



## PENGEMBANGAN EKSTRAK BILBERI (*Vaccinium myrtillus*) TERSTANDARISASI MENJADI GRANUL EFERVESEN SEBAGAI SUPLEMEN ANTIOKSIDAN

Submitted: 3 Maret 2026

Edited: 2 Mei 2026

Accepted: 22 Mei 2026

Cornelius Steven Kashawan<sup>1</sup>, Farida Lanawati Darsono<sup>2\*</sup>, Kuncoro Foe<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya,  
Surabaya 60112, East Java, Indonesia  
Email: [farida@ukwms.ac.id](mailto:farida@ukwms.ac.id)

### ABSTRAK

Bilberi (*Vaccinium myrtillus* L.) mengandung antosianin dan umumnya dipasarkan dalam bentuk sediaan cair, namun sediaan tersebut memiliki stabilitas fisik dan kimia yang rendah. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan bentuk sediaan alternatif berupa granul efervesen yang lebih stabil. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi formulasi granul efervesen ekstrak bilberi (GE-EB) berdasarkan kadar air, laju alir, waktu larut efervesen, dan aktivitas antioksidan. Ekstrak kering bilberi diperoleh melalui metode perkolasi menggunakan pelarut air, dilanjutkan dengan pengeringan semprot serta standarisasi spesifik dan nonspesifik. Granul efervesen diformulasikan dengan metode granulasi basah, mengandung 160 mg ekstrak bilberi per *sachet*. Proporsi asam sitrat dan asam tartrat secara kritis memengaruhi kinetika reaksi efervesen, hidrasi partikel, waktu larut, kekerasan, dan stabilitas. Oleh karena itu, rasio kedua asam dioptimalkan menggunakan desain faktorial, dengan asam sitrat monohidrat (8–12%) sebagai faktor A dan asam tartrat (16–24%) sebagai faktor B. Respon yang diamati meliputi kadar air, laju alir, dan waktu larut efervesen. Evaluasi mutu fisik meliputi organoleptik, pH, kadar air, sifat alir, dan waktu larut. Aktivitas antioksidan diuji menggunakan metode DPPH dan dinyatakan sebagai nilai  $IC_{50}$  yang diukur dengan *microplate reader*. Analisis statistik dilakukan menggunakan ANOVA satu arah (perlakuan Yates), yang kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc Tukey*. GE-EB memiliki karakteristik fisik yang memenuhi persyaratan, dengan pH 5,59–6,65, kadar air 2,66–2,99%, laju alir 5,35–5,54 g/detik, sudut diam 27,49°–27,67°, rasio Hausner 1,13–1,16, indeks Carr 12,10–14,20%, dan waktu larut 1,34–2,54 menit. Asam sitrat monohidrat, asam tartrat, serta interaksinya berpengaruh signifikan terhadap seluruh respon. Formula optimum diperoleh pada konsentrasi asam sitrat monohidrat 10,27% dan asam tartrat 16,93%, dengan kadar air 2,81%, laju alir 5,51 g/detik, dan waktu larut 1,5 menit. Formula ini memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $161,74 \pm 0,97 \mu\text{g/mL}$ .

**Kata Kunci** : granul efervesen, ekstrak bilberi, faktorial desain, asam sitrat monohidrat, asam tartrat

### ABSTRACT

*Bilberry (Vaccinium myrtillus L.) is rich in anthocyanins and is commonly marketed in liquid dosage forms; however, these preparations often exhibit limited physical and chemical stability. To improve stability, the development of an effervescent granule formulation is proposed. This study aimed to optimize an effervescent granule formulation containing bilberry extract (GE-EB) based on moisture content, flow rate, effervescent dissolution time, and antioxidant activity. Bilberry dry extract was produced by percolation using water as the solvent, then subjected to spray drying and subsequent standardization. Effervescent granules containing 160 mg of bilberry extract per sachet were prepared using the wet granulation method. The proportions of citric acid and tartaric acid critically affect effervescent reaction kinetics, particle hydration, dissolution time, hardness, and stability. Therefore, their ratio was optimized using a factorial design, with citric*



*acid monohydrate (8–12%) as factor A and tartaric acid (16–24%) as factor B. The evaluated responses included moisture content, flow rate, and dissolution time. Physical quality assessments comprised organoleptic properties, pH, moisture content, flow characteristics, and dissolution time. Antioxidant activity was evaluated using the DPPH method and expressed as IC<sub>50</sub> values obtained with a microplate reader. Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA (Yates treatment), followed by Tukey's post hoc test. The GE-EB formulations demonstrated acceptable physical characteristics, with pH values of 5.59–6.65, moisture content of 2.66–2.99%, flow rate of 5.35–5.54 g/s, angle of repose of 27.49°–27.67°, Hausner ratio of 1.13–1.16, Carr's index of 12.10–14.20%, and dissolution time of 1.34–2.54 minutes. Citric acid monohydrate, tartaric acid, and their interaction significantly affected all evaluated responses. Citric acid monohydrate, tartaric acid, and their interaction had a significant effect on all evaluated responses. The optimal formulation contained 10.27% citric acid monohydrate and 16.93% tartaric acid, resulting in granules with a moisture content of 2.81%, a flow rate of 5.51 g/s, and a dissolution time of 1.5 minutes. This formulation demonstrated strong antioxidant activity, with an IC<sub>50</sub> value of 161.74 ± 0.97 µg/mL.*

**Keywords:** *effervescent granules, bilberry extract, factorial design, citric acid monohydrate, tartaric acid*

## PENDAHULUAN

Seiring dengan perkembangan era globalisasi, penggunaan teknologi dan perangkat elektronik meningkat pesat, namun hal ini berpotensi menimbulkan dampak negatif bagi kesehatan masyarakat, salah satunya gangguan pada mata berupa rasa perih dan kering. Kondisi tersebut disebabkan oleh peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS) yang memicu kerusakan sel melalui mekanisme stres oksidatif, ditandai dengan menurunnya aktivitas antioksidan endogen dan meningkatnya jumlah radikal bebas<sup>(1)</sup>. Radikal bebas merupakan spesies molekul reaktif yang tidak stabil, terbentuk selama proses metabolisme alami, dan dapat bertindak sebagai agen oksidator maupun pereduksi, serta jika kondisi stres oksidatif berlangsung lama, dapat menyebabkan kerusakan sel yang berkontribusi pada patogenesis berbagai penyakit *degenerative*<sup>(2)</sup>. Senyawa antioksidan mampu mencegah dan menghambat kerusakan sel<sup>(3)</sup>, sementara penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa konsumsi antioksidan eksogen, seperti delphinidin, sianidin, petunidin, malvidin, dan peonidin, dapat membantu menetralkan radikal bebas dan mencegah stres oksidatif<sup>(4)</sup>.

Salah satu bahan alam yang potensial dikembangkan sebagai suplemen kesehatan mata yaitu bilberi. Selain itu, bilberi juga dilaporkan mampu menurunkan kadar glukosa dan lipid darah serta mengurangi

peradangan, yang diduga berasal dari senyawa utama berupa sianidin dan sianidin-3-glukosida<sup>(5)</sup>. Berdasarkan hasil penelitian oleh Wang, Lan, & Chen 2024<sup>(4)</sup>, ditemukan zat aktif golongan antosianin yang dominan pada bilberi adalah antosianidin yang berkontribusi terhadap kapasitas antioksidan pada bilberi yang menyumbang sekitar 84% dari total aktivitas antioksidan. Potensi antioksidan dari sianidin-3-glukosida maupun aglikon sianidin dilaporkan secara keseluruhan sebanding dengan vitamin E<sup>(6)</sup>.

