

STUDI KOMPARASI KADAR FENOLIK TOTAL EKSTRAK ETANOL DAUN JERUK PURUT (*Citrus hystrix* DC) DAN DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle) DENGAN MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

Nita Rezkiana Anwar¹, Harti Widiastuti², Aktsar Roskina Ahmad³
nitarezkianaanwar@gmail.com¹, harti.widiastuti@umi.ac.id², aktsar.roskiana@umi.ac.id³
Universitas Muslim Indonesia

ABSTRACT

Citrus plants (Citrus hystrix DC) and limes (Citrus aurantifolia (christm.) Swingle), Rutaceae family are plants with a source of polyphenols contained in its leaves. This research aimed to conduct a comparative study of the total phenolic content of the ethanol extract of the citrus leaves (Citrus hystrix DC) and acid lime leaves (Citrus aurantifolia (christm.) Swingle) using a UV-Vis spectrophotometer. The ethanol extract of the citrus leaves and acid lime leaves was obtained by maceration method with ethanol. The qualitative analysis used FeCl₃ shaping blackish green complex. The determination of total phenolic content of ethanol extract of citrus leaves and acid lime leaves based on Folin Ciocalteu method. Total phenolic content was expressed in GAE (Gallic acid equivalent), the absorbance was measured at a wavelength of 750 nm. The result showed that total phenolic content in the ethanol extract of citrus leaves and acid lime leaves was 27, 38 mg GAE/g extract with percentage of 2,738 % (w/w) and 17,98 mg GAE/g extract with the percentage of 1,798 % (w/w).

Keywords : acid lime leaves, citrus leaves, total phenolic.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan Negara dengan hutan hujan tropis, dimana terdapat beragam flora yang tumbuh di beberapa wilayah sekitar Indonesia seperti family Rutaceae. Terdiri dari 130 genus yang terdapat didalam tujuh subfamily dari Rutaceae. Salah satunya adalah Citrus (16 spp), Citrus (jeruk) merupakan tanaman yang banyak tumbuh di Asia bagian selatan, Jepang, dan Indonesia (Astarini, Ferry & Yulfi, 2010).

Citrus atau jeruk sudah lama dibudidayakan di Indonesia dan Negara-negara tropis Asia lainnya. Di Indonesia, jeruk ditanam dimana saja, baik di dataran rendah maupun dataran tinggi. Buah jeruk merupakan salah satu jenis buah yang paling banyak digemari oleh masyarakat Indonesia. Karena memiliki berbagai manfaat. Seperti daun jeruk yang dapat digunakan sebagai bumbu masak dan menutupi bau amis, serta buahnya yang dapat digunakan untuk perawatan kulit. Dalam segi manfaat dari suatu tumbuhan, bergantung dari senyawa kimia yang dimiliki (AAK, 1994).

Berbagai spesies genus citrus yang biasa kita temukan adalah Jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dan Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle). Walaupun dari genus yang sama yaitu Citrus L, akan tetapi kadar dari senyawa kimia dapat berbeda.

Daun jeruk purut mengandung fenolik, terpenoid (Kooltheat et al, 2016), α - tokoferol (Ching & Mohamed, 2001), fenolik, minyak atsiri (Siriamornpun et al, 2016), flavonoid sianidin, myricetin, peorridin, quercetin, luteolin, hesperetin, apigenin, dan isorhamnetin (Butryee, Sungpuag & Chitchumroonchokchal, 2009). Sedangkan daun jeruk nipis mengandung vitamin B, tripenol (Latief, 2012), flavonoid, glikosida, tannin, dan pholobatannin (Nweke, 2015). Jeruk mengandung senyawa aktif seperti golongan senyawa fenol diantaranya flavonoid, flavanon glikosida dan asam hidroksi sinamat, vitamin C dan kerotenoid (Abeyasinghe et al, 2007).

Dengan kandungan kimia senyawa fenol yang dimiliki daun jeruk purut dan jeruk

nipis, sehingga dilakukan penelitian untuk mengetahui berapa kadar senyawa fenolik yang ada pada daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle) menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

METODOLOGI

1. Pengambilan dan Pengolahan sampel

Sampel daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle) yang berasal dari kota Sidrap (Sulawesi selatan). Diambil dan dilakukan sortasi basah kemudian disortasi kering. Selanjutnya dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama beberapa hari pada udara terbuka dengan tidak terkena sinar matahari langsung. Kemudian diserbukkan dengan menggunakan blender.

