan 0,25 ml yang masing-masing dimasukkan dalam labu ukur 10 ml. Kemudian ditambahkan larutan $AlCl_3$ 10% sebanyak 0,1 ml dan larutan natrium asetat 1 M sebanyak 0,1 ml dan genapkan dengan akuades hingga tanda batas. Larutan tersebut dianalisis pada panjang gelombang serapan maksimum. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali.

Persen perolehan kembali (%Recovery) dapat ditentukan dengan rumus:

$$\%Recovery = \frac{\text{Kadar terukur}}{\text{Kadar teoritis}} \times 100\%$$

Presisi

Larutan sampel diambil sebanyak 0,1 mL kemudian ditambahkan 0,2 mL larutan induk rutin kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Larutan AlCl_3 10% ditambahkan sebanyak 0,1 mL dan larutan natrium asetat 1M sebanyak 0,1 mL genapkan dengan akuades hingga tanda batas. Larutan tersebut dianalisis pada panjang gelombang serapan maksimum. Pengulangan dilakukan sebanyak 6 kali. Presisi *interday* dilakukan pengulangan pada hari berbeda selama tiga hari.

Uji presisi (keseksamaan) ditentukan dengan parameter SBR (Simpangan Baku Relatif) dengan rumus:

$$\%SBR = \frac{SB}{\bar{X}} \times 100 \%$$

Ket.: SBR = Simpangan Baku Relatif

SB = Simpangan Baku

\bar{X} = Kadar rata-rata sampel

Penetapan Kadar Sampel

Sampel daun singkong yang segar, dikukus dan direbus, masing-masing ditimbang sebanyak 10 g kemudian digerus dengan 50 mL etanol 96%, filtratnya dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan digenapkan dengan

etanol 96% hingga tanda batas. Sebanyak 0,1 mL larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian ditambahkan 1,5 mL etanol, AlCl_3 10% sebanyak 0,1 mL dan natrium asetat 1M sebanyak 0,1 mL kemudian tambahkan akuades hingga tanda batas. Larutan diukur menggunakan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang serapan maksimum dan perlakuan diulang masing-masing sebanyak tiga kali. Kadar senyawa rutin ditentukan dengan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi. Hasil yang diperoleh diperhitungkan dengan faktor pengenceran sehingga diperoleh konsentrasi rutin yang terdapat dalam ekstrak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Usia tanaman mempengaruhi terhadap kandungan senyawa di dalamnya. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan daun singkong yang dipanen pada usia tiga bulan (muda) karena berdasarkan hasil penelitian Bahruddin dkk mengemukakan bahwa daun singkong muda mengandung rutin lebih besar (0,71% b/b) dibandingkan

yang berusia muda dan yang berdaun kuning. Kandungan rutin dalam daun singkong juga dipengaruhi oleh usia tanaman, warna daun, ketebalan daun, besar tangkai, dan letak daun (14).

Hasil pemeriksaan flavonoid pada sampel daun singkong terbentuk warna merah pada lapisan amil alkohol, hal ini menunjukkan bahwa di dalam sampel mengandung flavonoid (15).

Pada penentuan panjang gelombang maksimum digunakan larutan baku 2 µg/mL yang telah ditambahkan AlCl₃ dan natrium asetat dianalisis menggunakan spektrofotometri sinar tampak sehingga diperoleh panjang gelombang 410 nm.

Validasi Metode Analisis

Pengujian selektivitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu metode analisis dalam mengukur rutin tanpa adanya pengaruh dari komponen lain di dalam daun singkong.

Larutan AlCl₃ digunakan sebagai pereaksi geser yang spesifik untuk flavonoid (11).

Penentuan kandungan rutin dalam penelitian ini menggunakan metode kolorimetri dengan pereaksi AlCl₃. Prinsip metode ini adalah AlCl₃ membentuk kompleks yang stabil dengan gugus keto C4, kemudian dengan gugus hidroksil C3 atau C5 dari flavon dan flavonol. Selain itu, aluminium klorida membentuk kompleks asam-stabil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (16).

