

OPTIMASI METODE PENENTUAN TANIN (Analisis Tanin secara Spektrofotometri dengan Pereaksi Orto-Fenantrolin)

Imelda Fajriati¹

Abstract

Tannin is a chemical compound found most plants. Its existence creates sour and astringent to the taste of some fruits. Nevertheless, tannin has some advantages in tannin leather industry and the health of digestion system, such as to cure diarrhea. The proposed method was applied successfully to the determination of tannin by composing the complex compound of stable red solution of iron(II)-orto phenantrolin. Tannin can reduce iron(III) to iron(II) after heating up to 80°C for 20 minutes. The iron will then react with orto-phenantrolin, forming a complex of iron(II)-orto phenantrolin which absorb visible light having wavelength 400-700 nm. The result of this study shows that the maximum absorbance is found for 505 nm wavelength, the optimum pH is 5,5; the optimum heating time is 20 minutes. It is also found that the existence of ascorbat acid over 0,5 ppm will interfere the tannin analysis, leading to a necessity to isolate it prior to the analysis.

Key words: tannin, o-phenantrolin, spektrophotometer UV-Vis.

¹ Pengajar pada Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga.

A. Pengantar

Al-Quran telah menggariskan, bahwa semesta alam adalah lukisan ilmu pengetahuan apabila manusia senantiasa berfikir dan berkhidmat atas realitas yang terpampang disekitarnya. Allah menyatakan dalam QS. Yunus, 10: 101

“Perhatikanlah apa-apa yang ada di langit dan di bumi...” QS. Yunus, 10: 101

Seperti halnya dalam penciptaan manusia dan hewan, Allah telah menentukan dengan amat detil dan sempurna atas berbagai kandungan/kadar zat yang terdapat dalam setiap macam tanaman. Kandungan tersebut dapat dimanfaatkan manusia baik untuk kepentingan kesehatan maupun industri. Metode pengobatan klasik pada zaman Rasul telah mengenalkan berbagai tanaman herbal yang dipercaya dapat menyembuhkan penyakit. Pengetahuan ini kemudian dilanjutkan oleh ilmuwan abad 3 H seperti al-Kindi, Hunain ibnu Ishaq al-'Ubbadi, hingga Ibnu Sina, ilmuwan besar abad 5 H yang karyanya mempengaruhi Eropa.²

Sifat kandungan zat dan manfaat yang berbeda-beda dalam setiap tanaman, telah mengilhami ilmuwan alkimia Jabir ibnu Hayyan merintis metode analisis yang dikembangkan dalam laboratorium sederhana dengan dasar pengujian secara eksperimental. Metode inilah yang pada akhirnya melandasi penentuan ilmu pengetahuan ilmiah serta cikal bakal ilmu kimia modern. Cara-cara Jabir dalam analisis tersebut dapat ditelusuri dari kegiatan analisis zat yang sekarang dilakukan dalam pengerjaan analisis kimia, seperti metode analisis senyawa tanin yang keberadaannya banyak ditemui dalam tanaman dengan manfaat yang bermacam-macam.

Sebagai senyawa organik yang terdistribusi meluas pada tanaman, tanin merupakan zat yang bermanfaat untuk industri dan kesehatan. Hampir setiap famili tanaman mengandung tanin seperti yang terdapat pada buah-buahan dan sayuran. Apabila tanin terbentuk dalam jumlah yang cukup, biasanya ditempatkan di daun, buah, kulit kayu atau batang. Teh memiliki kandungan tanin cukup besar, antara 20 – 30 % berat kering daun teh. Rasa sepet pada teh dan asam pada beberapa

² Khadem Yamani, *Kedokteran Islam: Sejarah dan Perkembangannya*, (Bandung: Dzakra, 2005), h. 51-57

buah, disebabkan oleh kandungan tanin yang ada didalamnya³. Tanin termasuk senyawa flavour, sehingga menimbulkan rasa tertentu dalam makanan. Diantara manfaat tanin adalah proses *tanning leather*, yaitu pencoklatan pada industri kulit. Menurut *The American Medical Association* (1989), tanin berguna untuk menghentikan pendarahan dan diare. Dalam jumlah besar dan penggunaan jangka waktu lama, tanin dapat menyebabkan kerusakan hati.