2. Ekstraksi

Ditimbang masing-masing sampel kering yang telah diserbukkan, sebanyak 300 gram dan dimasukkan ke dalam wadah toples untuk dimaserasi. Kemudian ditambahkan pelarut etanol 96 % sebanyak 1,1 L hingga simplisia terendam, dibiarkan selama 3 hari dalam wadah tertutup dan terlindung dari cahaya matahari sambil diaduk secara periodik, setelah itu disaring. Diremaserasi kembali selama 3 hari menggunakan pelarut etanol yang baru sebanyak 700 mL, sambil diaduk secara periodik, dan disaring (Samin, Bialangi & Salimi, 2011).

Residu hasil maserasi kedua dimaserasi kembali selama 3 hari menggunakan pelarut etanol baru sebanyak 500 mL, sambil diaduk secara periodik, dan disaring. Cairan hasil maserasi yang telah diperoleh dikumpulkan kemudian diuapkan dengan rotavapor dan didapatkan ekstrak kental (Samin, Bialangi & Salimi, 2011).

3. Uji Kualitatif

Penentuan senyawa kimia dilakukan menggunakan pereaksi warna, dimana ekstrak etanol daun jeruk purut dan daun jeruk nipis masing-masing ditambah pereaksi FeCl_3 . Positif mengandung fenol jika berwarna hijau, hingga biru atau hitam yang kuat (Alfian & Susanti, 2013).

4. Uji Kuantitatif

a. Pembuatan pereaksi Na_2CO_3 7%

Ditimbang sebanyak 3,5 gram Na_2CO_3 kemudian dilarutkan dengan aquabidestillata hingga 50 mL (Ahmad A R et al, 2015).

b. Pembuatan larutan induk asam galat

Sebanyak 10 mg asam galat dilarutkan dalam 10 mL etanol, untuk menghasilkan larutan asam galat dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Dari larutan stock dipipet sebanyak 250 μL diencerkan dengan etanol p.a hingga volume 25 mL dihasilkan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$. Dari larutan tersebut dipipet 1,5 2, 2,5 3, 3,5, 4 mL dan dicukupkan dengan etanol p.a hingga 5 mL, sehingga dihasilkan konsentrasi 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 $\mu\text{g/mL}$ (Ahmad A R et al, 2015).

c. Tahap penentuan kadar senyawa fenolik (Alfian & Susanti, 2013)

1) Penentuan Operating Time

Sebanyak 1 mL larutan asam galat konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$ ditambah 0,4 mL reagen Folin Ciocalteau (1:10), kemudian dikocok dan didiamkan selama 4 menit. Ke dalam larutan tersebut ditambah 4,0 mL larutan Na_2CO_3 7 %, dikocok homogen, dan diukur absorbansinya dalam rentang waktu 40-120 menit pada panjang gelombang 400-800 nm.

2) Penentuan Panjang Gelombang Absorbansi Maksimum

Sebanyak 1 mL larutan asam galat konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$ ditambah 0,4 mL reagen Folin Ciocalteau (1:10), kemudian dikocok dan didiamkan selama 4 menit.

Ke dalam larutan tersebut ditambah 4,0 mL larutan Na_2CO_3 7 %, dikocok homogen, dan didiamkan pada suhu kamar pada range operating time (90 menit), kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 400-800.

3) Pembuatan kurva baku asam galat dengan reagen Folin-Ciocalteu

Sebanyak 1 mL larutan asam galat konsentrasi 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 $\mu\text{g/mL}$ masing-masing dimasukkan dalam tabung, kemudian ditambah 0,4 mL reagen Folin Ciocalteu (1:10) dan dikocok. Setelah didiamkan selama 4 menit, masing-masing larutan ditambah 4,0 mL larutan Na_2CO_3 7 % dikocok homogen, dan didiamkan pada range operating time (90 menit) pada suhu kamar. Semua larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 750 nm, kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat ($\mu\text{g/mL}$) dengan absorbansi.