Bilberi (*Vaccinium myrtillus*) mengandung kadar sianidin tinggi, sehingga beberapa penelitian telah mengembangkan formula suplemen kesehatan menggunakan ekstrak kering bilberi dengan dosis 160 mg<sup>(6,7)</sup>. Berbeda dengan ekstrak dengan kadar air tinggi, ekstrak kering bilberi dapat mengurangi degradasi metabolit sekunder akibat mikroorganisme<sup>(8)</sup>. Meskipun bilberi tersedia dalam bentuk sediaan cair, namun memiliki kelemahan berupa stabilitas fisik dan kimia yang rendah, perubahan pH selama penyimpanan, serta percepatan fermentasi dan pertumbuhan mikroba<sup>(9)</sup>. Masalah ini dapat diatasi dengan pengembangan sediaan padat, seperti granul efervesen, yang lebih mudah dilepaskan dan diserap sehingga meningkatkan ketersediaan senyawa bioaktif<sup>(10)</sup>. Bentuk granul juga relatif stabil terhadap kelembapan udara karena luas permukaannya kecil dan menunjukkan kelarutan lebih tinggi,

stabilitas lebih baik, serta bioavailabilitas lebih tinggi dibandingkan ekstrak kering aslinya<sup>(10,11)</sup>.

Pengembangan granul efervesen ekstrak bilberi (GE-EB) yang berkualitas dipengaruhi oleh komponen asam dan basa. Komponen asam sitrat monohidrat dan asam tartrat sering digunakan, karena asam sitrat monohidrat dapat meningkatkan stabilitas dan memperpanjang masa simpan granul<sup>(12)</sup>. Mengingat asam sitrat bersifat triprotik dan asam tartarat diprotik, konsentrasi asam tartrat perlu lebih tinggi untuk mencapai keseimbangan stoikiometri yang tepat. Kehadiran natrium bikarbonat dalam formulasi juga berperan dalam menghasilkan reaksi efervesen yang kuat<sup>(12)</sup>. Rasio ideal asam sitrat, asam tartrat, dan basa dalam granul efervesen adalah 1 : 2 : 3,4 (b/b/b), karena rasio yang tidak tepat dapat menyebabkan campuran bubuk menjadi lengket dan menyulitkan granulasi, sementara asam tartarat cenderung menghasilkan granul rapuh<sup>(12,13)</sup>.

Hingga saat ini, belum terdapat pengembangan formula optimum untuk granul efervesen ekstrak bilberi (GE-EB) belum ada. Oleh karena itu, pengembangan formula optimum granul efervesen yang mengandung ekstrak bilberi (GE-EB) melalui optimasi kombinasi sumber asam menggunakan metode desain faktorial menjadi sangat penting. Dua faktor digunakan dalam proses optimasi formula, yaitu konsentrasi asam sitrat dan asam tartrat. Respon yang diamati meliputi laju alir, kadar air, dan waktu larut. Batas bawah (-1) dan batas atas (+1) konsentrasi asam sitrat monohidrat dalam optimasi formula masing-masing adalah 8% dan 12%. Selain itu, konsentrasi asam tartarat yang digunakan dalam proses optimasi formula untuk batas bawah (-1) dan batas atas (+1) masing-masing adalah 16% dan 24%. Metode granulasi basah dipilih karena merupakan metode terbaik untuk pembuatan granul efervesen<sup>(11,12)</sup>. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh formula optimum granul efervesen yang mengandung ekstrak bilberi (GE-EB).

## METODE PENELITIAN

Dalam penelitian ini, ekstrak kering buah bilberi (*Vaccinium myrtillus*) diperoleh dari PT. Haldin Pacific Semesta (Indonesia) (Product code : 10002577). Ekstrak kering tersebut diproses menggunakan metode *spray drying* tanpa penambahan pengisi maupun bahan pengawet.

Bahan-bahan tambahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi asam sitrat monohidrat (Weifang Ensign Industry Co., Ltd., China), asam tartarat (Badische Anilin- und Soda Fabrik, Jerman), natrium bikarbonat (Chruch and Dwligh Co., Inc., USA), PVP K-30 (Badische Anilin- und Soda Fabrik, Jerman), maltodekstrin (QinHuang Dao LiHua Starch Co., Ltd., China), aspartam (Shandong Tianjiao Biotech Co., Ltd., China), etanol 96% (PT. Brataco Chemika, Indonesia), dan air suling (PT. Brataco Chemika, Indonesia). Semua bahan digunakan sesuai dengan standar laboratorium untuk menjamin konsistensi dan kualitas penelitian.

### Standardisasi Ekstrak Kering

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kering buah bilberi (*Vaccinium myrtillus*) yang diperoleh dari PT. Haldin Pacific Semesta, Bekasi. Sebelum digunakan, kualitas ekstrak kering dijamin melalui parameter standardisasi, meliputi standardisasi spesifik, yaitu bentuk visual organoleptik, warna, bau, rasa, pH larutan 1% b/b, kadar ekstrak larut air, dan kadar ekstrak larut etanol, serta standardisasi non-spesifik, yaitu kadar abu total, kadar abu tak larut asam, dan kadar air (metode gravimetri)<sup>(14)</sup>.

### Desain Eksperimen Faktorial

Jumlah formula granul efervesen ekstrak bilberi (GE-EB) ditentukan berdasarkan desain faktorial lengkap sebanyak 4 formula. Faktor-faktor yang digunakan untuk optimasi formula dalam penelitian ini adalah asam sitrat monohidrat (konsentrasi 8–12% b/b) sebagai  $X_A$  dan asam tartrat (konsentrasi 16–24% b/b) sebagai  $X_B$ . Kedua faktor tersebut bersifat independen satu sama lain. Parameter respons yang dievaluasi meliputi kadar air ( $Y_1$ ), laju alir

( $Y_2$ ), dan waktu larut ( $Y_3$ ). Sebagai dasar pemilihan untuk kombinasi kedua faktor yaitu untuk asam sitrat dan asam tartrat karena kombinasi keduanya menghasilkan efek sinergis pada laju reaksi efervesen, hidrasi partikel, serta kekerasan dan waktu larut sehingga optimasi proporsi diperlukan untuk performa formulasi optimal<sup>(12)</sup>.

### Formulasi GE-EB

Formula granul efervesen ekstrak bilberi (GE-EB) yang disiapkan dalam penelitian ini untuk proses optimasi merupakan hasil pengembangan preformulasi yang ditunjukkan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Formula Granul Efervesen Ekstrak Bilberi (GE-EB)

Bahan	Fungsi	Konsentrasi (% w/w)			
		F-1	Fa	Fb	Fab
Ekstrak Kering Bilberry (EB)	Bahan aktif	8	8	8	8
Asam sitrat monohidrat	Sumber asam	8	12	8	12
Asam Tartrat	Sumber asam	16	16	24	24
Natrium Bikarbonat	Sumber basa	40	40	40	40
PVP K-30	Pengikat	2	2	2	2
Aspartam	Pemanis	0,25	0,25	0,25	0,25
Maltodextrin	Pengisi	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Ekstrak kering bilberi, asam sitrat monohidrat, asam tartrat, natrium bikarbonat, aspartam, PVP K-30, dan maltodekstrin ditimbang sesuai konsentrasinya. Setiap eksipien dalam formula dihaluskan secara terpisah untuk mengecilkan ukuran partikel. Semua eksipien dan ekstrak bilberi kemudian dicampur dan digranulasi dengan bantuan larutan PVP K-30 dalam etanol 96% sebagai pengikat. Granul basah tersebut diayak menggunakan ayakan 18 mesh kemudian dikeringkan pada suhu 45°C selama 1–2 jam sehingga kadar air granul kurang dari 5%. Granul kering yang dihasilkan kemudian diayak menggunakan ayakan 20 mesh. Kualitas granul efervesen yang dihasilkan dievaluasi secara keseluruhan, meliputi sifat organoleptik, laju alir, sudut istirahat (*angle of repose*), rasio Hausner, indeks Carr, kadar air, pH, dan waktu larut. Evaluasi kualitas

fisik granul efervesen dilakukan dua kali, yaitu sebelum dan setelah rekonstitusi.