Beberapa metode telah dikembangkan dalam penentuan tanin, diantaranya adalah metode folin fenol dan metode spektrofotometri serapan atom. Metode Folin Fenol menggunakan reagen na-tungstat serta asam fosfomolibdat sebagai pengkompleks yang memberikan warna biru, mengabsorbsi pada panjang gelombang 600-700 nm. Metode ini tidak hanya mendeteksi senyawa tanin melainkan semua senyawa fenol dalam sampel. Adanya senyawa anorganik seperti Mn(II), nitrit, sulfit kerap kali mengganggu pengukuran absorbansi karena turut mereduksi reagen pengkompleks⁴. Sedangkan metode spektrofotometri serapan atom mengukur secara tak langsung dari kelebihan kompleks Cu yang tidak terendapkan oleh tanin⁵.

Penentuan tanin menggunakan orto fenantrolin merupakan alter-nasi dari metode yang telah ada melalui pembentukan senyawa kompleks tanin-orto fenantrolin warna merah yang stabil. *Wah lau*, 1989 menjelaskan bahwa larutan Fe(III) dapat tereduksi menjadi Fe(II) oleh tanin setelah dipanaskan pada suhu tertentu. Fe(II) akan bereaksi dengan orto fenantrolin membentuk kompleks Fe(II) - orto fenantrolin yang menyerap pada panjang gelombang tampak (400-600 nm). Banyaknya Fe(III) yang tereduksi membentuk kompleks Fe(II) - orto fenantrolin analogi dengan jumlah tanin dalam larutan.

B. Kimiawi Tanin

Tanin adalah kelompok polifenol yang larut dalam air dengan berat molekul antara 500 – 3000 gr/mol. Tanin mampu mengendapkan alkaloid, gelatin dan protein lainnya, membentuk warna merah tua

³ Hui, Y. H, *Encyclopedia of Food Science and Tecnology* - vol. 4 (New York: John Wiley and Son Inc, 1992.), p.2505-2507

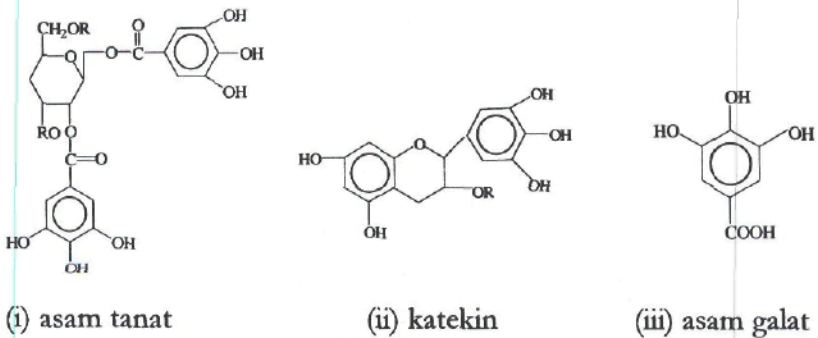
⁴ Clecseri et al., *Standard Methode For the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed., (Washington: American Public Health Association, 1989)p. 567-568

⁵ Iswahyutin, D., *Penentuan Tanin Secara Tidak Langsung dengan Metode Spektrofotometri Serapan Atom*, (Malang: Skripsi FMIPA Univ. Brawijaya, 1998) p. 5

dengan kalium ferrisianida dan amonia serta dapat diendapkan oleh garam-garam Cu, Pb dan kalium kromat (atau 1% asam kromat). Tanin diklasifikasikan dalam dua kelas, yaitu⁶:

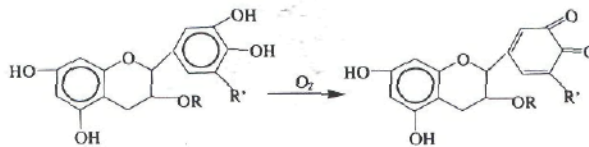
1. *Condensed Tannin*, yaitu tanin yang dapat terkondensasi dan tidak dapat dihidrolisis kecuali dalam suasana asam. Contoh: katekin, proantocyanidin
2. *Hidrolisable Tannin*, yaitu tanin yang terhidrolisis dalam air. Contoh: galotanin, caffetanin.