Tabel 2. Data Panjang gelombang dan Pergeseran Panjang gelombang

Perlakuan	Panjang gelombang	
	Pita II	Pita I
AlCl ₃ + Na Asetat	-	-
Rutin + Na asetat	280	369
Rutin + AlCl ₃ + Na Asetat	285	414

Dari tabel 2 tersebut diketahui pada penambahan aluminium klorida dan natrium asetat menghasilkan serapan maksimum pita I pada 414nm berarti terjadi pergeseran batokromik sebesar 45 nm. Serapan maksimum pada pita II terdapat di Panjang gelombang 285

nm, sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah batokromik sebesar 5 nm.

Rutin adalah turunan dari flavonoid yang akan memberikan respons dua panjang gelombang maksimum karena terdapat dua cincin yaitu sinamoil (pita I) dan benzoil (pita II). Adanya pergeseran pada pita I dan II tersebut menunjukkan adanya gugus keto pada C3 dan gugus OH pada C3' yang membentuk kompleks gugus hidroksi-keto dengan $AlCl_3$ (16,17). Hasil validasi metode pada Tabel 3 diketahui yang telah dilakukan telah memenuhi syarat ICH. Data regresi linier pada kurva kalibrasi menunjukkan linieritas yang baik untuk analisis rutin dengan hasil $r = 0,9972$ dan nilai koefisien variasi fungsi di bawah 2% (18,19). Batas deteksi dan kuantitasi diperoleh hasil berturut-turut sebesar $0,66 \mu\text{g/ml}$ dan $2,21 \mu\text{g/ml}$. Batas terendah yang diperoleh untuk metode yang digunakan memungkinkan untuk mengkonfirmasi prosedur analitis yang dilakukan menunjukkan sensitivitas metode yang digunakan

untuk analisis rutin dalam daun singkong.

Tabel 3. Hasil Parameter Validasi

Parameter	Nilai
Persamaan regresi linier ($2-7 \mu\text{g/mL}$)	$y = 0,0729x + 0,1222$
Koefisien korelasi (r)	0,9972
Simpangan baku residual (Sy/x)	0,0161
Koefisien variansi regresi ($Vx0$)	0,049 %

Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran. Pada pengujian dilakukan dengan menggunakan standar adisi. Akurasi dari rutin yang ditambahkan pada sampel dilakukan pada tiga konsentrasi yang berbeda diperoleh perolehan Kembali (recovery) 100,88, 104,57 dan 109,97%. Rentang kesalahan yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dengan kadar bpj pada rentang 80-110% (18).

Presisi menyatakan metode analisa yang teliti akan memberikan hasil pengukuran tetap pada setiap waktu dari sampel yang sama. Presisi

dilakukan selama tiga hari masing-masing dilakukan enam kali pengulangan. Dari Tabel 4 diketahui nilai simpangan baku relatif (%SBR) memenuhi syarat dengan nilai di bawah 2% (18).

Tabel 4 Hasil uji presisi rutin dalam sampel

Replikasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) pada hari ke-		
	1	2	3
1	4,3480	4,2502	4,3235
2	4,2869	4,2013	4,2380
3	4,2624	4,2380	4,2624
4	4,3113	4,2991	4,2380
5	4,2869	4,2258	4,2380
6	4,2747	4,2136	4,3235
Rata - Rata	4,2950	4,2380	4,2706
SB	0,0305	0,0345	0,0420
SBR(%)	0,71	0,81	0,98

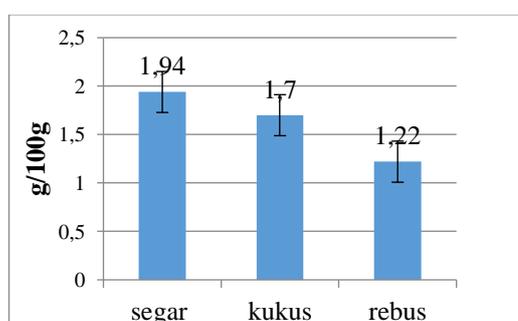
Rutin merupakan senyawa antioksidan alami yang kemampuan oksidasinya setara dengan butil hidroksi anisol yaitu sebagai antioksidan kuat (6). Mekanisme oksidasi rutin terjadi pada substituen hidroksi di posisi 3', 4' cincin B memberikan 2 elektron dan proton (20).