### Evaluasi Kualitas Granul Efervesen Ekstrak Kering Bilberi (GE-EB) Sebelum Rekonstitusi

#### Organoleptik

Uji organoleptik granul efervesen ekstrak kering bilberi (GE-EB) sebelum rekonstitusi, meliputi warna, bentuk, dan bau preparat GE-EB. Granul efervesen yang mengandung ekstrak kering bilberi berbentuk butiran, berwarna merah keunguan, dan memiliki aroma khas bilberi.

#### Laju Alir dan Sudut Diam

Tujuan dilakukan uji laju alir dan sudut diam untuk mengetahui sifat alir dan sudut diam granul secara langsung. Metode ini dilakukan menggunakan corong<sup>(15)</sup>. Sebanyak 100 gram granul efervesen ditimbang

dan dimasukkan ke dalam corong yang ujungnya tertutup. Waktu alir granul diamati menggunakan *stopwatch*, dimulai dari saat tutup corong dibuka hingga semua granul melewati corong secara sempurna sebagai titik akhir. Laju alir dan sudut diam granul

kemudian dihitung menggunakan Persamaan <sup>(1)</sup> dan <sup>(2)</sup>. Laju alir granul efervesen yang baik seharusnya lebih cepat dari 10 g/detik <sup>(16)</sup>. Selain itu, preparat granul efervesen dengan sifat alir yang baik seharusnya membentuk sudut diam antara 25–40° <sup>(15,17)</sup>.

$$\text{Laju alir granul} = \text{bobot granul/waktu alir granul} \dots \dots \dots (\text{Persamaan 1})$$

$$\text{Tan } \alpha (\alpha = \text{sudut diam}) = \text{tinggi kerucut/jari-jari alas kerucut} \dots \dots \dots (\text{Persamaan 2})$$

**Rasio Hausner dan Indeks Carr**

Rasio Hausner dan indeks Carr merupakan dua parameter tidak langsung yang digunakan untuk menunjukkan sifat aliran dan kompresibilitas granul, yang didasarkan pada kerapatan pukul (*tapped density*) dan kerapatan curah (*bulk density*) granul, yang dipengaruhi oleh gesekan antarpartikel <sup>(15)</sup>. Eksperimen ini dilakukan dengan menimbang gelas ukur kosong berkapasitas 100 mL (W1). Granul efervesen dimasukkan perlahan ke dalam gelas ukur hingga mencapai tanda 100 mL (V1), kemudian berat gelas ukur yang telah terisi

dicatat (W2). Mulut gelas ukur ditutup dan dipasang pada alat pemukul (*tap equipment*) dan dijalankan selama 5 menit pertama. Volume granul diukur (V5), kemudian dilanjutkan lagi hingga menit ke-12 dan volume akhir yang dihasilkan diukur (V12). Kerapatan curah, kerapatan pukul, dan rasio Hausner dihitung menggunakan Persamaan 3, sedangkan indeks Carr ditentukan menggunakan Persamaan 4. Granul dengan sifat aliran yang baik sebaiknya memiliki parameter berikut: rasio Hausner 1,12–1,18 dan indeks Carr 11–15% <sup>(15)</sup>.

$$\text{Hausner ratio} = \text{tapped density (pt)/bulk density (pb)} \dots \dots \dots (\text{Persamaan 3})$$

$$\text{Carr's index (\%)} = x \ 100 \dots \dots \dots (\text{Persamaan 4})$$

**Kadar Air**

Kadar air ditentukan menggunakan alat *moisture analyzer* (Sartorius Moisture Analyzer, tipe MA 30, Germany) (Lima et al., 2020). Sampel GE-EB sebanyak 3 g dimasukkan ke dalam wadah alat, kemudian perangkat dinyalakan hingga nilai kadar air pada monitor alat mencapai nilai konstan. Kadar air yang sesuai untuk granul efervesen yang baik adalah ≤ 5% <sup>(18)</sup>.

**Evaluasi Kualitas Granul Efervesen Ekstrak Kering Bilberi (GE-EB) Setelah Rekonstitusi**

**Organoleptik**

Uji organoleptik dilakukan setelah dilarutkan, meliputi warna, bentuk, dan rasa sediaan GE-EB. Selain itu, reaksi efervesen ditandai dengan terbentuknya gelembung gas karbon dioksida yang dapat diamati menggunakan mikroskop.

Secara keseluruhan, granul efervesen yang mengandung ekstrak kering bilberi harus memiliki bentuk granul, berwarna merah keunguan, memiliki aroma khas bilberi, rasa manis dan asam, serta mampu menghasilkan gas karbon dioksida.

**Nilai pH**

Evaluasi tingkat keasaman atau kebasaaan suatu zat atau larutan dilakukan dengan menentukan nilai pH <sup>(19)</sup>. Pengukuran nilai pH dilakukan dengan melarutkan satu *sachet* (20 g) GE-EB dalam 250 mL air pada suhu sekitar 25 °C. Nilai pH yang ideal untuk granul efervesen adalah 5,5–7,5 <sup>(20)</sup>.

**Pelarutan Granul Efervesen**

Uji pelarutan granul efervesen bertujuan untuk menentukan waktu yang dibutuhkan sediaan untuk larut secara sempurna dalam air <sup>(21)</sup>. Uji dilakukan dengan melarutkan 20 g (satu *sachet*) GE-EB dalam

250 mL pada suhu sekitar 25°C. Waktu yang dibutuhkan untuk pelarutan lengkap granul dicatat setelah pelepasan gas karbon dioksida berhenti. Waktu pelarutan yang baik untuk granul efervesen adalah  $\leq 5$  menit <sup>(15)</sup>.

#### **Aktivitas Antioksidan**

Aktivitas antioksidan sampel dapat dievaluasi menggunakan metode *96-well plate* dengan DPPH <sup>(22)</sup>. Pada penelitian ini, uji aktivitas antioksidan dilakukan pada formula optimum GE-EB yang ditentukan menggunakan program *Design Expert*. Prosedur persiapan uji aktivitas antioksidan sampel pada penelitian ini dijelaskan sebagai berikut.

#### **Persiapan Larutan Uji Asam Askorbat**

Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif dalam uji aktivitas antioksidan. Larutan referensi dibuat dengan menimbang 25 mg asam askorbat dan melarutkannya dalam 25 mL pelarut campur (metanol:air = 1:1 v/v), sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 1.000  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan stok asam askorbat kemudian diencerkan menggunakan pelarut campur, sehingga diperoleh enam larutan uji asam askorbat dengan konsentrasi 0,10; 0,30; 0,60; 1,25; 2,50; dan 5,00  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Preparasi Larutan Uji Ekstrak Kering Bilberry (BE)**

Larutan stok ekstrak kering bilberi (1.000  $\mu\text{g/mL}$ ) disiapkan dengan menimbang 100 mg BE, kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarut campur (metanol:air = 1:1 v/v). Larutan stok BE selanjutnya diencerkan (1:1% v/v) untuk memperoleh berbagai konsentrasi larutan uji kerja BE, yaitu 7,50; 15,0; 30,0; 60,0; dan 125  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Preparasi Larutan Uji Granul Efervesen Ekstrak Kering Bilberi (GE-EB)**

Larutan stok GE-EB (100.000  $\mu\text{g/mL}$ ) disiapkan dengan melarutkan 1,0 g BE dalam 10 mL pelarut campur (metanol:air = 1:1, v/v). Larutan stok GE-EB kemudian diencerkan menggunakan pelarut campur sehingga diperoleh 5 konsentrasi yang berbeda, yaitu 7,50; 15,0; 30,0; 60,0; dan 125  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **Preparasi Campuran Larutan Uji dan Larutan DPPH**

Larutan stok DPPH disiapkan dengan menimbang 25 mg DPPH dan melarutkannya dalam 25 mL metanol dan dilakukan vortex hingga terlarut. Sebanyak 1 mL larutan stok tersebut kemudian diencerkan dengan metanol dalam labu ukur 25 mL sehingga diperoleh konsentrasi DPPH sebesar 40 mg/L <sup>(23)</sup>. Rasio antara larutan uji dan larutan DPPH yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1:2 (v/v). Larutan tersebut mengandung pelarut campur (metanol:air = 1:1, v/v) dan larutan DPPH. Campuran larutan uji dan larutan DPPH diinkubasi selama 30 menit di tempat gelap pada suhu ruang. Nilai absorbansi campuran larutan uji dan larutan DPPH kemudian diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 517 nm.