Tanin atau lebih dikenal dengan asam tanat, biasanya mengandung 10% H₂O. Struktur kimia tanin adalah kompleks dan tidak sama. Asam tanat tersusun 5-10 residu ester galat, sehingga galotanin sebagai salah satu senyawa turunan tanin dikenal dengan nama asam tanat. Beberapa struktur senyawa tanin adalah sebagai berikut⁷



Gambar 1. Beberapa struktur senyawa tanin

Dalam larutan basa, beberapa turunan tanin dapat mengabsorpsi oksigen. Bentuk oksidasi diantara senyawa tanin adalah⁸:



Gambar 2. Reaksi oksidasi katekin

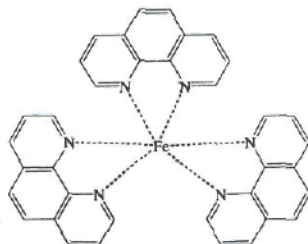
⁶ Parker, S., *Encyclopedia of Chemistry*, 2nd ed. (New York: Mc Graw Hill Book Co., 1993), p. 981

⁷ Peter R C., *Natural Toxicants in Feed and Poisoning Plants*, (New York: Avi Publishing Inc., 1993), p. 336

⁸ Edward, P., *Pharmacognosy*, (New York: John Wiley and Sons Inc., 1962), p. 33-47

C. Senyawa Kompleks Fe(II)–Orto–Fenantrolin

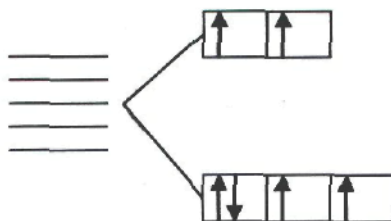
Orto-fenantrolin adalah ligan organik yang membentuk senyawa kompleks dengan Fe(II) sebagai ion pusat. Senyawa kompleks ini disebut ferroin. Dengan konstanta kestabilan kompleks $1,955 \times 10^{21}$, kompleks warna merah ini stabil dalam jangka waktu yang cukup lama yakni sampai 6 bulan. Struktur Ferroin adalah⁹:



Gambar 3. Struktur kompleks Fe(II)-o-fenantrolin

Orto-fenantrolin termasuk ligan medan kuat yang memiliki atom N aromatik dengan π^* kosong sehingga terjadi delokalisasi elektron yang menyebabkan kompleks ligan ini stabil terutama dengan logam yang mempunyai bilangan oksidasi rendah seperti besi(II)¹⁰.

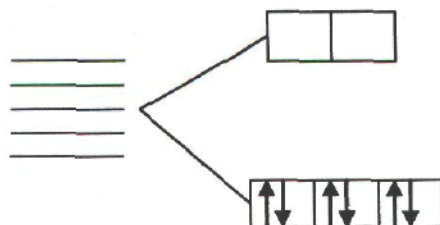
Besi(II) dengan konfigurasi d^6 sebagai ion pusat akan membentuk kompleks oktahedral apabila menggunakan ligan medan lemah, sehingga mempunyai suatu pemisahan spin tinggi dengan 4 elektron tak berpasangan



Gb. 4. Pemisahan elektronik orbital d^6 akibat adanya medan ligan lemah

⁹ Bladel WG and Meloche VW, *Elementary Quantitative analysis*, 2nd ed., (New York: Harper and Row Publisher, 1963), p. 836, lihat juga Dean J., *Lang's Hand Book of Chemistry*, 11nd ed, (New York: Mc. Graw Hill Book Co., 1970), p. 5-60

Apabila menggunakan ligan medan kuat seperti CN^- dan orto-fenantrolin, maka dalam orbital molekulnya spin elektron menjadi berpasangan sebagai akibat energi stabilisasi medan kristal yang lebih besar dari ligan-ligan kuat tersebut¹¹.



Gb. 5. Pemisahan elektronik orbital d^6 akibat adanya medan ligan kuat

D. Spektrofotometri Tampak

Spektrofotometri tampak atau kolorimetri dikaitkan dengan penetapan konsentrasi suatu zat dengan mengukur absorbansi relatif cahaya sehubungan dengan konsentrasi tertentu dari zat itu. Keuntungan utama metode kolorimetri adalah memberikan cara yang sederhana untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil. Batas atas metode kolorimetri pada umumnya adalah penetapan konstituen yang ada dalam kuantitas kurang dari 1 atau 2 persen. Pengembangan kolorimetri fotolistrik yang tidak mahal menyebabkan cabang analisis kimia instrumental ini dapat dilakukan dalam lembaga pendidikan yang kecil sekalipun¹².

