

AKTIVITAS PENANGKAPAN RADIKAL 2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL OLEH EKSTRAK ETANOLIK BATANG BROTOWALI (*Tinospora crispa* (L.) Miers) DAN FRAKSI-FRAKSINYA

THE ACTIVITY OF RADICAL SCAVENGING OF 2,2-DIPHENYL-1-PYCRILHYDRAZIL BY ETHANOLIC EXTRACTS OF (*Tinospora crispa* (L.) Miers) STEM AND ITS FRACTIONS

Tatang Irianti, Andayana Puspitasari, Ema Suryani
Fac.of Pharmacy, Gadjah Mada University, Yogyakarta,

ABSTRACT

Batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Miers) diketahui mengandung beberapa senyawa fenolik yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan menguji aktivitas penangkapan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH) oleh ekstrak etanolik batang brotowali dan fraksi-fraksinya. Ekstraksi batang brotowali dilakukan dengan alat Soxhlet dan pembuatan fraksi-fraksinya secara partisi cair-cair menggunakan alat Liquid-Liquid Continuous Extraction (LLCE). Pelarut-pelarutnya adalah n-heksana dan etil asetat. Adanya golongan senyawa antiradikal dideteksi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan aktivitas penangkapan radikal DPPH. Ekstrak etanolik, fraksi etil asetat, dan fraksi air memiliki aktivitas antiradikal dan mengandung senyawa golongan kumarin dan flavonoid. Fraksi etil asetat (200 µg/ml) mampu menangkap 53,57 % radikal DPPH yang merupakan aktivitas antiradikal tertinggi dan diikuti oleh fraksi air, ekstrak etanolik, dan fraksi n-heksana.

Kata kunci : penangkapan radikal, *Tinospora crispa* (L.) Miers, DPPH.

ABSTRACT

We have investigated the antiradical activity of ethanolic extracts of Brotowali stem (*Tinospora crispa* (L.) Miers) using radical scavenging assay or DPPH radical. Thin layer chromatograms were also studied to estimate the group of compounds that have antiradical activity. The ethanolic extract, ethyl acetate and water fractions were showed coumarin and flavonoid. The DPPH antiradical efficiency values of ethyl acetate fraction was the highest antiradical activity namely 200 µg/ mL of this fraction was able to inhibit 53.57% DPPH radicals.

Key words: radical scavenging, *Tinospora crispa* (L.) Miers, DPPH

PENDAHULUAN

Eksplorasi penelitian brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Miers) sebagai antioksidan alami telah dilakukan oleh Chantong, dkk. (2008) di Thailand bahwa ekstrak etanolik batang brotowali berefek

dan secoisolariciresinol yang diisolasi dari ekstrak dikloretan batang brotowali memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Selain itu, isolat bergenin dari batang brotowali telah diteliti memiliki aktivitas sebagai penangkap radikal bebas (Dweck dan Cavin, 2007)

Radikal bebas adalah suatu atom, gugus atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital paling luar, sehingga sifatnya secara kimiawi sangat reaktif dan selalu mencari pasangan elektron supaya dapat berikatan untuk menstabilkan diri.

*Korespondensi : **Tatang Irianti**

Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi UGM
E-mail: intanti@ugm.ac.id

sebagai antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 0,141 ± 0,033 mg/ml berdasarkan metode DPPH. Kemudian Cavin (1998) menguji aktivitas penangkapan radikal bebas melawan karoten terhadap batang brotowali. Hasilnya anatara lain N-cis-feruloyltyramine, N-trans-feruloyltyramine

Dengan cara terus-menerus menyerang sel-sel tubuh termasuk sel-sel normal sampai tercapai mendapatkan pasangan elektron. Bila radikal bebas ini bereaksi dengan senyawa biologis dalam tubuh, maka akan menyebabkan reaksi berantai (Donatus, 1994 dan Gitawati, 1995).

