

PENGARUH VARIASI KEPOLARAN FASE GERAK ASETON-DIKLOROMETANA:
METANOL-ASAM ASETAT TERHADAP % DISTRIBUSI (+)-KATEKIN DARI GAMBIR
DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR VAKUM

Era, S.Y., Eka, L., Widjaja, I.N.K.

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

ABSTRACT

The research was conducted to determine the influence of mobile phase polarity of acetone-dichloromethane : methanol-acetic acid on the percent distribution of (+)-catechin from gambier by vacuum liquid chromatography and to determine the polarity mobile phase required to obtain the largest amount of (+)-catechin percent distribution.

Gambier extract was fractionated using vacuum liquid chromatography with several variations of polarity of acetone-dichloromethane : methanol-acetic acid mobile phase expressed by the dielectric constant value (ϵ) of 13.74 to 17.51. Fractions were analyzed by TLC-spectrophotodensitometer to calculate the concentration and the percent distribution of (+)-catechin. To know the effect of variations in mobile phase polarity on the percent distribution of (+)-catechin performed statistical analysis using one-way ANOVA test ($\alpha = 0.05$).

The results show that the variation of polarity of acetone-dichloromethane : methanol-acetic acid mobile phase ($\epsilon = 13.74$ to 17.51) had a significant influence on percent distribution of (+)-catechin from gambier by vacuum liquid chromatography method ($p < 0.05$). Fraction with a mobile phase of acetone-dichloromethane (4:6) 50% : methanol-acetic acid (3:4) 50%, which had a value of dielectric constant of 15.62 yield the largest amount of (+)-catechin percent distribution value (45.40%).

Key words; (+)-catechin, gambier, VLC, polarity of mobile phase, dielectric constant

PENDAHULUAN

Hasil penelitian Taniguchi et al (2007) menyebutkan bahwa senyawa (+)-katekin adalah komponen utama yang terdapat dalam gambir. Dimana senyawa tersebut menjadi salah satu senyawa yang potensial untuk diisolasi dan dikembangkan menjadi produk antioksidan alami. Kromatografi cair vakum (KCV) adalah salah satu metode yang dapat digunakan untuk memisahkan (+)-katekin dari gambir dimana kepolaran fase gerak sangat menentukan hasil pemisahan yang diperoleh. Salah satu parameter yang dapat digunakan untuk menilai kepolaran suatu pelarut adalah konstanta dielektrik (ϵ). Semakin besar harga suatu pelarut, maka semakin polar sifat pelarut tersebut (Buchari, 2003).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui kepolaran fase gerak yang optimal untuk mengisolasi (+)-katekin dari gambir dengan metode KCV. Meriyani (2010) telah melakukan penelitian mengenai pengaruh variasi kepolaran fase gerak ($\epsilon = 2,2$ s/d $13,62$)

terhadap % distribusi (+)-katekin gambir dengan metode KCV, dan hasilnya adalah semakin besar harga fase gerak, % distribusi (+)-katekin yang dihasilkan semakin besar. Fase gerak dengan $\epsilon = 13,62$ memberikan % distribusi yang paling besar (41,32%). Sedangkan Armawan (2010) yang melakukan penelitian pada rentang harga fase gerak yang berbeda ($\epsilon = 17,80$ s/d $68,03$) menunjukkan bahwa terjadi penurunan % distribusi (+)-katekin seiring dengan naiknya harga fase gerak dimana fase gerak dengan nilai $\epsilon = 17,80$ memberikan % distribusi yang paling besar (61,61%). Dari hasil kedua penelitian tersebut belum bisa diketahui harga yang optimal untuk memisahkan (+)-katekin gambir karena belum ada penelitian yang dilakukan untuk menggambarkan pola distribusi (+)-katekin gambir pada daerah harga fase gerak antara $13,62$ s/d $17,80$.