Radiasi ultra violet – tampak mempunyai λ antara 200 – 780 nm. Serapan molekul pada daerah ini sangat tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Energi yang diserap bergantung atas perbedaan antara tingkat energi dasar tingkat energi eksitasi, semakin kecil perbedaan energinya semakin besar panjang gelombang dari serapan. Semua molekul senyawa organik mampu mengabsorpsi cahaya, sebab semua senyawa organik mengandung elektron valensi yang dapat dieksitasikan

¹⁰ Smith GH and Richter, *Phenanthroline and Substitued Phenanthroline Indicator*, (USA: Twin City Printing, 1994), p. 20

¹¹ Lee, J. D., *Concise In Organic Chemistry*, 4th ed., (London: Chapman and Hall, 1991), p. 766-769

¹² Vogel A. I., *Kimia analisis kuantitatif anorganik*, 1st ed., alih bahasa Pudjaatmaka (Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran, EGC, 1994), p. 864-865

ke tingkat energi yang lebih tinggi. Kebanyakan penerapan spektrofotometri ultraungu dan tampak didasarkan pada transisi $n \rightarrow \pi^*$ maupun $\pi \rightarrow \pi^*$, sehingga diperlukan gugus kromofor dalam molekul tersebut¹³.

Letak dari absorbansi molekul berkaitan dengan panjang gelombang dari radiasi yang mempunyai energi yang sama dengan yang dibutuhkan oleh transisi elektronik, sehingga kekhasan yang prinsip dari suatu pita absorbansi adalah letak dan intensitas dari suatu senyawa. Hal ini dipakai sebagai dasar analisis secara kualitatif dan kuantitatif¹⁴.

E. Bahan dan Cara Penelitian

Semua bahan yang digunakan dalam penelitian ini dengan derajat pro analisis (p.a) kecuali yang disebut khusus. Tanin (dinyatakan dalam asam tanat), Besi(III) amonium sulfat ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), Besi(II) sulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1,10-fenantrolin monohidrat ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), natrium asetat (CH_3COONa), asam askorbat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) dan akuades. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mencampurkan 6 mL Fe(II) 20 ppm dengan 5 mL larutan o-fenantrolin 50 ppm, kemudian diukur pada panjang gelombang dari 400 nm – 600 nm. Untuk cara kerja penentuan kondisi optimum pH dan waktu pemanasan, secara umum adalah dengan membuat larutan tanin 2 ppm kemudian di tambahkan buffer asetat 1 mL (dengan variasi pH yang dikehendaki). Larutan selanjutnya ditambah Fe(III) 100ppm, dipanaskan dalam water bath 80 °C (dengan variasi lama pemanasan yang dikehendaki). Setelah dingin ditambahkan larutan o-fenantrolin 500 ppm. Larutan diencerkan dengan akuades hingga 50 mL dan didiamkan 30 menit. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

F. Hasil Penelitian dan Pembahasan

1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (λ maks) dari Kompleks Fe(II) –o- Fenantrolin

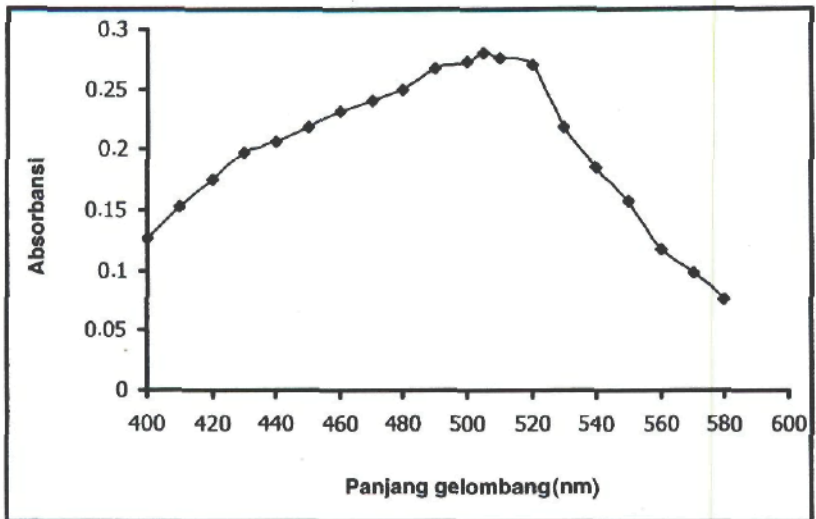
Disiapkan larutan kompleks Fe(II)-o-fenantrolin dengan konsentrasi tertentu (50 ppm), kemudian diukur pada berbagai panjang gelombang

¹³ Day RA, Underwood AL, *Analisa Kuantitatif*, alih bahasa Suharto S., (Jakarta: Erlangga, 1989), p. 245, 294, 383

¹⁴ Silverstein, R. M., Basler, G. L., Morrill, T. C., *Penyidikan Spektrofotometri Senyawa Organik*, ed. 4 alih bahasa Hartomo dkk., (Jakarta: Erlangga, 1986), p. 305

bang dari 400 nm – 600 nm. Hasil pengamatan seperti dalam gambar dibawah ini.