#### **Analisis Data**

Data dianalisis secara statistik menggunakan uji ANOVA satu arah pada tingkat kepercayaan 95% dengan perangkat lunak IBM SPSS *Statistics* versi 25.0 untuk menentukan adanya perbedaan yang signifikan antara formula, serta menggunakan uji *independent t-test* untuk mengidentifikasi adanya perbedaan antara bet. Apabila melalui ANOVA satu arah diperoleh perbedaan yang signifikan, maka analisis statistik dilanjutkan dengan uji *Post Hoc HSD (Honestly Significant Difference)*. Data diolah menggunakan perangkat lunak *Design Expert* versi 12.0.3 dengan pendekatan *Yates Treatment* pada tingkat kepercayaan 95% <sup>(24)</sup> untuk memperoleh formula optimum granul efervesen yang mengandung ekstrak bilberi (GE-EB).

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Standarisasi Ekstrak Kering Bilberi (BE)**

Standarisasi spesifik dan non-spesifik pada ekstrak kering bertujuan untuk menjamin mutu, keamanan, dan konsistensi produk. Standarisasi spesifik memastikan identitas serta kadar senyawa aktif agar efek terapeutik tetap konsisten, sedangkan standarisasi non-spesifik berfokus pada kemurnian dan keamanan dengan menguji

parameter seperti kadar air, cemaran, dan kualitas fisik-kimia ekstrak. Ekstrak kering bilberi (*Vaccinium myrtillus*) yang diperoleh dalam penelitian ini berwarna ungu, memiliki aroma khas bilberi, rasa manis-asam, serta menghasilkan gas karbon dioksida setelah direkonstitusi dalam air. Selain itu, ekstrak kering bilberi bersifat asam, dan larutan 1% (b/v) menunjukkan nilai pH sebesar  $3,97 \pm 0,05$ . Nilai pH pada ekstrak kering bilberi yang relatif asam akan mempengaruhi stabilitas senyawa aktif, terutama antosianin. Kondisi asam mempertahankan stabilitas dan aktivitas antioksidan, sedangkan pH lebih tinggi mempercepat degradasi senyawa sehingga menurunkan kualitas dan efektivitas ekstrak. Sifat asam ekstrak kering bilberi dikaitkan dengan keberadaan senyawa antosianin (delphinidin-3-glukosida, sianidin-3-glukosida, malvidin-3-glukosida), yang merupakan glikosida dari antosianidin. Senyawa-senyawa ini sering terkonjugasi dengan gugus asam, seperti asam sinamat atau asam galat, sehingga memiliki karakter

sedikit asam dan memberikan warna ungu kebiruan khas bilberi, serta berperan sebagai agen antioksidan yang kuat <sup>(25)</sup> <sup>(26)</sup>. Bilberi dikenal mengandung kadar antosianin total yang tinggi, dengan laporan variasi total 236–656 mg antosianin per 100 g buah segar (ekivalen 2,36–6,56 mg/g) pada populasi liar yang setara sebagai mg/100 g fresh weight) <sup>(22)</sup>. Data kuantitatif tersebut penting dalam standarisasi dan reproduksibilitas ekstrak, karena profil dan konsentrasi antosianin berpengaruh terhadap aktivitas fisiologis dan stabilitas sediaan. Penetapan kadar sari larut air dan sari larut etanol bertujuan untuk mengarakterisasi kadar senyawa dalam berbagai pelarut berdasarkan polaritasnya. Kadar sari larut air diperoleh jauh lebih tinggi dibandingkan kadar sari larut etanol, yang menunjukkan bahwa bilberi memiliki kelarutan lebih tinggi dalam air dibandingkan dalam etanol <sup>(25)</sup> <sup>(26)</sup>. Hasil standarisasi ekstrak kering bilberi disajikan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Standardisasi Ekstrak Kering Bilberi (*Vaccinium myrtillus*) (EB)

Parameter Standarisasi	Hasil
Non spesifik	
Kadar Abu Total (%)	$0,63 \pm 0,04$
Kadar Abu Larut Asam (%)	$0,23 \pm 0,01$
Kadar Abu Larut Air (%)	$0,42 \pm 0,01$
Kadar Air (%)	$3,75 \pm 0,42$
Spesifik	
Organoleptis	
- Bentuk	Serbuk
- Warna	Ungu
- Bau	Aroma Bilberi
Kadar Sari Larut Air (%)	$95,54 \pm 1,09$
Kadar Sari Larut Etanol (%)	$1,79 \pm 0,30$

Antosianin (sianidin-3-glukosida) sebagai senyawa aktif dari EB (*Vaccinium myrtillus*) terdeteksi sebagaimana ditunjukkan pada profil kromatogram kromatografi lapis tipis (KLT) saat diamati di bawah sinar UV 254 nm dan VIS 366 nm. Silika gel 60 GF<sub>254</sub> digunakan sebagai fase diam (pelat KLT), sedangkan campuran butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5, v/v/v) digunakan sebagai fase gerak. Tarragó-Celada dan Novell <sup>(2019)</sup> <sup>(27)</sup> melaporkan bahwa senyawa antosianin aktif

dalam bilberry tampak sebagai noda berwarna biru di bawah sinar UV 366 nm dengan nilai Rf 0,6. Profil KLT granul efervesen ekstrak kering bilberry yang diamati dalam penelitian ini (Rf = 0,59) menunjukkan noda berwarna biru yang sama dengan ekstrak kering bilberi (Rf = 0,58). Hasil ini menunjukkan bahwa antosianin (sianidin-3-glukosida) sebagai senyawa aktif, teridentifikasi baik dalam sediaan granul efervesen ekstrak kering bilberi maupun dalam ekstrak kering bilberi.



**Gambar 1.** Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dari GE-EB dan EB dengan fase gerak : air (4 : 1 : 5, %v/v/v)

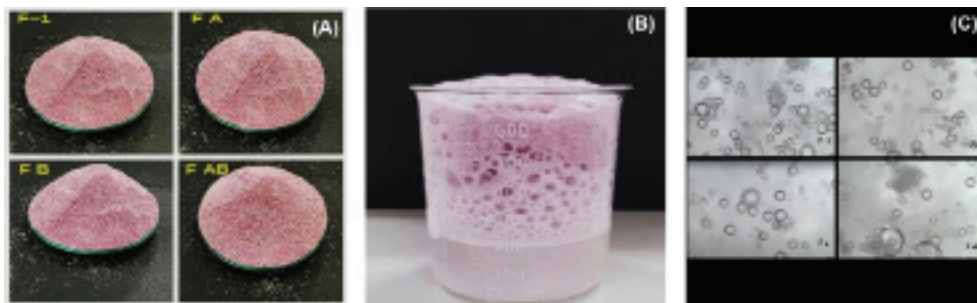
Keterangan:

(A) F-1, (B) Fa, (C) Ekstrak bilberi, (D) Fb, (E) Fab, dan (F) FBlanko dengan pengamatan sinar uv 366 nm.