Pada penelitian ini akan digunakan fase gerak berupa campuran aseton-diklorometana : metanol-asam asetat dengan berbagai perbandingan sehingga menghasilkan harga

yang berada pada rentang 13,62 s/d 17,80, untuk melihat pola distribusi (+)-katekinnya sehingga diperoleh komposisi fase gerak yang optimal untuk memisahkan (+)-katekin dari gambir.

BAHAN DAN METODE

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah gambir (yang diperoleh dari Sumatera Utara) dan senyawa (+)-katekin standar. Fraksinasi menggunakan kolom dengan tinggi 3 cm dan diameter 1,0 cm dengan fase diam silika gel 60 dan fase gerak aseton-diklorometana: metanol: asam asetat dengan berbagai perbandingan sehingga diperoleh nilai konstanta dielektrik 13,62 s/d 17,80. Penetapan kadar dilakukan dengan metode KLT-spektrodensitometri dengan fase diam plat AL-TLC silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak toluen : etil asetat: asam formiat (4:6:1).

1. Penyiapan Bahan

Sebanyak 20 g serbuk gambir ditimbang, dimasukkan dalam gelas beaker yang berisi 500 ml pelarut yaitu di – ionized water (pH dibuat berada pada rentang 2 – 5,4). Serbuk gambir dimasukkan ke dalam beaker kemudian diultrasonik selama 90 menit. Setelah 90 menit ekstrak disaring. Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan dengan vacum rotary evaporator sampai diperoleh ekstrak kental.

2. Pemeriksaan Pendahuluan Flavonoid

Pemeriksaan pendahuluan dilakukan untuk mengetahui kandungan (+)-katekin dalam sampel, meliputi uji perubahan warna dengan NaOH 10% dan uji pendahuluan dengan KLT-spektrodensitometri. Pada uji perubahan warna dengan penambahan 2 – 4 tetes larutan NaOH 10% terhadap serbuk dan ekstrak gambir dimana sampel yang mengandung katekin akan menunjukkan perubahan warna dari coklat muda menjadi merah. Uji pendahuluan secara KLT dilakukan dengan membandingkan pola spektrum (+)-katekin standard an ekstrak menggunakan KLT- spektrodensitometri.

3. Fraksinasi dengan Metode Kromatografi Cair Vakum

Ekstrak gambir sebanyak 100 mg ditambahkan silika gel sebanyak 50 mg digerus hingga diperoleh serbuk kering. Silika yang telah bercampur dengan ekstrak gambir

dimasukkan ke dalam kolom dan ditutup dengan saringan G3. Setelah itu, kolom dielusi dengan fase gerak sesuai dengan tabel 1. Elusi dilakukan sebanyak tiga kali. Eluat hasil fraksinasi diuapkan hingga kering.

Tabel 1. Fase Gerak untuk KCV

Fraksi	Fase Gerak		
	Aseton-Diklorometana (4:6)	Metanol-Asam Asetat (3:4)	
1	100%	0%	13,74
2	75%	25%	14,68
3	50%	50%	15,62
4	25%	75%	16,57
5	0%	100%	17,51

4. KLT - Spektrodensitometri

Semua fraksi direkonstitusi dengan 2 mL metanol, kemudian ditotolkan dengan menggunakan CAMAG linomat 5 pada plat AL-TLC silika gel GF₂₅₄. Pada plat juga ditotolkan larutan standar (+)-katekin dengan kadar penotolan masing-masing sebesar 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 ng dan larutan ekstrak dengan kadar 100 mg/2 mL. Selanjutnya plat AL-TLC silika gel GF₂₅₄ dielusi dengan fase gerak toluen: etil asetat: asam formiat (4: 6: 1). Setelah dielusi, plat dipayar pada panjang gelombang 280 nm. Data yang diperoleh berupa spektrum, kromatogram, nilai R_f, dan nilai AUC. Kadar sampel ditentukan dengan menggunakan data yang diperoleh dari spektrodensitometri. Setelah kadar sampel diketahui, persen distribusi dihitung.

4. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa spektrum, kromatogram, nilai R_f, dan nilai AUC dari (+)-katekin standar serta (+)-katekin pada masing-masing fraksi. Data AUC seri standar (+)-katekin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi sehingga diperoleh persamaan regresi linier antara kadar dan AUC. Persamaan tersebut digunakan untuk menghitung kadar (+)-katekin dari tiap fraksi. Kemudian nilai kadar tersebut digunakan untuk menghitung % distribusi (+)-katekin pada setiap fraksi dari kandungan total (+)-katekin dalam 100 mg ekstrak yang difraksinasi. Untuk melihat adanya pengaruh kepolaran fase gerak (dinyatakan dengan nilai konstanta dielektrik)

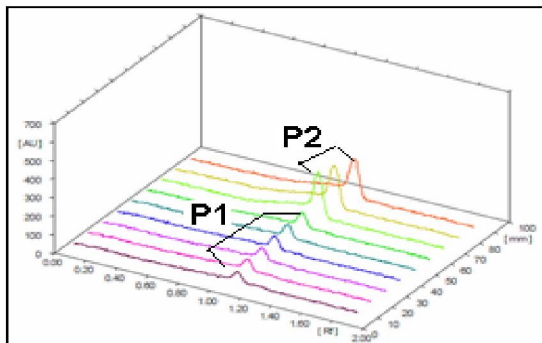
terhadap % distribusi (+)-katekin gambir maka dilakukan uji ANOVA satu arah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil uji pendahuluan

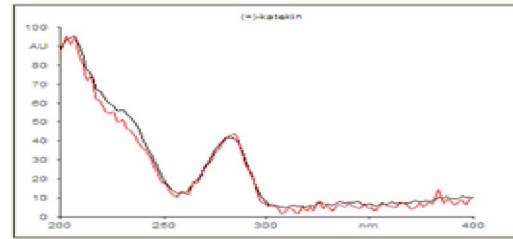
Uji pendahuluan meliputi uji reaksi warna dengan NaOH 10% dan KLT-spektrodensitometri. Pengujian reaksi warna dengan NaOH 10% dilakukan pada sampel serbuk gambir dan ekstrak gambir dengan tujuan untuk mengetahui keberadaan senyawa katekin pada serbuk gambir dan ekstrak gambir yang digunakan. Pengujian dilakukan dengan melarutkan ekstrak dan serbuk gambir dengan alkohol kemudian ditetesi dengan NaOH 10% lalu diamati perubahan warna yang terjadi. Setelah dilakukan pengujian, diperoleh hasil yang sama pada serbuk dan ekstrak gambir yaitu adanya perubahan warna dari coklat muda menjadi kuning kemudian menjadi merah kecoklatan sehingga diduga mengandung senyawa katekin.

Selain pengujian reaksi perubahan warna dengan NaOH 10% juga dilakukan uji pendahuluan dengan KLT spektrodensitometri untuk membandingkan profil kromatogram dan spektrum senyawa yang terdapat pada ekstrak gambir dengan senyawa standar (+)-katekin. Kedua spektrum tersebut memiliki nilai korelasi (r) sebesar 0,997 ($r > 0,95$) yang artinya kedua spektrum mirip sehingga ekstrak gambir dapat dikatakan mengandung senyawa (+)-katekin. Kromatogram dan spektrum dari (+)-katekin pada standar dan ekstrak dapat dilihat pada gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Kromatogram ekstrak gambir dan standar (+)- katekin

P1 = puncak dari standar (+)-katekin; P2 = puncak dari senyawa yang diduga (+)-katekin pada ekstrak gambir