Hasil absorbansi larutan cenderung meningkat dengan pertambahan panjang gelombang hingga titik balik pada panjang gelombang 505 nm, setelah itu absorbansi menurun.



Gambar 6. Absorbansi kompleks Fe(II)-o-fenantrolin yang diukur pada panjang gelombang 400 nm –580 nm

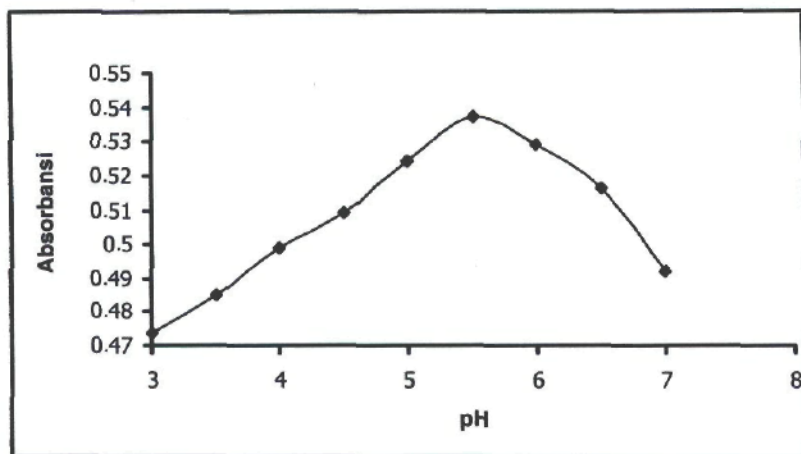
Larutan kompleks yang diukur pada berbagai panjang gelombang memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 505. Terjadinya absorbansi sinar oleh suatu molekul organik didasarkan atas kemampuan elektron untuk tereksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi. Besarnya energi yang diperlukan adalah spesifik sesuai dengan selisih tingkat energinya.

Dalam kompleks ini absorbansi radiasi menyebabkan perpindahan muatan (*charge-transfer complexes*) yang terjadi akibat adanya perpindahan elektron dari elektron donor Fe(II) ke akseptor o-fenantrolin. Bentuk tereksitasi merupakan hasil proses oksidasi-reduksi internal antara ion pusat dan ligan, dengan produk akhir berupa Fe(III) dan radikal o-fenantrolin¹⁵.

¹⁵ Hendayana, Sumar K., *Kimia Analitik Instrumen*, (Semarang: IKIP Press, 1994), p. 156, 143-149

2. pH Optimum Larutan Sampel

Pengaruh pH sampel dipelajari dengan bervariasi pH awal dari sampel tanin. Dengan mengatur pH sampel maka dapat diketahui pada pH berapa oksidasi tanin dapat berlangsung dengan optimal. Sampel tanin, merupakan asam lemah yang sifat reduktornya dipengaruhi oleh pH¹⁶, sehingga diperlukan kondisi larutan yang mengoptimalkan reaksi oksidasi tanin. Dari gambar hasil percobaan terlihat bahwa pH optimum dicapai pada pH 5,5. Absorbansi meningkat hingga pH 5,5, kemudian pada penambahan pH yang lebih besar, absorbansi menjadi lebih kecil.

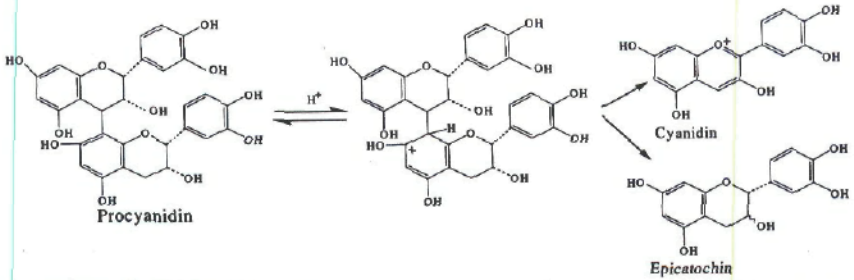


Gambar 7. Pengaruh pH larutan sampel terhadap absorbansi kompleks Fe(II)-o-fenantrolin yang diukur pada panjang gelombang 505 nm

Hasil gambar diatas berhubungan dengan kemampuan reaksi hidrolisis tanin dalam susasana asam. Tanin yang dinyatakan dalam bentuk turunannya procyanidin dengan adanya asam akan terhidrolisis menjadi epicatecatekin dan cyanidin¹⁷.