Ada dua sumber terjadinya radikal bebas, eksternal seperti polusi dari kendaraan bermotor, asap rokok, serta sinar ultraviolet dan internal berasal dari proses respirasi, oksidasi enzimatik, juga fosforilasi oksidatif di mitokondria. Sehingga meskipun kita menghindari faktor eksternal, radikal bebas secara otomatis tetap dihasilkan dari proses-proses biologik normal dan kebutuhan antiradikal oleh tubuh merupakan hal primer untuk menghambat atau menghentikan efek negatif radikal bebas (Halliwell & Gutteridge, 1992 dan Lestariana, 2003). Antiradikal dari golongan senyawa sintetik sudah banyak ditinggalkan dengan alasan dapat menyebabkan toksisitas juga karsinogenik, dan saat ini lebih memilih dari bahan alami apalagi cukup memiliki dasar ilmiah serta lebih aman (Majeed dkk, 1995).

Cuvelier dkk. (1991) meneliti senyawa golongan fenolik yang terdapat pada batang brotowali, seperti apigenin, N-cis *feruloyltyramine*, N-trans *feruloyltyramine*, *secoisolariciresinol*, dan bergenin juga aktivitasnya sebagai antiradikal alami. Potensi sebagai antiradikal dalam tanaman adalah golongan fenolik, seperti flavonoid, asam fenolik, lignin, asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan tanin (Kahkonen dkk, 1999).

METODOLOGI

Bahan

Batang brotowali diambil dari Dusun Purwosari Sinduadi, Sleman, Yogyakarta; etanol (teknis), n-heksana (teknis), etil asetat (teknis), dan aquadest. Kromatografi lapis tipis menggunakan silika gel F₂₅₄ dan toluen (E. Merck) : etil asetat (E. Merck) : asam asetat (E. Merck) (5:4:1) serta bahan deteksinya adalah asam fosfomolibdat, KOH etanolik, anisaldehyda asam sulfat, uap amonia dan sitroborat. Bahan untuk uji penangkapan radikal DPPH adalah 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma. Co.), metanol (E. Merck), dan aquadest.

Ekstraksi dan Partisi

Serbuk kering batang brotowali 30 g dibungkus dengan kertas saring, lalu dimasukkan ke dalam alat Soxhlet, diekstraksi dengan 150 ml etanol 96 %. Proses ekstraksi dihentikan bila filtrat yang dihasilkan sudah jernih.

Sari etanol (sebagian) ditambah air dengan perbandingan volume 2:1 dan dipartisi cair-cair

dalam alat *Liquid-Liquid Continuous Extraction* (LLCE) dengan n-heksana pada perbandingan volume 1:3. Residu fase air dipartisi dengan etil asetat dengan perbandingan 1:3 dan kemudian sari etanol, fraksi n-heksana, dan fraksi etil asetat yang diperoleh diuapkan secara alamiah, sedangkan fraksi air diuapkan diatas penangas air hingga diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya ditimbang, ditutup dengan *aluminium foil* dan sebelum digunakan ekstrak disimpan dalam eksikator.

Kromatografi Lapis Tipis

Empat sampel yaitu larutan ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari batang brotowali ditotolkan pada silika gel F₂₅₄. Lempong KLT tersebut dielusi dengan fase gerak toluen : etil asetat : asam asetat (5:4:1). Kemudian disemprot dengan pereaksi asam fosfomolibdat, bila ada senyawa antioksidan akan memberikan warna bercak biru yang timbul antara 1-2 menit pada latar belakang kuning, kemudian diuapi amonia untuk mengembalikan latar belakang lempeng menjadi putih dan bercak antioksidan akan secara jelas berwarna biru atau violet (Jork dkk, 1989). Senyawa golongan kumarin dideteksi dengan pereaksi semprot KOH etanolik. (Machek, 1972) dan uji golongan flavonoid lempeng KLT diuapkan dengan amonia serta dilanjutkan dengan pereaksi semprot sitroborat (Wagner dkk, 1984). Untuk mengetahui kemungkinan adanya golongan senyawa lain, maka digunakan pereaksi semprot anisaldehyda asam sulfat. (Stahl,1985).