Gambar 2. Spektrum ekstrak gambir dan standar (+)- katekin

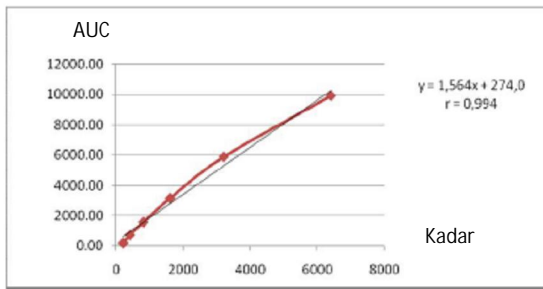
— Spektrum standar (+)-katekin
 — Spektrum senyawa yang diduga (+)-katekin pada ekstrak gambir

2. Pengaruh Variasi Kepolaran Fase Gerak terhadap % Distribusi (+)-Katekin

Data AUC dari enam seri kadar standar (+)-katekin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi yang menyatakan hubungan antara kadar analit dengan nilai AUC sebagai respon dari detektor. Persamaan regresi linier yang dihasilkan digunakan untuk menghitung kadar (+)-katekin pada masing-masing fraksi hasil pemisahan dengan KCV. AUC standar (+)-katekin untuk berbagai kadar dapat dilihat pada tabel 2 dan kurva kalibrasinya ditampilkan dalam gambar 3.

Tabel 2. AUC untuk berbagai kadar (+)-katekin

Kadar (ng)	AUC
200	170,10
400	701,60
800	1551,00
1600	3136,50
3200	5876,40
6400	9921,00



Gambar 3. Kurva kalibrasi antara kadar dan AUC

x = kadar (+)-katekin
y = AUC

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah 100 mg ekstrak gambir yang difraksinasi dengan menggunakan kromatografi cair vakum. Hasil fraksinasi tersebut dipisahkan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan

fase diam plat AL-TLC silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak toluen: etil asetat: asam formiat (4:6:1), selanjutnya dipayar pada panjang gelombang 280 nm dengan spektrodensitometer. Kadar (+)-katekin dalam setiap fraksi dihitung dengan memasukkan data AUC yang didapat ke dalam persamaan regresi pada kurva kalibrasi ($y = 1,564x + 274$). Sedangkan % distribusinya diperoleh dengan membandingkan kadar (+)-katekin masing-masing fraksi dengan kadar (+)-katekin total yang terdapat dalam 100 mg ekstrak gambir. Nilai AUC serta hasil perhitungan kadar dan % distribusi (+)-katekin setiap fraksi pada masing-masing variasi kepolaran fase gerak dapat dilihat pada tabel 3. Kromatogram standar (+)-katekin, ekstrak dan fraksi dengan variasi kepolaran fase gerak ditampilkan pada gambar4.

Tabel 3. Nilai AUC, Kadar dan % Distribusi (+)-Katekin Setiap Fraksi

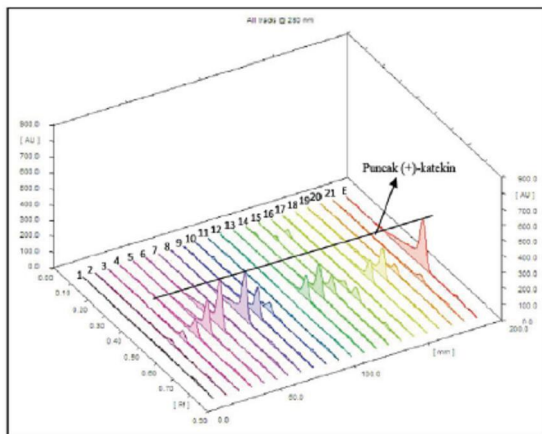
Sampel	ϵ	Pengulangan	R_f	AUC	Pengenceran Fraksi	[C]	% D	Rata-rata % D* ($\bar{x} \pm SD$)
Fraksi 1	13,74	I	-	-	-	-	-	-
		II	-	-	-	-	-	
		III	-	-	-	-	-	
Fraksi 2	14,68	I	0,52	9261,3	2x	11,49	30,69	31,29 \pm 1,90
		II	0,51	4187,8	5x	12,51	33,41	
		III	0,52	3759,9	5x	11,14	29,76	
Fraksi 3	15,62	I	0,52	5272,1	5x	15,98	42,67	45,40 \pm 2,99
		II	0,52	5966,3	5x	18,20	48,60	
		III	0,52	5538,1	5x	16,83	44,94	
Fraksi 4	16,57	I	0,52	1326,9	-	0,67	1,80	1,47 \pm 0,59
		II	0,52	2929,1	-	0,68	1,81	
		III	0,52	1433,1	-	0,30	0,79	
Fraksi 5	17,51	I	-	-	-	-	-	0,05 \pm 0,09
		II	0,52	1138,0	-	0,06	0,15	
		III	-	-	-	-	-	
Ekstrak	-	-	0,54	11987,1	5x	30,48	-	-