Daun singkong biasanya dijadikan lalapan dengan cara direbus atau dikukus, proses pengolahan ini memungkinkan terjadinya penurunan kandungan rutin di dalamnya, sehingga perlu dilakukan penelitian seberapa besar penurunan kadar rutin tersebut setelah diberikan perlakuan.

Berdasarkan penelitian rata-rata kandungan rutin dalam daun segar adalah 1,97% b/b, setelah diberikan dua perlakuan yang berbeda yaitu dikukus dan direbus diketahui kadar rutin dalam daun singkong mengalami penurunan sebanyak 12,37% untuk pengolahan secara dikukus dan 37,11% untuk yang direbus (Gambar 2). Pada penelitian Azizah et.al (13) kandungan rutin dalam daun singkong segar yaitu 4,987% b/b karena dibuat maserasi kemudian ekstrak dipekatkan, sedangkan pada penelitian ini proses ekstraksi dilakukan hanya dengan menambahkan etanol kemudian dikeluarkan sarinya dengan cara digerus.

Kadar flavonoid akan berkurang ketika proses perebusan sehingga ekstrak dari daun yang telah direbus

mengandung flavonoid lebih rendah. Proses perebusan melepaskan kira-kira 50 % kandungan flavonoid daun singkong dalam air rebusan. Sementara menurut Fidrianny et al. (2007), flavonoid daun singkong terdistribusi 65 % tertahan dalam ampas dan 35 % dalam air rebusannya (21,22). Pada pengukusan, matriks tidak kontak langsung dengan air, sehingga mengurangi juga kemampuan rutin untuk terekstraksi dalam air. Dari hasil tersebut diketahui bahwa dengan kedua perlakuan tersebut dapat mempengaruhi kadar rutin dalam daun singkong. Hal ini terkait dengan sifat rutin dapat teroksidasi dengan adanya pemanasan (9).



Gambar 2. Grafik penurunan kadar rutin dalam daun singkong setelah diberikan perlakuan

Uji *Least Significance Different* (LSD) atau Beda Nyata terkecil digunakan sebagai acuan dalam

menentukan apakah rata-rata dua perlakuan berbeda secara statistik atau tidak. Hasil analisa statistik menggunakan metode one way anova menggunakan metode LSD post hoc test (Tabel 5) menunjukkan bahwa setiap perlakuan memiliki berpengaruh terhadap kadar senyawa. Hal tersebut ditunjukkan karena terdapat perbedaan bermakna dari setiap perlakuan dengan signifikansi ($p < 0,05$). Perbedaan ini terjadi karena adanya pemanasan. Seperti yang kita ketahui bahwa rutin tidak stabil terhadap suhu tinggi.

Tabel 5 Uji Statistik

Perlakuan	Hasil (%) \pm SD
Segar	1,94 \pm 0,01 ^{$\alpha\beta$}
Kukus	1,70 \pm 0,005* ^{β}
Rebus	1,22 \pm 0,003* ^{α}

KESIMPULAN

Dari hasil yang telah dilakukan didapatkan panjang gelombang maksimum rutin ada pada panjang gelombang 414 nm. Kandungan rutin yang paling besar secara berturut-turut adalah singkong segar, kukus dan rebus. Pengolahan disertai