d. Penetapan kadar fenolik total

Sebanyak 10,0 mg ekstrak etanol daun jeruk purut dan daun jeruk nipis dilarutkan sampai volume 10,0 mL dengan etanol p.a sehingga konsentrasinya 1000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan ekstrak yang diperoleh dipipet 2 mL dicukupkan dengan 10 mL etanol p.a untuk menghasilkan konsentrasi sampel 200 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian dipipet 1 mL dan ditambah 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu dan dikocok. Didiamkan selama 4 menit, ditambah 4,0 mL larutan Na_2CO_3 7 % dan didiamkan lagi pada range operating time (90 menit) pada suhu kamar. Absorbansi larutan ekstrak diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 750 nm. Dilakukan 3 kali pengulangan (Ahmad A R et al, 2015).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa fenol merupakan senyawa aromatik dengan satu atau beberapa gugus hidroksil yang terikat secara langsung pada cincin benzene. senyawa ini mudah mengalami oksidasi (Effendi, 2003). Fenol telah diketahui memiliki berbagai efek biologis seperti aktivitas antioksidan melalui mekanismenya sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, penghelat logam serta pendonor elektron (Ukieyanna, 2012).

Tanaman jeruk purut dengan nama latin *Citrus hystrix* DC dan jeruk nipis dengan nama latin *Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle merupakan tanaman dengan sumber polifenol yang terdapat dalam daunnya (Dalimartha, 2006). Tanaman ini dapat berkhasiat sebagai stimulant, mengatasi kelelahan, kepala pusing, obat jerawat dan insektisida (Hariana, 2013).

Adanya senyawa fenolik pada sampel daun jeruk purut dan jeruk nipis, sehingga tujuan dari penelitian ini yaitu untuk melakukan studi komparasi kadar fenolik total ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dan dau jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Untuk mendapatkan senyawa kimia yang diinginkan digunakan metode ekstraksi yang merupakan metode penyarian zat berkhasiat atau zat aktif dari bagian tanaman dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Yuliani & Satuhu, 2012).

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi karena metode ini tidak menggunakan pemanasan sehingga tidak terjadi dekomposisi senyawa kimia yang terkandung dalam sampel. Dekomposisi senyawa kimia terjadi karena oksidasi senyawa fenolik, sehingga dapat menurunkan jumlah senyawa fenolik (Dai & Mumper, 2010).

Sampel daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle) yang telah diserbukkan masing-masing ditimbang sebanyak 300 g dan dilarutkan dengan pelarut etanol 96 % sebanyak 1,1 L. Etanol digunakan sebagai pelarut dalam ekstraksi dikarenakan lebih aman dalam penanganan dibandingkan pelarut organik lainnya seperti metanol dan aseton. Etanol terbukti memiliki aktivitas yang tinggi dalam menarik fenolik (Chew et al, 2011). Sesuai dengan prinsip

“Like dissolve like” bahwa pelarut hanya dapat menarik senyawa yang polaritasnya sama dengan pelarut (Spigno, Tramelli & De Faveri, 2007).

Dilihat dari segi kepolarannya, etanol merupakan pelarut yang bersifat polar, sehingga diharapkan dapat menarik senyawa yang bersifat polar seperti fenolik (Dai & Mumper, 2010). Remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali dengan jumlah pelarut 2,4 L, agar proses penarikan komponen senyawa kimia yang terdapat dalam sampel daun jeruk purut dan daun jeruk nipis lebih sempurna dan menghasilkan lebih banyak ekstrak etanol yang kemudian diuapkan menggunakan rotavapor yang menghasilkan ekstrak etanol kental.

Tabel 1. Hasil uji kualitatif senyawa fenolik
serbuk simplisia daun jeruk purut (Citrus

Ekstrak etanol	Uji fenolik (FeCl ₃)	Hasil pengamatan
Daun jeruk purut	Hijau kehitaman	+
Daun jeruk nipis	Hijau kehitaman	+

Keterangan : (+) = adanya fenolik

(-) = tidak adanya fenolik

Uji kualitatif dengan menggunakan pereaksi warna dapat dilihat pada tabel 2, dimana ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle) positif mengandung senyawa fenol yang dapat dideteksi dengan menggunakan pereaksi ferri klorida yang ditandai dengan adanya reaksi antara polifenol dan ferri klorida membentuk kompleks warna hijau kehitaman (Apsari & Susanti, 2011).