Keterangan: ϵ = konstanta dielektrik; R_f = retardation factor; AUC = area under curve; [C] = kadar dalam mg/2mL fraksi; %D = persen distribusi (+)-katekin; (-) = tidak ada nilai; * = rata-rata %D dari tiga pengulangan pada masing-masing fraksi; \bar{x} = rata-rata; SD = standar deviasi

Dari kromatogram yang diperoleh, didapat rentang R_f (+)-katekin 0,51-0,54 yang dimiliki oleh fraksi 2 (pada semua pengulangan), fraksi 3 (pada semua pengulangan), fraksi 4 (pada

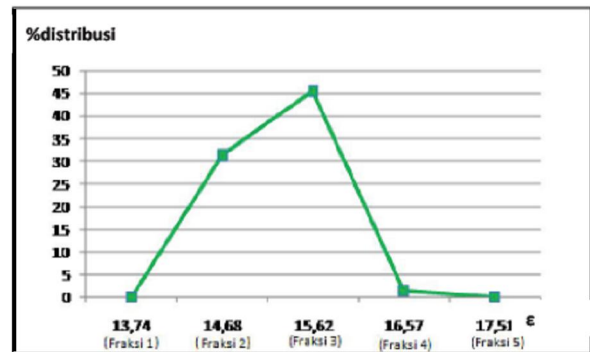
semua pengulangan) dan fraksi 5 pengulangan II. Sedangkan pada fraksi 1 (semua pengulangan) serta fraksi 5 pengulangan I dan III tidak terdapat (+)-katekin. Tidak

ditemukannya (+)-katekin kemungkinan disebabkan karena pada fraksi tersebut tidak mengandung (+)-katekin atau kadarnya sangat sedikit sehingga tidak terdeteksi oleh alat spektrodensitometer. Adapun kurva yang menyatakan hubungan antara kepolaran fase gerak (ditentukan berdasarkan nilai konstanta dielektrik) dan % distribusi (+)-katekin dapat dilihat pada gambar 5. Berdasarkan kurva tersebut terlihat bahwa nilai konstanta dielektrik 15,62 (fraksi 3) menghasilkan % distribusi (+)-katekin yang paling besar.



Gambar 4. Kromatogram standar, fraksi dan ekstrak.

- | | |
|----------------------------------|-------------------------------|
| 1 = standar dengan kadar 200 ng | 12 = fraksi 1 pengulangan II |
| 2 = standar dengan kadar 400 ng | 13 = fraksi 2 pengulangan II |
| 3 = standar dengan kadar 800 ng | 14 = fraksi 3 pengulangan II |
| 4 = standar dengan kadar 1600 ng | 15 = fraksi 4 pengulangan II |
| 5 = standar dengan kadar 3200 ng | 16 = fraksi 5 pengulangan II |
| 6 = standar dengan kadar 6400 ng | 17 = fraksi 1 pengulangan III |
| 7 = fraksi 1 pengulangan I | 18 = fraksi 2 pengulangan III |
| 8 = fraksi 2 pengulangan I | 19 = fraksi 3 pengulangan III |
| 9 = fraksi 3 pengulangan I | 20 = fraksi 4 pengulangan III |
| 10 = fraksi 4 pengulangan I | 21 = fraksi 5 pengulangan III |
| 11 = fraksi 5 pengulangan I | 22 = ekstrak 100 mg/2 ml |



Gambar 5. Kurva hubungan % distribusi (+)-katekin dan kepolaran fase gerak.