### Evaluasi Granul Efervesen Ekstrak Kering Bilberi (GE-EB) Sebelum Rekonstitusi Organoleptik

Hasil uji secara organoleptik menunjukkan bahwa granul efervesen ekstrak

kering bilberi sebelum rekonstitusi dengan air berwarna merah keunguan dan berbentuk granul. Selain itu, granul efervesen tersebut memiliki aroma khas bilberi (Gambar 2).



**Gambar 2.** Pengamatan organoleptik GE-EB

Keterangan:

Sebelum rekonstitusi (A), setelah rekonstitusi (B), dan pengamatan terbentuknya gelembung gas karbon dioksida yang diamati pada perbesaran 1000× menggunakan mikroskop digital TRM-DM1000 (C).

### Pengukuran pH

Nilai pH yang diukur pada empat formula granul efervesen ekstrak kering bilberry menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $F_{hitung} > F_{tabel, \alpha} = 0,05$ ) sebagaimana ditampilkan pada **Tabel 3**. Perbedaan ini kemungkinan berkaitan dengan komposisi formula GE-EB yang mengandung komponen

asam (asam sitrat dan asam tartrat), serta sifat intrinsik ekstrak bilberi itu sendiri. Hasil ini sesuai dengan teori Brønsted–Lowry yang menyatakan bahwa asam dapat bertindak sebagai zat yang menghasilkan ion  $H^+$  dalam air. Dengan demikian, penambahan asam akan meningkatkan konsentrasi ion hidronium dalam air <sup>(15)</sup>.

**Tabel 3.** Keasaman, Sifat Alir, dan Kadar Air Granul Efervesen Ekstrak Kering Bilberi

Parameter	F-1	Fa	Fb	Fab	F <sub>calc</sub>
pH	6,07 ± 0,05	5,94 ± 0,04	5,85 ± 0,05	5,46 ± 0,12	82,03
Kecepatan alir (g/sec)	5,35 ± 0,06	5,43 ± 0,04	5,47 ± 0,08	5,54 ± 0,10	6,627
Sudut diam (°)	27,49 ± 0,87	27,46 ± 1,13	27,55 ± 1,07	27,67 ± 0,65	63,61
Hausner ratio	1,14 ± 0,01	1,16 ± 0,01	1,15 ± 0,01	1,13 ± 0,01	51,54
Carr's index (%)	13,00 ± 0,60	14,20 ± 1,10	13,05 ± 1,00	12,10 ± 0,75	55,36
Kadar air (%)	2,66 ± 0,15	2,78 ± 0,13	2,89 ± 0,17	2,99 ± 0,10	18,66

### Sifat Alir

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini untuk menunjukkan sifat alir GE-EB meliputi laju alir, sudut diam, rasio Hausner, dan indeks Carr. Terdapat perbedaan yang signifikan pada seluruh parameter yang berkaitan dengan sifat alir GE-EB antar formula, di mana nilai  $F_{hitung} > F_{tabel}$  ( $\alpha = 0,05$ ). Selain itu, seluruh formula GE-EB menunjukkan sifat alir yang baik sebagaimana ditunjukkan oleh parameter berikut: laju alir  $< 10$  g/detik, sudut diam  $< 35^\circ$ , rasio Hausner  $< 1,25$ , dan indeks Carr  $< 20\%$  (15). Menurut Qiu et al (2017)(28), sifat granul bersifat sangat kompleks dan dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk kelembapan serta bentuk dan ukuran partikel. Nilai kadar air GE-EB yang diperoleh pada seluruh formula memenuhi spesifikasi, yaitu  $3,00 \pm 0,50\%$  (Tabel 3).

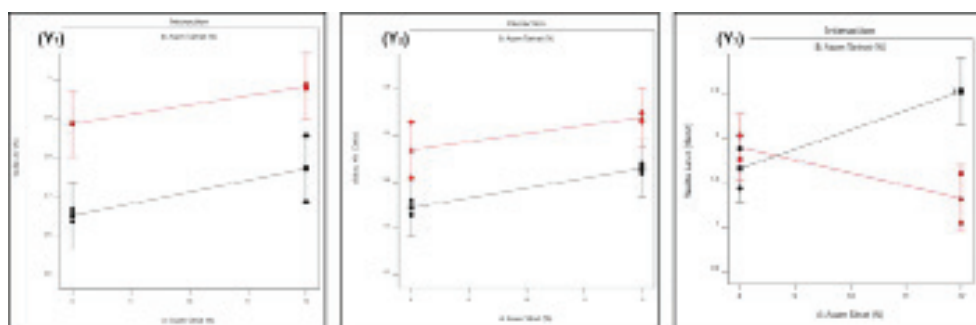
### Evaluasi Granul Efervesen Ekstrak Kering Bilberi (GE-EB) Setelah Rekonstitusi Organoleptik

Pemeriksaan organoleptik GE-EB setelah rekonstitusi dalam air memenuhi spesifikasi, yaitu berwarna merah keunguan dan berbentuk larutan dengan rasa manis-asam. Selain itu, larutan yang dihasilkan

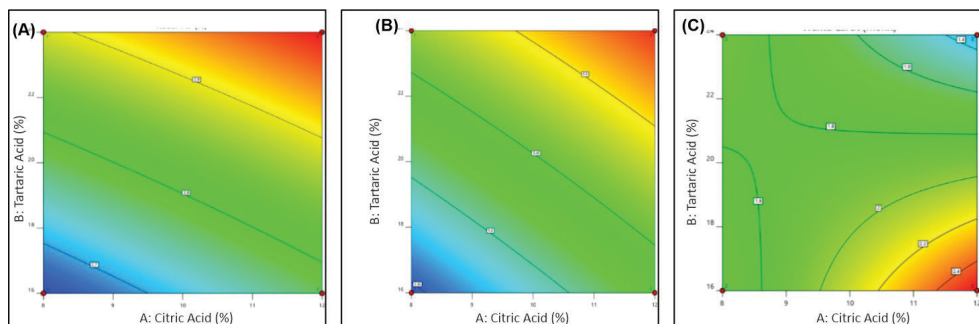
membentuk gelembung gas karbon dioksida (Gambar 2).

### Pengukuran pH

Nilai pH dari empat formula GE-EB (F-1, Fa, Fb, Fab) setelah rekonstitusi adalah sebagai berikut: F-1 ( $6,65 \pm 0,03$ ), Fa ( $6,27 \pm 0,04$ ), Fb ( $5,81 \pm 0,08$ ), Fab ( $5,59 \pm 0,08$ ), blanko-1 ( $6,57 \pm 0,03$ ), dan blanko Fab ( $5,70 \pm 0,01$ ). Nilai pH yang diperoleh pada seluruh formula GE-EB setelah rekonstitusi memenuhi spesifikasi, yaitu berada dalam rentang  $6,00 \pm 1,50$  (29). Namun demikian, nilai pH pada seluruh formula GE-EB menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $F_{hitung} > F_{tabel}$  ( $\alpha = 0,05$ ), yang kemungkinan berkaitan dengan perbedaan proporsi komponen asam dalam formula. Hal ini dapat dikaitkan dengan komposisi formula GE-EB yang mengandung komponen asam (asam sitrat dan asam tartrat) serta sifat intrinsik ekstrak bilberi itu sendiri. Hasilnya sejalan dengan teori *Brønsted-Lowry* yang menyatakan bahwa asam dapat bertindak sebagai zat yang menghasilkan ion  $H^+$  dalam air. Oleh karena itu, penambahan asam akan meningkatkan konsentrasi ion hidronium dalam air (15).