pemanasan dapat mengurangi kadar rutin dalam daun singkong.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chahyadi A, Elfahmi. The influence of extraction methods on rutin yield of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz). *Saudi Pharm J* [Internet]. 2020;28(11):1466–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.09.012>
2. Kelly GS. Quercetin. *Altern Med Rev*. 2011;16(2).
3. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J* [Internet]. 2017;25(2):149–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.025>
4. Arifin B, Ibrahim S. Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *J Zarah*. 2018;6(1):21–9.
5. Chankyu Lee, Seo Yeong Gim, Mi-Ja Kim and JL. Effects of quercetin or rutin on the oxidative stability of stripped or non-stripped soybean oils containing α -tocopherol. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2016;1–25.
6. Al Amin R, Ihsan; Efendi DH; S. Perbandingan Aktivitas Antioksidan Alami Rutin terhadap Antioksidan Butyl Hidroksi Anisol (BHA) dengan Metode Peredaman. In: *SpeSIA*. 2007. p. 316–20.
7. Puspitarini BA. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Singkong (*Manihotis Folium*) Menggunakan Metode Diphenylpicryl Hydrazyl (DPPH). [Skripsi]. Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta; 2010.
8. Intarakasem P, Nualkaew S, Padumanonda T. Validation of Rutin Analysis in Cassava (*Manihot esculenta*) Leaves Using TLC-densitometer. *Int Conf Herb Tradit Med*. 2015;(Htm):160–6.
9. Zi J, Peng B, Yan W. Solubilities of rutin in eight solvents at T = 283.15, 298.15, 313.15, 323.15, and 333.15 K. *Fluid Phase Equilib*. 2007;261(1–2):111–4.

10. Piana M, Zadra M, De Brum TF, Boligon AA, Gonçalves AFK, Da Cruz RC, et al. Analysis of rutin in the extract and gel of *viola tricolor*. *J Chromatogr Sci*. 2013;51(5):406–11.
11. Rhyanne T.M. Ramos, Isabelle C.F. Bezerra, Magda R.A. Ferreira LALS. Spectrophotometric Quantification of Flavonoid in Herbal Material, Crude Extract, and Fractions from Leaves of *Eugenia uniflora* Linn. *Pharmacognosy Res*. 2017;9(3):253–60.
12. Ramadhani MA, Hati AK, Lukitasari NF, Jusman AH. Skrining Fitokimia dan Penetapan Kadar Flavonoid Total serta Fenolik Total Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) dengan Maserasi Menggunakan Pelarut Etanol 96%. *Indones J Pharm Nat Prod*. 2020;03(01):8–18.
13. Azizah Z, Elvis F, Zulharmita, Misfadhila S, Chandra B, Yetti RD. Penetapan Kadar Flavonoid Rutin pada Daun Ubi Kayu (*Manihot Esculenta* Crantz) Secara Spektrofotometri Sinar Tampak. *J Farm Higea*. 2020;12(1):90–8.
14. Bahrudin. Pemeriksaan Kadar Rutin pada Daun Singkong (*Manihot utilisima* Pohl) Muda, Tua, Kuning. Sekolah Farmasi ITB. Bandung: Farmasi ITB; 1990. 138–155 p.
15. Djamil R, Winarti W. Identifikasi Senyawa Flavonoid Dalam Fase n-Butanol dari Ekstrak Metanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). In: Kongres Ilmiah XVII ISFI. 2009. p. 2–6.
16. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *J Food Drug Anal*. 2002;10(3):178–82.
17. Theodora CT, Gunawan IWG, Swantara IMD. Isolasi Dan Identifikasi Golongan Flavonoid Pada Ekstrak Etil Asetat Daun Gedi

- (*Abelmoschus manihot* L.). J Kim. 2019;13(2):131–8.
18. Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. Maj Ilmu Kefarmasian. 2004;1(3):117–35.
19. ICH. Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. In: the Drug Information Branch (HFD-210) [Internet]. 1996. p. 301–827. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> %5Cn<http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>
20. Medvidović-Kosanović M, Šeruga M, Jakobek L, Novak I. Electrochemical and antioxidant properties of rutin. Collect Czechoslov Chem Commun. 2010;75(5):547–61.
21. Fidrianny, I; Sukrasno, Wirasutisna K. Pengaruh Perebusan Terhadap Kandungan Flavonoid Dalam Daun Singkong. J Obat Bahan Alam. 2007;6(6):55–9.
22. Hasim, Falah S, Dewi LK. Effect of Boiled Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz) on Total Phenolic, Flavonoid and its Antioxidant Activity. Curr Biochem [Internet]. 2016;3(3):116–27. Available from: <https://journal.ipb.ac.id/index.php/cbj/article/view/21149>