- Fraksi 1 = aseton-diklorometana (4:6) 100% : metanol-asam asetat (3:4) 0%
- Fraksi 2 = aseton-diklorometana (4:6) 75% : metanol-asam asetat (3:4) 25%
- Fraksi 3 = aseton-diklorometana (4:6) 50% : metanol-asam asetat (3:4) 50%
- Fraksi 4 = aseton-diklorometana (4:6) 25% : metanol-asam asetat (3:4) 75%
- Fraksi 5 = aseton-diklorometana (4:6) 0% : metanol-asam asetat (3:4) 100%

Untuk mengetahui apakah variasi kepolaran fase gerak berpengaruh signifikan terhadap % distribusi (+)-katekin maka dilakukan analisis ANOVA satu arah dengan variabel bebasnya adalah kepolaran fase gerak sedangkan variabel terikat adalah % distribusi (+)-katekin. Sebelum dilakukan analisis ANOVA, terlebih dahulu dilakukan uji asumsi homogenitas dan normalitas sebaran data dengan Levene's Test dan Kolmogorov-Smirnov Test ($\alpha = 0,05$). Untuk dapat dilakukan analisis ANOVA, data harus memiliki variansi yang homogen serta terdistribusi secara normal. Setelah dilakukan uji homogenitas dan normalitas, data dinyatakan homogen dan terdistribusi normal ($p > 0,05$). Dengan demikian, analisis ANOVA dapat dilakukan untuk melihat pengaruh variasi kepolaran fase gerak terhadap % distribusi (+)-katekin. Setelah dilakukan uji ANOVA one-way diperoleh hasil bahwa variasi kepolaran fase gerak ($\alpha = 13,74$ s/d $17,51$) berpengaruh signifikan terhadap % distribusi (+)-katekin ($p < 0,05$).

Dalam proses kromatografi, terjadinya pemisahan senyawa campuran dalam sampel disebabkan oleh adanya perbedaan kecepatan migrasi masing-masing senyawa akibat perbedaan distribusi atau afinitas relatif

senyawa tersebut pada fase diam dan fase gerak. Besarnya distribusi senyawa pada kedua fase tersebut sangat ditentukan oleh kesesuaian kepolaran senyawa tersebut dengan fase diam dan fase gerak yang digunakan. Senyawa yang polar akan cenderung terdistribusi pada fase polar sedangkan senyawa nonpolar akan cenderung terdistribusi pada fase nonpolar. Pada proses kromatografi, kepolaran fase diam umumnya tidak berubah, maka variasi kepolaran hanya bisa dibuat pada fase gerak. Analit yang memiliki sifat kepolaran yang sesuai dengan kepolaran fase gerak akan cenderung terbawa oleh fase gerak tersebut sedangkan semakin jauh kepolaran analit dengan kepolaran fase gerak maka semakin sedikit analit yang terbawa oleh fase gerak tersebut. Kepolaran fase gerak dapat dinyatakan dari nilai konstanta dielektriknya. Semakin besar nilai konstanta dielektrik fase gerak maka semakin polar sifat fase gerak tersebut. Dari hasil penelitian ini dapat dilihat bahwa variasi kepolaran fase gerak ($\epsilon = 13,74$ s/d 17,51) memiliki pengaruh yang signifikan terhadap % distribusi (+)-katekin. Fase gerak yang memiliki nilai konstanta dielektrik 15,62 (aseton-diklorometana (4:6) 50% : metanol-asam asetat (3:4) 50%) adalah fase gerak yang menghasilkan % distribusi (+)-katekin terbesar. Sehingga dengan demikian, kepolaran fase gerak tersebut diduga paling dekat dengan kepolaran senyawa (+)-katekin.