**Gambar 3.** Interaksi antara faktor  $X_A$  (asam sitrat) dan  $X_B$  (asam tartrat) terhadap respon  $Y_1$  (kadar air),  $Y_2$  (waktu alir), and  $Y_3$  (waktu larut) sediaan GE-EB



Gambar 4. Contour plot dari respon  $Y_1$  (kadar air),  $Y_2$  (waktu alir), and  $Y_3$  (waktu larut) sediaan GE-EB

### Optimasi Formula Respon Kadar Air

Proses pengeringan terhadap granul basah dilakukan pada kelembapan relatif (*relative humidity*/RH)  $\leq 25\%$  dan suhu sekitar  $25^\circ\text{C}$ . Kondisi ini bertujuan untuk mencegah penyerapan uap air dari udara sekitar oleh granul effervesen. Nilai kadar air pada seluruh formula GE-EB berada dalam rentang 2,5–3,0% (Tabel 3). Nilai kadar air granul yang dihasilkan kurang dari 5% (18). Berdasarkan analisis optimasi formula GE-EB dengan metode perlakuan Yates (Gambar 3- $Y_1$ ), pada respon kadar air menunjukkan bahwa asam sitrat ( $X_A$ ) tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar air ( $F_{\text{hitung}}^{(6,18)} < F_{\text{tabel}} (\alpha=0,05)^{(6,59)}$ ). Sebaliknya, asam tartrat ( $X_B$ ) menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap kadar air ( $F_{\text{hitung}}^{(26,49)} > F_{\text{tabel}} (\alpha=0,05)^{(6,59)}$ ). Demikian pula, interaksi antara asam sitrat dan asam tartrat ( $X_A X_B$ ) juga memberikan pengaruh signifikan terhadap kadar air ( $F_{\text{hitung}}^{(32,67)} > F_{\text{tabel}} (\alpha=0,05)^{(6,59)}$ ). Persamaan polinomial yang diperoleh untuk respon kadar air adalah:  $Y_1 = 2,82 + 0,054X_A + 0,11X_B + 0,00625X_A X_B$  (Gambar 4- $Y_1$ ). Persamaan tersebut menunjukkan bahwa asam tartrat ( $X_B$ ) memiliki pengaruh yang lebih besar terhadap kadar air dibandingkan dengan asam sitrat. Asam tartrat memiliki sifat yang lebih higroskopis dibandingkan asam sitrat monohidrat(12). Menurut Kalman (2021)(30), higroskopisitas adalah kemampuan suatu zat kimia untuk menyerap dan melepaskan air. Dengan demikian, peningkatan konsentrasi asam tartrat sebagai eksipien yang bersifat

sangat higroskopis dalam sediaan GE-EB berpotensi meningkatkan kadar air dalam granul. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh meningkatnya kapasitas adsorpsi uap air.

### Respons Laju Alir

Sifat alir granul yang kurang baik dapat menyebabkan variasi bobot antar unit dosis (*sachet*) pada skala produksi (18). Pada penelitian ini, seluruh formula GE-EB memenuhi persyaratan laju alir, yaitu  $< 10$  g/detik (Tabel 3). Berdasarkan analisis optimasi formula GE-EB menggunakan metode Yates dengan respons laju alir (Gambar 3), asam tartarat ( $X_B$ ) memberikan pengaruh yang signifikan terhadap laju alir granul ( $F_{\text{hitung}}^{(13,72)} > F_{\text{tabel}} (\alpha=0,05)^{(6,59)}$ ). Demikian pula, interaksi antara asam sitrat dan asam tartrat ( $X_A X_B$ ) juga menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap laju alir granul ( $F_{\text{hitung}}^{(19,69)} > F_{\text{tabel}} (\alpha=0,05)^{(6,59)}$ ). Persamaan polinomial yang diperoleh untuk respons laju alir adalah:  $Y_2 = 5,44 + 0,039X_A + 0,059X_B - 0,00375X_A X_B$  (Gambar 4- $Y_2$ ). Berdasarkan nilai koefisien pada persamaan tersebut, asam tartrat ( $X_B$ ) merupakan faktor yang paling dominan mempengaruhi laju alir granul. Laju alir granul dipengaruhi oleh bentuk kristal zat penyusunnya. Asam sitrat monohidrat memiliki bentuk kristal ortorombik, sedangkan asam tartrat memiliki bentuk kristal monoklinik. Bentuk kristal ortorombik umumnya menunjukkan sifat alir yang lebih baik dibandingkan bentuk monoklinik (31). Oleh karena itu, perbedaan bentuk kristal kedua asam tersebut dapat menyebabkan perbedaan atau perubahan

pada laju alir<sup>(18)</sup>. Selain itu, gaya elektrostatis, ukuran partikel, distribusi ukuran partikel, serta kadar air dalam granul juga dilaporkan dapat memengaruhi laju alir<sup>(18)</sup>. Meskipun asam sitrat monohidrat dan asam tartrat secara individual menunjukkan pengaruh positif terhadap laju alir, interaksi keduanya tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap laju alir granul (Gambar 3-Y<sub>2</sub> dan 4-Y<sub>2</sub>).

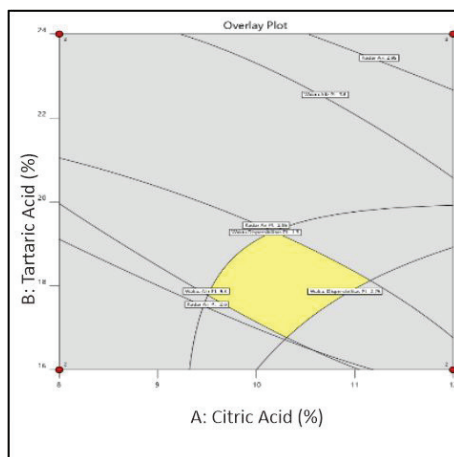
### Respons Waktu Disolusi Granul

Waktu disolusi granul effervesen harus memenuhi persyaratan yaitu kurang dari 5 menit<sup>(15)</sup>. Waktu disolusi GE-EB pada penelitian ini berada dalam rentang 1,00–2,50 menit (Tabel 3), sehingga seluruh formula memenuhi persyaratan yang ditetapkan. Berdasarkan analisis optimasi formula GE-EB menggunakan metode Yates dengan respons waktu disolusi (Gambar 3-Y<sub>3</sub>), asam sitrat (X<sub>A</sub>) tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap waktu disolusi granul ( $F_{hitung}^{(0,6108)} < F_{tabel} (\alpha=0,05)$ <sup>(6,59)</sup>). Demikian pula, asam tartrat (X<sub>B</sub>) juga tidak memberikan pengaruh signifikan secara individual ( $F_{hitung}^{(6,39)} < F_{tabel} (\alpha=0,05)$ <sup>(6,59)</sup>). Sebaliknya, interaksi antara asam sitrat dan asam tartrat (X<sub>A</sub>X<sub>B</sub>) menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap waktu disolusi granul ( $F_{hitung}^{(7,0008)} > F_{tabel} (\alpha=0,05)$ <sup>(6,59)</sup>). Persamaan polinomial yang diperoleh untuk respons waktu disolusi granul GE-EB adalah:  $Y_3 = 1,86 + 0,075X_A - 0,24X_B + 0,3625X_A X_B$  (Gambar 4-Y<sub>3</sub>). Persamaan tersebut menunjukkan bahwa asam tartrat (X<sub>B</sub>) memiliki pengaruh yang lebih dominan dalam mempercepat penurunan waktu disolusi dibandingkan asam sitrat maupun interaksi keduanya, sebagaimana ditunjukkan oleh nilai koefisiennya. Hal ini disebabkan pengaruh jenis asam tartrat yang digunakan yaitu bentuk anhidratnya. Menurut Aulton dan Taylor<sup>(2022)(15)</sup>, bentuk anhidrat suatu zat umumnya memiliki laju kelarutan yang lebih cepat dibandingkan bentuk hidratnya. Setelah GE-EB dilarutkan dalam air, asam sitrat monohidrat dan asam tartrat akan bereaksi dengan natrium bikarbonat dalam

formula, menghasilkan garam natrium, air, dan gas karbon dioksida. Konversi asam lemah menjadi garam natriumnya dapat meningkatkan konstanta disosiasi ionik, yang selanjutnya meningkatkan kelarutan granul<sup>(15)</sup>.