Selanjutnya dilakukan uji kuantitatif dengan metode Folin Ciocalteu berdasarkan prosedur Alfian (2013) untuk menentukan kadar fenolik total pada ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle), karena metode ini merupakan metode standar untuk menentukan total kandungan senyawa fenol yang terdapat dalam sampel. Prinsip dasarnya yaitu dengan adanya reaksi oksidasi-reduksi antara senyawa fenol dalam sampel, pereduksi dan logam pengelat. Adanya transfer elektron dari senyawa-senyawa fenol pada sampel terhadap kompleks asam fosfotungstat/fosfomolibdat dalam pereaksi Folin Ciocalteu. Transfer elektron ini menyebabkan adanya reaksi oksidasi antara senyawa pereduksi (senyawa fenol) dan pereaksi Folin Ciocalteu sehingga terbentuk warna biru yang menandakan adanya senyawa fenol pada sampel (Sirat & Sukesu, 2012).

Dalam penentuan kadar fenolik digunakan larutan standar sebagai pembanding yaitu asam galat atau asam 3,4,5-trihidroksibenzoat ($C_6H_2(OH)_3CO_2H$), karena asam galat merupakan asam dengan 3 gugus hidroksi fenolik sehingga dapat digunakan sebagai senyawa baku pembanding untuk menetapkan kandungan senyawa fenolik total (Alfian & Susanti, 2013). Selain itu, asam galat tersedia dalam kemurnian yang tinggi, stabil, dan harganya yang relatif lebih murah (Mongkolsilp et al, 2004).

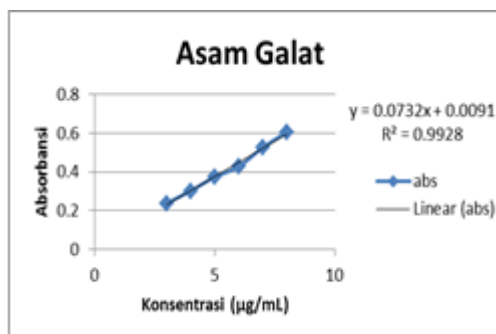
Sebelum dilakukan pengukuran larutan pembanding asam galat dan sampel uji, terlebih dahulu dilakukan penentuan operating time pada menit 30-120 dengan interval 10. Hasil dari penentuan operating time yaitu pada menit 90, dimana pada menit ini absorbansi asam galat menunjukkan nilai yang stabil. Fungsi dari operating time yaitu untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil yaitu saat sampel bereaksi sempurna dengan reagen warna. Dimana waktu kerja ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan (Lustiyati, 2012). Dalam pengukuran kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, digunakan larutan blanko.

Pengertian dari larutan blanko adalah larutan yang tidak mengandung sampel untuk dianalisis. Larutan blanko digunakan sebagai kontrol dalam suatu percobaan dimana berfungsi sebagai pembblank (mengkalikan nol) senyawa yang tidak perlu untuk dianalisis (Basset, 1994).

Pada pengukuran kadar fenol total asam galat maupun sampel uji direaksikan dengan reagen Folin Ciocalteu, reaksi ini mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) yang terdapat dalam reaksi Folin Ciocalteu menjadi suatu kompleks molibdenum-tungsten yang berwarna biru yang dapat dideteksi dengan spektrofotometer. Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu hanya dalam suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat. Untuk membuat kondisi basa digunakan Na_2CO_3 7 %. Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli menjadi kompleks molibdenum-tungsten sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat (Alfian & Susanti, 2013). Pengukuran nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimal 750 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Tabel 2. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar asam galat pada panjang gelombang maksimum 750 nm

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
3	0,238
4	0,302
5	0,373
6	0,427
7	0,525
8	0,606



Gambar 1.