KESIMPULAN

1. Variasi kepolaran fase gerak aseton diklorometana: metanol-asam asetat ($\epsilon = 13,74$ s/d 17,51) memiliki pengaruh yang signifikan terhadap % distribusi (+)-katekin dari gambir dengan menggunakan kromatografi cair vakum ($p < 0,05$). Pada kepolaran fase gerak $\epsilon = 13,74$ s/d 15,62 terjadi peningkatan % distribusi (+)-katekin sedangkan pada kepolaran fase gerak $\epsilon = 15,62$ s/d 17,51 terjadi penurunan % distribusi (+)-katekin.
2. Fraksi yang memiliki konstanta dielektrik 15,62 (aseton-diklorometana (4:6) 50%: metanol-asam asetat (3:4) 50%) menghasilkan % distribusi (+)-katekin yang paling besar (45,40%).

DAFTAR PUSTAKA

- Avis, K.E., Lieberman, H.A., and Lachman, L. 1992. *Pharmaceutical Dosage Forms : Parenteral Medication, Volume 1, Second Edition*. Ney York : Marcel Dekker, Inc. P.177-179.
- Armawan, P.G.Y. 2010. *Pengaruh Variasi Kepolaran Campuran Fase Gerak Butanol : Asam Asetat-Air terhadap % Distribusi (+)-Katekin dari Gambir dengan Metode Kromatografi Vakum Cair (skripsi)*. Denpasar : F.MIPA UNUD. hal : 44.
- Bakhtiar, A. 1991. *Manfaat Tanaman Gambir. Makalah Penataran Petani dan Pedagang Pengumpul Gambir di Kecamatan Pangkalan Kab. 50 Kota. Padang 29-30 November*, hal : 23.
- Buchari, E. T., dan Sulaeman, A. 2003. *Pengaruh Pelarut dan Temperatur terhadap Transport Europium (III) melalui Membran Cair Berpendukung*. *Jurnal Matematika dan Sains* (8) 4: 155.
- Bursill, C.A. and Roach P.D. 2007. *A Green Tea Catechin Ekstrak Upregulates the Hepatic Low-Density Lipoprotein Receptor in Rats*. *Lipids* (42) 7: 621.
- Cannell, R.J.P. 1998. *Natural Product Isolation*. New Jersey : Humana Press. hal: 212.
- Chang, R. 1981. *Physical Chemistry with Applications to Biological System*. New York : Macmillan Publishing Co, Inc.
- Das, N.P. and Griffiths, L.A. 1967. *Studies on Flavonoid Metabolism Biosynthesis of (+)-[¹⁴C] catechin by the Plant Uncaria Gambir Roxb*. *Biochem. J.* (105): 73.
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Cetakan Pertama*. Jakarta : Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. hal: 1-11.
- Depkes RI. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Depkes RI. hal: 10-13.