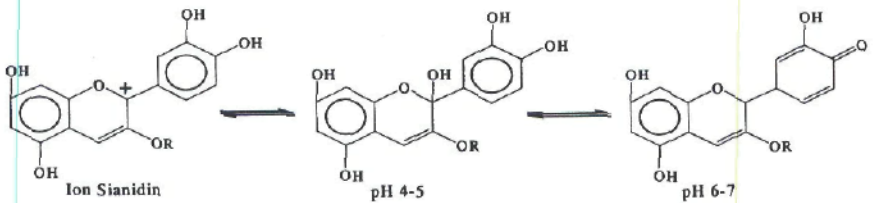
¹⁶ Edward, P., *Pharmacognosy*, (New York: John Wiley and Sons Inc., 1962), p. 33-47

¹⁷ Hui, Y. H., "Encyclopedia of Food Science and Tecnology" : Vol. 4 (New York: John Wiley and sons, 1992), p. 2505-2507



Gambar 8. Hidrolisis senyawa turunan tanin, proantocyanidin oleh asam

Tanin yang terhidrolisis menghasilkan senyawa katekin dan ion sianidin dengan struktur yang dapat berubah menurut pH larutan. Ion tersebut akan stabil dengan struktur tetap dalam pH larutan yang rendah¹⁸.



Gambar 9. Perubahan ion sianidin berdasarkan pH larutan

Absorbansi kompleks yang lebih kecil dalam daerah pH 3 - 4,5 dan pH 6 - 7 disebabkan yang teroksidasi lebih sedikit dibandingkan pada pH 5,5. Dengan banyaknya tanin yang teroksidasi maka semakin banyak pula Fe(II) yang tereduksi sehingga pembentukan kompleks fe(II)-o-fenantrolin meningkat

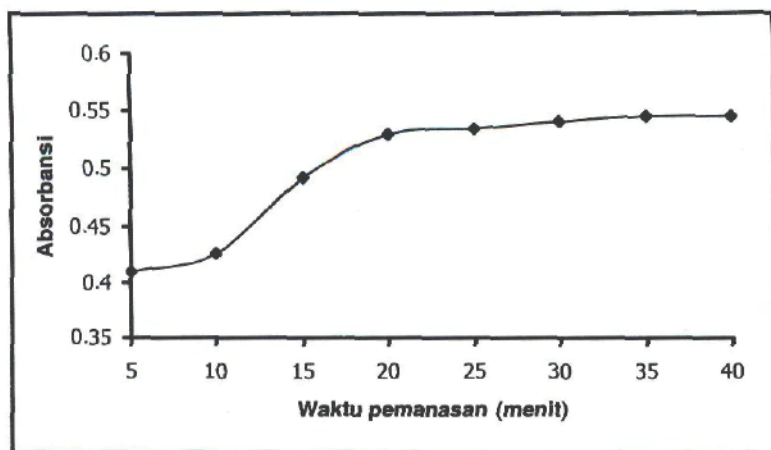
3. Waktu Pemanasan Optimum

Salah satu faktor yang mempengaruhi terjadinya reaksi yang melibatkan perubahan bilangan oksidasi adalah temperatur. Pemanasan dengan temperatur tertentu dapat mempercepat reaksi pelepasan elektron yang diikuti penangkapan elektron kembali oleh molekul lain.

Untuk mengetahui tingkat kesempurnaan reaksi redoks tanin dan Fe(II) pada saat dipanaskan, maka dicari lama waktu idealnya. Pengaruh

¹⁸ Belitz, H. D, and Grosch, W., *Food Chemistry* (Berlin Germany: Spinger-Verlag, 1987), p. 567-568

lama pemanasan ditentukan dengan mengvariasi waktu dari rentang 5 menit hingga 40 menit pemanasan.