### Formula Optimum

Berdasarkan *contour plot* dari tiga respon yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu kadar air, laju alir, dan waktu disolusi, proporsi asam sitrat monohidrat dan asam tartrat sebagai komponen asam diketahui berperan dalam penentuan formula optimum GE-EB. *Contour plot* dari masing-masing respons kemudian di *overlay* atau disuperimposisikan untuk memperoleh formula optimum GE-EB. Area berwarna kuning menunjukkan prediksi formula optimum GE-EB (Gambar 5). Secara keseluruhan, perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian ini merekomendasikan kombinasi asam sitrat monohidrat (10,27%) dan asam tartrat (16,93%) yang merupakan presentase berat terhadap total formula optimum. Prediksi nilai respon dari formula optimum GE-EB adalah laju alir sebesar 5,51 g/detik, kadar air sebesar 2,83%, dan waktu disolusi selama 1,45 menit. Formula optimum yang disarankan kemudian dibuat, dan respons aktual dari formula yang telah disiapkan dicatat serta dibandingkan dengan respon prediksi yang diperoleh dari perangkat lunak untuk verifikasi formula GE-EB. Formula GE-EB yang telah dibuat menunjukkan respons aktual berupa kadar air sebesar 2,81%, laju alir sebesar 5,51 g/detik, dan waktu disolusi selama 1,50 menit. Perbedaan antara nilai prediksi dan aktual sangat kecil (<0,05%), menandakan validitas model optimasi dan konsistensi proses pembuatan. Dengan demikian, formula optimum yang disarankan oleh perangkat lunak dalam penelitian ini telah terverifikasi, karena ketiga respons aktual berada dalam rentang prediksi formula optimum dan memenuhi persyaratan mutu granul effervesen yang baik.

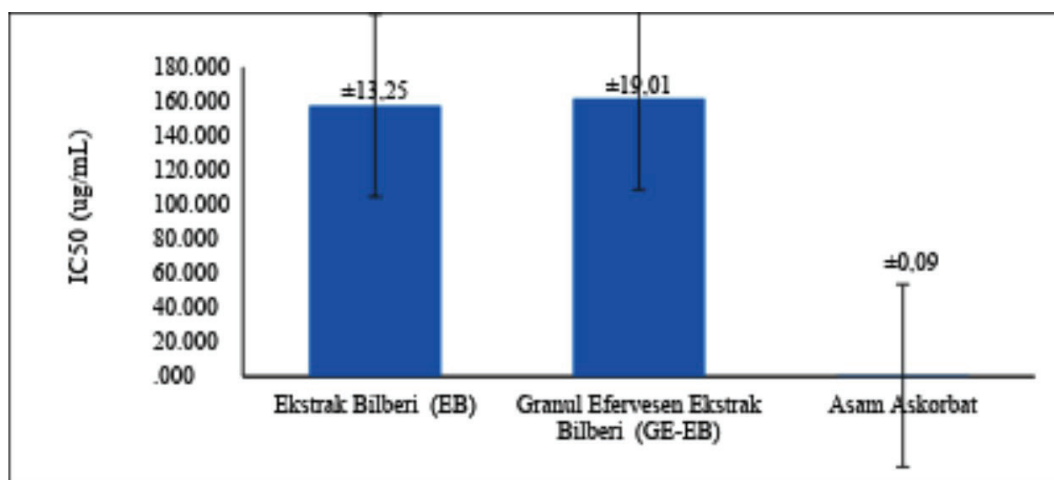


Gambar 5. Superimposed (overlay plot) of GE-EB.

### Aktivitas Penangkap Radikal DPPH dari GE-EB

Uji aktivitas antioksidan dilakukan terhadap BE dan GE-EB untuk mengetahui aktivitas antioksidan formula optimum GE-EB menggunakan metode DPPH dengan parameter nilai  $IC_{50}$  (32). Asam askorbat sebagai senyawa antioksidan sintetis digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian ini. Gambar 6 menunjukkan bahwa BE dan sediaan GE-EB memiliki aktivitas antioksidan yang ditunjukkan oleh nilai  $IC_{50}$  berturut-turut  $157,68 \pm 13,25 \mu\text{g/mL}$  dan  $161,74 \pm 19,01 \mu\text{g/mL}$ . Analisis data menggunakan *one-way* ANOVA diperoleh nilai  $IC_{50}$  vitamin C, BE, dan GE-EB berbeda secara signifikan ( $F_{hitung}^{(368,52)} > F_{tabel} (\alpha = 0,05)$  (5,14)). Penghambatan aktivitas antioksidan

suatu senyawa dapat bervariasi akibat adanya hambatan spasial yang menutupi gugus hidroksil, fenol, karbonil, dan amida aromatik yang terdapat dalam masing-masing senyawa(32). Berdasarkan sistem klasifikasi aktivitas antioksidan menurut Blois(32), senyawa antioksidan dibagi menjadi empat kategori, yaitu: antioksidan sangat kuat ( $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ), antioksidan kuat ( $50 \mu\text{g/mL} \leq IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ ), antioksidan sedang ( $101 \mu\text{g/mL} \leq IC_{50} \leq 150 \mu\text{g/mL}$ ), dan antioksidan lemah ( $IC_{50} > 150 \mu\text{g/mL}$ ). Berdasarkan klasifikasi tersebut, asam askorbat memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat ( $0,53 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ ), sedangkan BE dan GE-EB dengan nilai  $IC_{50}$  masing-masing sebesar  $157,68 \pm 13,25 \mu\text{g/mL}$  dan  $161,74 \pm 19,01 \mu\text{g/mL}$  termasuk dalam kategori antioksidan lemah.



Gambar 6. Nilai  $IC_{50}$  dari EB, GE-EB, dan asam askorbat.