- Deptan RI. 2010. Tanaman Perkebunan Yang Berada Dibawah Binaan Direktorat Budidaya Tanaman Rempah dan Penyegar. (cited 2010 Oct,16) available from: <http://www.pustaka-deptan.go.id/publikasi/bt08103j.pdf>.
- Dhalimi, A. 2006. Permasalahan Gambir (*Uncaria gambir* L.) di Sumatera Barat dan Alternatif Pemecahannya. *Perspektif* (5) No. 1 : 46 – 59.
- Dhalwal, K., Shinde, V.M., Biradar, Y.S., and Mahadik, K.R. 2008. Simultaneous Quantification of Bergenin, Cathecin, and Gallic acid from *Bergenia cillata* and *Bergenia ligulata* by Using Thin – Layer Chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* (21), p. 496-500.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia, Terbitan Kedua*. Bandung: Penerbit ITB. hal :13.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. I, No.3* :117 – 135.
- Hayani, E. 2003. Analisis Kadar Catechin dari Gambir Dengan Berbagai Metode. *Buletin Teknik Pertanian* 8 (1): 31- 32.
- Heyne, 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Badan Litbang Kehutanan, Jakarta. hal :1767-1775.
- Hostettmann, K., Maston, A., Maryse, H. 1998. *Preparative Chromatography Techniques, Applications in Natural Product Isolation*. Switzerland : Springer.
- Houghtou, P.J., and Ramah, A. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extract first edition*. London: Chapman & Hall. p : 82.
- Iwang, S. 1988. *Flavonoid*. Pusat Antar universitas, Bidang Ilmu Hayati; Penertbit ITB.
- Janeiro, P., and Brett, A.M.O. 2004. Catechin Elektrochemical Oxidation Mechanism. *Analytica Chimica Acta* (518) :109–115.
- Juniartis. 1998. Optimasi Ekstraksi Gambir untuk Mendapatkan Kadar Tanin yang Maksimal. *Jurnal Kimia Andalas* (4) No.1 : 47.
- Kusmardiyani, S., dan Nawawi, A. 1992. *Kimia Bahan Alam*. Bandung :Pusat Antar Universitas Bidang Ilmu Hayati. hal:68-109.
- Lide, D.R. 2004. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 85th Ed*. Boca Raton: CRC Press. p. 8-141.
- Lucida, H.,Bakhtiar, A., dan Putri, W.A. 2007. Formulasi Sediaan Antiseptik Mulut dari Katekin Gambir. *J.Sains Tek.Far.,(12):1*.
- Meriyani,H. 2010. Pengaruh Variasi Kepolaran Fase Gerak dan Tekanan terhadap % Distribusi (+)-Katekin dari Gambir dengan Metode Kromatografi Vakum Cair (skripsi). Denpasar : F.MIPA UNUD. hal :46.
- Nagata, H., Takekoshi, S., Takagi, T., Honma, T., and Watanabe, K.1998. Antioxidative Action of Flavonoids, Quercetin and Catechin, Mediated by the Activation of Glutathione Peroxidase. *Tokai J Exp Clin Med.,Vol.(24)1:1-11*.
- Pedrielli,P., Holkeri, L.M., and Skibsted, L.H. 2001. Antioxidant Activity of (+)-Catechin. Rate constant for hydrogen-atom transfer to peroxy radicals. *Eur Food Res Technol* 213 : 405-408.
- Reich, E. and Blatter, A. 2003. *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. 3rd Edition. Marcel Dekker Inc: New York. hal:24,626.
- Rohman dan Gandjar, I.G. 2007. *Farmasi Kimia Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. hal :367.
- Roux. D. G and E. A. Maihs. 1959. Isolation And Estimation Of (-) 7:3':4':5'-Tetrahydroxyflavan-3-Ol, (+) -Catechin And (+)-Gallocatechin From Black-Wattle-Bark Extract. *Grahamstown : Leather Industries Research Institute, Rhodes University*. p :1900.

- Snyder, L.R., and Kirkland, J.J. 1979. Introduction to Modern Liquid Chromatography, Second Edition. Canada : John Wiley & Sons, Inc. p:251-260,365.
- Susanti, D.Y. 2008. Efek Suhu Pengeringan Terhadap Kandungan Fenolik Dan Kandungan Katekin Ekstrak Daun Kering Gambir. Prosiding Seminar Nasional Teknik Pertanian 18-19 November, Yogyakarta.
- Tjitrosoepomo, G. 2004. Taksonomi Tumbuhan. Yogyakarta: UGM Press.
- Thompson, L. 2004. Enrichment of Biologically Active Compounds from Selected Plant Using Adsorptive Bubble Separation (disertation). German: Munchen Eingereicht University. p: 96.
- Taniguchi, S., Kuroda K., Doi, K., Tanabe, M., Shibata, T., Yoshida, T., and Hatano, T. 2007. Revised Structures of Gambirins A1, A2, B1, and B2, Chalcane-flavan Dimers from Gambir (*Uncaria gambir* Extract). Chem. Pharm. Bull, 55 (2) : 268-272.