Kurva kalibrasi asam galat pada gelombang maksimum 750 nm

Hasil yang diperoleh pada pengukuran absorbansi pembandingan asam galat pada tabel 3, diplotkan terhadap konsentrasinya, sehingga diperoleh kurva linear seperti pada gambar 3. Nilai R^2 yaitu 0,9928 dengan nilai r yaitu 0,9963 dan V_{x0} sebesar 3,28 % menunjukkan linearitas yang baik, dimana syarat dari nilai $r > 0,995$ dan nilai $V_{x0} < 5$ % (Gandjar & Rohman, 2009). Sehingga persamaan regresi linear ($y = 0,073x + 0,009$) yang dapat digunakan untuk penentuan kadar fenolik total sampel daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle).

Berdasarkan hasil penelitian, pada tabel 4 kadar fenolik total ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) adalah 27,38 mg GAE/g ekstrak dengan persentase kadar fenol total sebesar 2,738 % (b/b). Sedangkan pada tabel 5 kadar fenolik total ekstrak etanol

daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle) adalah 17,98 mg GAE/g ekstrak dengan persentase kadar fenol sebesar 1,798 % (b/b). Hasil tersebut menunjukkan bahwa kadar fenolik total ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) lebih tinggi dibandingkan kadar fenolik total dari ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle).

Tabel 3. Penetapan kadar fenolik total pada ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC)

Ekstrak	Replikasi	Abs (Y)	Kandungan fenol awal (mg/mL)	Kandungan total fenol (mgGAE/g ekstrak)	Rata-rata kandungan fenol total (mgGAE/g ekstrak)	% kadar fenol (b/b)
Etanol	I	0,434	0,005821	26,949	27,38	2,738
	II	0,431	0,005780	27,523		
	III	0,417	0,005589	27,668		

Tabel 4. Penetapan kadar fenolik total pada ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle)

Ekstrak	Replikasi	Abs (Y)	Kandungan fenol awal (mg/mL)	Kandungan total fenol (mgGAE/g ekstrak)	Rata-rata kandungan fenol total (mgGAE/g ekstrak)	% kadar fenol (b/b)
Etanol	I	0,281	0,003726	17,913	17,98	1,798
	II	0,275	0,003643	18,215		
	III	0,272	0,003602	17,831		

Penelitian sebelumnya, menyatakan bahwa senyawa fenol sendiri dapat dimanfaatkan sebagai desinfektan, antiseptik, bahan baku obat, maupun sebagai bahan pembuat plastik (Astarini, Ferry & Yulfi, 2010). Senyawa fenolik diketahui memiliki berbagai efek biologis sebagai antioksidan, melindungi struktur sel, antiinflamasi, dan sebagai antiseptik (Primadini, 2010).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etanolik daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle) mengandung senyawa fenol.
2. Kadar fenolik total pada ekstrak etanolik daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC) lebih tinggi dengan persentase 2,738 % (b/b), dibandingkan dengan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (christm.) Swingle) dengan persentase 1,798 % (b/b).

DAFTAR PUSTAKA

- AAK. 1994. Budidaya Tanaman Jeruk. Kasinus : Yogyakarta. Hal, 14.
- Abeyasinghe, D.C., Li, X., Sun, C., Zhang, W., Zhou, C. and Chen, K., 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. Food chemistry, 104(4), pp.1338-1344.