## SIMPULAN

Formula optimum granul efervesen ekstrak kering bilberi dapat diperoleh dengan menggunakan konsentrasi kombinasi asam sitrat 10,27% dan konsentrasi asam tartrat 16,93%. Formula optimum GE-EB yang telah dilakukan verifikasi formula menunjukkan nilai respon berupa kadar air sebesar 2,81%, laju alir sebesar 5,51 g/detik, dan waktu disolusi selama 1,50 menit. Formula optimum GE-EB ini menunjukkan aktivitas antioksidan yang tergolong lemah dengan nilai IC<sub>50</sub> penangkapan radikal bebas sebesar 161,74 ± 19,01 µg/mL.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih atas fasilitas penelitian yang telah disediakan oleh Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Tumilaar, S.G., Hardianto, A., Dohi, H., and Kurnia, D. Review article: A comprehensive review of free radicals, oxidative stress, and antioxidants: overview, clinical applications, global perspectives, future directions, and mechanisms of antioxidant activity of flavonoid compounds. *Journal of Chemistry*, 2024. 1-21. DOI: <https://doi.org/10.1155/2024/5594386>
2. Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., and Maciejewski, R. Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*. 2021. 14(15):2-54. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma14154135>
3. Abdu, S., Saranga, J.L., Sulu, V., and Wahyu, R. Dampak penggunaan gadget terhadap penurunan ketajaman penglihatan. *Jurnal Keperawatan Florence Nightingale*. 2021. 4(1): 24-30.
4. Wang, L., Lan, W., and Chen, D. Review blueberry (*Vaccinium spp.*) anthocyanins and their functions, stability, bioavailability, and applications. *Foods*. 2024. 13: 2851, 2-19. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13172851>
5. Sadowska-Bartosz, I. and Bartosz, G. Review antioxidant activity of anthocyanins and anthocyanidins: A critical review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024. 25: 12001. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms252212001>
6. Neamtu, A.A., Kovacs, R.Z., Mihok, E., Georgescu, C., Trucus, V., Olah, N.K., Frum, A., Tita, O., Neamtu, C., Kovacs, Z.S., Cziaky, Z., and Mathe, E. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extracts comparative analysis regarding their phytonutrient profiles, antioxidant capacity along with the *in vivo* rescue effects tested on a *Drosophila melanogaster* high-sugar diet mode. *Antioxidants*. 2020. 9(2): 1-33.
7. Pizzorno, J.E. and Murray, M.T. *Textbook of Natural Medicin.*, 2020. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier, London.
8. Xue, H., Zhao, J., Wang, Y., Shi, Z., Xie, K., Liao, X., and Tan, J. Factor affecting stability of anthocyanins and strategies for improving their stability: A review. *Food Chemistry*: 2024. X, 24: 101883, Elsevier.
9. Mengesha, Y., Tebeje, A., and Tilahun, B. A review on factors influencing the fermentation process of Teff (*Eragrostis teff*) and other cereal-based Ethiopian Injera. *International Journal of Food Science*. 2022. 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/4419955>
10. Lima, A.L., Pinho, L.A.G., Chaker, J.A., Barreto, L.L.S., Marreto, S.N., Gratieri, T., Gelfuso, G.M., and Filho, M.C. Hot-melt extrusion as an advantageous technology to obtain effervescent drug products. 2020. *Pharmaceutics*, 12: 1-20.
11. Mahdiyyah, M., Puspitasari, I.M., Putriana, N.A., and Syamsunamo, R.A.A. Review: Formulasi dan evaluasi sediaan oral effervescent. *Majalah Farmasetika*. 2020. 5(4): 191-203.
12. Bertuzzi, G. 'Effervescent granulation' in Parikh, D.M. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. 2020. 4<sup>th</sup> edition. Taylor and Francis Group. Boca Raton. pp. 469-484.

13. Atchade, BC., Ouedraogo, S., Traore, TK., Bonou-selegbe, I and Semde, R. Formulation and Characterization of Effervescent Tablets from a Traditional Medicine Recipe for Dental Care. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. Vol 17, Issue 6, 2025. DOI: <https://dx.doi.org/10.22159/ijap.2025v17i6.53815>
14. Dirjen POM RI. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, 2000. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
15. Aulton, M.E. and Taylor, K.M.G, *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*, 2022. 4<sup>th</sup> edition, Churchill Livingstone Elsevier, UK
16. Tanjung, YP., Akmal, T., Julianti, AI., Fauziyyah, A and Riki, A. Lozenges Formulation of Ciplukan (*Physalis angulata*.) Fruit Extract as an Antioxidant with Combination of Filler Agents Avicel PH 102–Ludipress. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2023. Vol 15, Special Issue 2. DOI: <https://dx.doi.org/10.22159/ijap.2023.v15s2.14>
17. U.S. Pharmacopeia 43<sup>rd</sup> revision. *The United States Pharmacopeia USP 43 - National Formulary NF 38*. 2020. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD.
18. Kotamarthy, L., Metta, N., and Ramachandran, R. Understanding the effect of granulation and milling process parameters on the quality attributes of milled granules processes, *Processes*. 2020. 8: 683, 2-18. DOI:10.3390/pr8060683
19. Jain, G. and Patil, U.K. Formulation, characterization and evaluation of behavioral effects of suspension and effervescent granules of *Evolvulus alsinoides* Linn. and *Convolvulus pluricaulis* Choisy. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2020. 10(4): 460-465. DOI: <https://doi.org/10.5530/ijpi.2020.4.81>
20. Maulana, R., Wahyuni, AS and Dai, M. Optimization of effervescent granule dosage form and evaluation of pH and physicochemical properties. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 2025. 17(4), 193–200.
21. Maysarah, H., Sari, I., Faradilla, M., and Kwok, K. Formulation of effervescent granule from robusta bilberry bean ethanolic extract (*Vaccinium myrtillus*). *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2020. 12(6): S743-S746. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_258\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_258_19)
22. Bayazid, A.B., Chun, E.M., Mijan, M.A., Park, S.H., Moon, S.K., and Lim, B.O. Anthocyanins profiling of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract that elucidates antioxidant and anti-inflammatory effects. *Food and Agricultural Immunology*. 2021. 32(1): 713-726.
23. Tasew, T., Mekonnen, Y., Gelana, T., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, BS., Ele, E., Mohammed, AM and Mamo, H. In vitro antibacterial and antioxidant activities of roasted and green coffee beans originating from different regions of Ethiopia. *International Journal of Food Science*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8490492>
24. Muralidharan, K., Romero, M., and Wüthrich, K. Factorial designs, model selection, and (incorrect) inference in randomized experiments. NBER Working Paper No. 26562. 2020. JEL No. C12, C18, C90, C93.
25. Kopystecka, A., Koziół, I., Radomska, D., Bielawski, K., Bielawska, A., and Wujec, M. *Vaccinium uliginosum* and *Vaccinium myrtillus*—two species—one used as a functional food, *Nutrients*. 2023. 15: 4119, 2-27. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu15194119>
26. Pires, T.C.S.P, Caleja, C., Buelga, C.S., Barros, L., and Isabel, C.F.R. *Vaccinium myrtillus* L. fruits as a novel source of phenolic compounds with health benefits and industrial applications. *Current Pharmaceutical Design*. 2020. 26(16): 1918-1928.

27. Tarragó-Celada, J. and Novell, J.M.F. Colour, chlorophyll and chromatography use thin-layer chromatography to discover the variety of pigments that play a role in photosynthesis and give leaves their colour. *Science in School*. 2019. 47:41-45. Available at: [www.scienceinschool.org](http://www.scienceinschool.org)
28. Qiu, Y., Chen, Y., Zhang, G. G. Z., Mantri, R. V., and Yu, L. X. Developing solid oral dosage forms: Pharmaceutical theory and practice (2<sup>nd</sup>ed.). 2017. Elsevier / Academic Press. Available at: <https://www.elsevier.com/books/developing-solid-oral-dosage-forms/qiu/978-0-443-34156-4>
29. Oliveira, M.S., Torres, M.P.R., Raiser, A.L., Ribeiro, E.B., Andrighetti, C.R., and Valladão, D.M.S. Effervescent vitamin C tablets and its quality control. *Scientific Electronic Archives*. 2020. 13(5): 73-79. DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/13520201055>
30. Kalman, H. Effect of moisture content on flowability: Angle of repose, tilting angle, and Hausner ratio. *Powder Technology*. 2021. 393(November): 582-596. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.08.010>
31. Guerain, M., Chevreau, H., Guinet, Y., Paccou, L., Elkam, E., and He'douxa, L. Relationship between synthesis method–crystal structure–melting properties in cocrystals: The case of caffeine–citric acid. *Acta Crystallographica*. 2024. C80:221–229. DOI: <https://doi.org/10.1107/S205322962400319X>
32. Faria, W.S., Almeida da Silva, A., Veggi, N., Kawashita, N.H., de França Lemes, S.A., Miguel de Barros, W., Cardoso, E., Converti, A., Moura, W.M., and Bragagnolo, N. Acute and subacute oral toxicity assessment of dry encapsulated and non-encapsulated bilberry fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2020. 28(2): 337-355. DOI: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.1067>