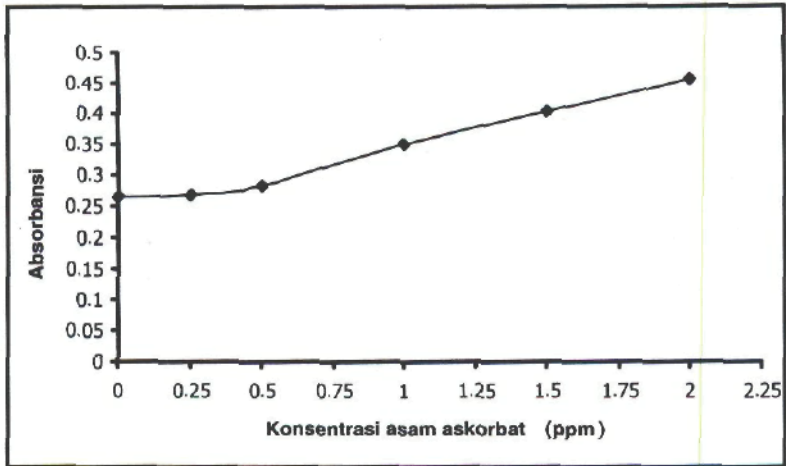


Gambar 10. Pengaruh lama waktu pemanasan terhadap absorbansi kompleks Fe(II)-o-fenantrolin yang diukur pada panjang gelombang 505 nm

Waktu pemanasan optimum dicapai selama 20 menit, penambahan waktu yang lebih lama tidak mengubah hasil reaksi yang cukup signifikan. Besi(III) akan banyak tereduksi dengan waktu pemanasan yang cukup. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tanin bukanlah reduktor kuat dalam mereduksi Fe(III) (dengan Fe(III)/Fe(II) $E^\circ = +0,77$), karena untuk dapat berlangsungnya reaksi redoks diperlukan tambahan energi yang diperoleh dengan pemanasan suhu 80 °C.

4. Pengaruh Asam Askorbat

Kandungan senyawa yang beraneka ragam di dalam suatu teh, memungkinkan bagi senyawa-senyawa selain tanin untuk mempengaruhi hasil analisis secara umum. Adanya asam askorbat yang terdapat dalam teh dapat mengganggu jumlah Fe(III) yang tereduksi karena asam askorbat juga merupakan senyawa reduktor. Kemungkinan ini menyebabkan jumlah Fe(III) dapat tereduksi bukan oleh tanin saja tetapi reduksi dari asam askorbat.



Gambar 11. Pengaruh variasi konsentrasi asam askorbat terhadap absorbansi kompleks Fe(II)-o-fenantrolin

Asam askorbat dalam larutan akan mengganggu jika konsentrasinya diatas 0,5 ppm. Dalam setiap teh hijau ditemukan 13,5 mg/100 g, sedangkan dalam teh hitam tidak didapatkan asam askorbat dalam jumlah yang cukup¹⁹. Gangguan asam askorbat cukup serius karena disamping dapat mereduksi Fe(III), asam askorbat juga dapat membentuk kompleks dengan Fe(III) dan Fe(II), dengan konstanta kestabilan $1,4 \times 10^4$. Kompleks ini secara termodinamika cukup stabil²⁰. merupakan gangguan positif karena turut meningkatkan absorbansi analit yang akan ditentukan. Untuk mengatasi gangguan absorbansi, tanin dipisahkan terlebih dahulu dari asam askorbat menggunakan pemisahan kromatografi cair atau metode ekstraksi²¹.

5. Preparasi Sampel Tanin dalam Teh

Beberapa kondisi optimum yang telah ditentukan dari penelitian ini dapat digunakan secara umum dalam analisis sampel tanin dengan terlebih dahulu dipisahkan komponen komponen lain yang terdapat dalam teh. Menurut Andreas Finger dkk., pemisahan kandungan senyawa-senyawa dalam teh dapat dilakukan dengan metode kroma-

¹⁹ Andreas Finger, Susanne Kuhr, "Chromatography of Tea Constituents" in *Journal of Chromatography*: 624, 1992, p. 215

²⁰ J.E. Gorman and F.M. Clydesdale, "The Behaviour and Stability of Iron-Ascorbate Complexes in Solution", in *Journal of Food Science*: 48, 1983, p. 1217

²¹ Ibid., p.215

tografi. Di dalam teh terdapat hampir 500 lebih komponen senyawa aromatik yang berbeda. Mengacu pada penelitian Filament²², Komponen senyawa dalam teh terdistribusi dalam bentuk 37 senyawa hidrokarbon, 46 senyawa alkohol, 55 senyawa aldehid, 57 senyawa keton, 55 senyawa ester, 71 senyawa asam, 16 senyawa lakton, firol dan lainnya. Tanin sendiri termasuk dalam golongan polifenol dan ester yang terbentuk dalam katekin dan asam galat (galotanin). Metode kromatografi yang digunakan untuk memisahkan komponen dalam teh antara lain adalah:

- a. Kromatografi Cair Gas (GLC) untuk komponen senyawa flavour yang mudah menguap seperti golongan alkohol dan linalool.
- b. Kromatografi Lapis Tipis (TLC) atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC) untuk komponen senyawa seperti flavanol, katekin, ester galat, dan senyawa lainnya

Setelah secara spesifik diperoleh senyawa tanin, maka dapat ditentukan dengan metode seperti yang diuraikan diatas.

G. Kesimpulan

Demikianlah, metode analisis tanin dengan pereaksi o-fenantrolin dapat ditentukan dengan terlebih dahulu mengetahui kondisi optimum dalam analisisnya. Dari percobaan optimasi dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Panjang gelombang maksimum (λ) dimana kompleks Fe(II) - o-fenantrolin memiliki absorbansi terbesar adalah 505 nm
2. Besar pH optimum sampel adalah pH 5,5
3. Lama pemanasan optimum suhu 80 °C guna meningkatkan kemampuan reduksi Fe(III) oleh tanin adalah pemanasan 20 menit
4. Adanya asam askorbat dengan konsentrasi diatas 0,5 ppm dapat meningkatkan hasil absorbansi kompleks Fe(II)- o-fenantrolin karena turut mereduksi Fe(III), sehingga perlu untuk dipisahkan terlebih dahulu.

²² I. Filament, *Food Res. Int.* 5, 1989, p. 317

DAFTAR PUSTAKA

- Andreas Finger, Susanne Kuhr, "Chromatography of Tea Constituents" in *Journal of Chromatography*: 624, 1992: 215
- Belitz, H. D, and Grosch, W., *Food Chemistry*, Berlin Germany: Springer-Verlag, 1987
- Bladel WG and Meloche VW, *Elementary Quantitative analysis*, 2nd ed., New York: Harper and Row Publisher, 1963
- Clecseri et al., *Standard Methode For the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed., Washington: American Public Health Association, 1989
- Day RA, Underwood AL, *Analisa Kuantitatif*, alih bahasa Suharto S., Jakarta: Erlangga, 1989
- Dean J., *Lang's Hand Book of Chemistry*, 11nd ed, New York: Mc. Graw Hill Bo, 1992
- Edward, P., *Pharmacognosy*, New York: John Wiley and Sons Inc., 1962
- Hendayana, Sumar K., *Kimia Analitik Instrumen*, Semarang: IKIP Press, 1994
- Hui, Y. H, *Encyclopædia of Food Science and Tecnology* - vol. 4 (New York: John Wiley and Son Inc., 1992
- I. Filament, *Food Rev. Int.*, 5, 1989: 317
- Iswahyutin, D., *Penentuan Tanin Secara Tidak Langsung dengan Metode Spektrofotometri Serapan Atom*, Malang: Skripsi FMIPA Univ. Brawijaya, 1998
- J.E. Gorman and F.M. Clydesdale, "The Behaviour and Stability of Iron-Ascorbate Complexes in Solution", *Journal of Food Science*: 48, 1983: 1217
- Lee, J. D., *Concise In Organic Chemistry*, 4th ed., London: Chapman and Hall, 1991
- Parker, S., *Enciclopedia of Chemistry*, 2nd ed. New York: Mc Graw Hill Book Co, 1993
- Peter R C., *Natural Toxicants in Feed and Poisoning Plants*, New York: Avi Publishing Inc, 1993
- Smith GH and Richter, *Phenanthroline and Substitued Phenanthroline Indicator*, USA: Twin City Printing, 1994
- Silverstein, R, M., Basler, G. L., Morrill, T. C., *Penyidikan Spektrofotometri Senyawa Organik*, edisi 4 alih bahasa Hartomo dkk., Jakarta: Erlangga, 1986
- Vogel A. I., *Kimia analisis kuantitatif anorganik*, 1st ed., alih bahasa Pudjaatmaka, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran, EGC, 1994
- Wah Lau, Shiu-Fai Luk, Hsiao-Lan Huang, "Spectrophotometric Determination of Tannin in Tea and Beer Samples with Iron(III) and 1,10-Phenanthroline as Reagents" in *Analyst*: 114, 1989