- Ahmad, A.R., Juwita, J., Ratulangi, S.A.D. and Malik, A., 2016. Penetapan kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak metanol buah dan daun patikala (*etlingera elatior* (jack) rm sm) menggunakan spektrofotometri uv-vis. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 2(1), pp.1-10.
- Alfian, R. dan Susanti, H., 2013. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Dengan Variasi Tempat Tumbuh Secara Spektrofotometri. *Pharmaciana*, 2(1), pp. 73-80.
- Apsari, D.P dan Susanti, H., 2011. Perbandingan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Merah dan Ungu Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) secara Spektrofotometri. Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan. Yogyakarta. Jurnal ISBN.
- Astarini, Niluh. P. F., Perry, Burhan., Yulfi, Zetra. Minyak Atsiri dari Kulit Jeruk Buah Citrus Grandis, Citrus Aurantium (L), dan Citrus Aurantifolia (Rutaceae) Sebagai Senyawa Antibakteri dan Insektisida. S.Si Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Astawan, M., Kasih, A. L., 2008. Khasiat warna-warni makanan. PT Gramedia Pustaka Utama : Jakarta. Hal, 292.
- Basset, J., R. C. Denney, G.H Jeffrey, J. Mendhom., 1994. Buku Ajar Vogel Kimia Analisa Kuantitatif Anorganik. Jakarta : EGC.
- Butryee, C., Sungpuag, P. and Chitchumroonchokchai, C., 2009. Effect of processing on the flavonoid content and antioxidant capacity of Citrus hystrix leaf. *International journal of food sciences and nutrition*, 60(sup2), pp.162-174.
- Chew, K.K., Khoo, M.Z., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Wan Aida, W.M. and Ho, C.W., 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4), pp. 1427-1235.
- Ching, L.S. and Mohamed, S., 2001. Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 49(6), pp.3101-3105.
- Dai, J. and Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), pp.7313-7352.
- Dalimartha, Setiawan. 2006. Tanaman Obat di Lingkungan Sekitar. Puspa Swara : Jakarta. Hal, 14-15.
- Effendi, H. 2003. Telaah Kualitas Air, bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan. Kanisius : Yogyakarta. Hal, 207.
- Gandjar, Gholib. dan Rohman., 2009. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar : Yogyakarta.
- Hariana, Arief. 2013. Tumbuhan Obat & Khasiatnya. Penebar Swadya : Jakarta. Hal, 141.
- Latief, Abdul., 2012. Obat Tradisional. EGC : Jakarta. Hal, 92.
- Lustiyati, E.D., 2012. Kimia Analitik II, Spektrofotometri UV-Vis. Akademi Analisis Kesehatan Nasional : Surakarta.
- Integrated Taxonomi Information System, 2016, Citrus aurantifolia L., diakses tanggal 17 september 2016. (<http://www.itis.gov>).
- Integrated Taxonomi Information System, 2016, Citrus hystrix D.C., diakses tanggal 17 september 2016. (<http://www.itis.gov>).
- Kooltheat, N., Kamuthachad, L., Anthapanya, M., Samakchan, N., Sranujit, R.P., Potup, P., Ferrante, A. and Usuwanthim, K., 2016. Kaffir lime leaves extract inhibits biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Nutrition*, 32(4), pp.486-490.
- Mongkolsilp, S., Pongbupakit, i., Sae-Lee, N., Sitthithaworn, W., 2004. Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content of Medicinal Plants used in Primary Health Care. Natural Product Evaluation Center (NPEC), Departement of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Srinakarinwirot University.
- Mya, M.M., Aye, Y.Y., Oo, A.W. and Saxena, R.K., 2015. Effect of Citrus hystrix DC Leaves Ethanol Extract on Larvae of *Aedes aegypti*. *Myanmar Health Sciences Research Journal*, Vol. 27(3), 227-231.
- Nweke, F.U., 2015. Effect of Citrus Aurantifolia Leaf Extract on Mycelial Growth and Spore Germination of Different Plant Pathogenic Fungi. *Advances in Life Science and Technology*

- Journal Vol 31, 4-9.
- Primadini, R. D., 2010. Uji Aktivitas Penghелatan Besi pada Ekstrak metanol Tanaman obat pegagan (*Centella asiatica*), Bunga Merak (*Caesalpinia pulcherimma*) dan Sendilaw Udang (*Commersonia batramia*) Skripsi. Bengkulu : Universitas Bengkulu.
- Samin, A.A., Bialangi, N. and Salimi, Y.K., 2013. Penentuan Kandungan Fenolik Total dan Aktivitas Antioksidan dari Rambut Jagung (*Zea mays L.*) yang Tumbuh di Daerah Gorontalo. KIM Fakultas Matematika dan IPA, 1(1), pp. 213-225.
- Sirat, W. D., dan Sukei., 2012. Antioksidan dalam Bakso Rumput Laut Merah *Eucheuma Cottoni*. Jurnal Sains dan Seni Pomits. Vol. 1. Hal. 3.
- Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D.M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of food engineering, 81(1), pp.200-208.
- Ukieyanna, E., 2012. Aktivitas Antioksidan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Tumbuhan Suruhan (*Peperomia pellucida L. Kunth*). Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- Yuliani, S. & Satuhu, S., 2012. Panduan lengkap minyak atsiri. Penebar swadaya : Jakarta. Hal, 46.