Spektrofotometer

Sebanyak 50 µL ekstrak etanolik batang brotowali dan fraksinya dimasukkan kedalam labu takar, serta BHT dengan variasi konsentrasi, kemudian ditambahkan 1,0 ml DPPH 0,4 mM. Selanjutnya ditambahkan metanol hingga volume 5,0 mL (dihomogenkan dengan vorteks selama 1 menit). Serapan dibaca pada panjang gelombang maksimum DPPH (517 nm) dengan blanko metanol dan larutan kontrol.

Analisis Data

Data kromatogram berupa hRf dan penampakan bercak sebelum dan setelah ditambah pereaksi semprot, diamati dengan sinar tampak maupun dengan sinar UV₂₅₄ dan UV₃₆₆. Sedangkan absorbansi sampel dan kontrol diolah untuk mendapatkan % penangkapan radikal DPPH pada tiap konsentrasi. Kemudian perbandingan % penangkapan radikal DPPH pada masing-masing fraksi dideskripsikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Serbuk simplisia batang brotowali disari dengan menggunakan etanol 96% dan menghasilkan rendemen terhadap berat serbuk sebesar 12,02% b/b. Rendemen fraksi n-heksana, etil asetat dan air terhadap berat serbuk adalah 2,28% , 3,83% dan 5,68% b/b, sehingga senyawa dalam batang brotowali cenderung polar.

Kromatogram pada gambar 1 (B dan C), menunjukkan bahwa masing-masing fraksi mempunyai profil kromatogram yang berbeda dan merupakan gambaran adanya perbedaan kandungan senyawa sesuai dengan tingkat kepolaran pelarut. Kromatogram (gambar 1D) menunjukkan adanya bercak warna biru lemah pada pengamatan sinar tampak di fraksi air dengan hRf 0 (totalan awal), ekstrak etanolik dan fraksi etil asetat dengan hRf 44 dan 50. Warna biru lemah merupakan petunjuk adanya senyawa antioksi dan dalam ekstrak etanolik, fraksi etil asetat, dan fraksi air sebagai reduktor lemah, dengan mekanisme kurang kuat kemampuan mereduksi pereaksi semprot fosfomolibdat Mo^{6+} dari $\text{H}_3(\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4)$ menjadi Mo^{4+} berupa campuran oksidan berwarna biru abu-abu (Jork dkk, 1989).

Sedangkan kromatogram pada gambar 2 (D) memperlihatkan fraksi air (hRf 0), ekstrak etanolik dan fraksi etil asetat (hRf 44) menunjukkan fluoresensi hijau pada UV_{366} yang merupakan adanya senyawa golongan kumarin. Seperti Machek (1972) menyatakan golongan senyawa mempunyai sifat antiradikal yaitu golongan fenolik, seperti kumarin dan flavonoid. Bila kumarin dibuat alkalis, maka cincin lakton akan terbuka dan terbentuk anion asam kumarinat kemudian terjadi siklisasi menjadi lakton. Dengan adanya sinar UV, maka anion asam kumarinat akan mengalami isomerisasi menjadi bentuk trans yaitu anion asam-o-kumarat. Bercak dengan adanya anion asam-o-kumarat terlihat berfluoresensi hijau, hijau biru, kuning atau coklat di bawah sinar UV_{366} .

Hasil KLT pada Gambar 3 (D dan E) menunjukkan bahwa pada ekstrak etanolik dengan hRf 75, 80, 85 dan fraksi n-heksana dengan hRf 74 tampak bercak menjadi berwarna ungu setelah disemprot anisaldehyda asam sulfat dibanding bercak awal. Stahl (1985) menyatakan penggunaan pereaksi semprot anisaldehyda asam sulfat untuk mengetahui adanya senyawa terpenoid dan bercak (awalnya tidak berwarna) setelah disemprot akan menjadi berwarna ungu, biru, merah, abu-abu atau hijau. Anisaldehyd dapat memperpanjang sistem kromofor pada senyawa dan pada ekstrak etanolik juga fraksi n-heksana

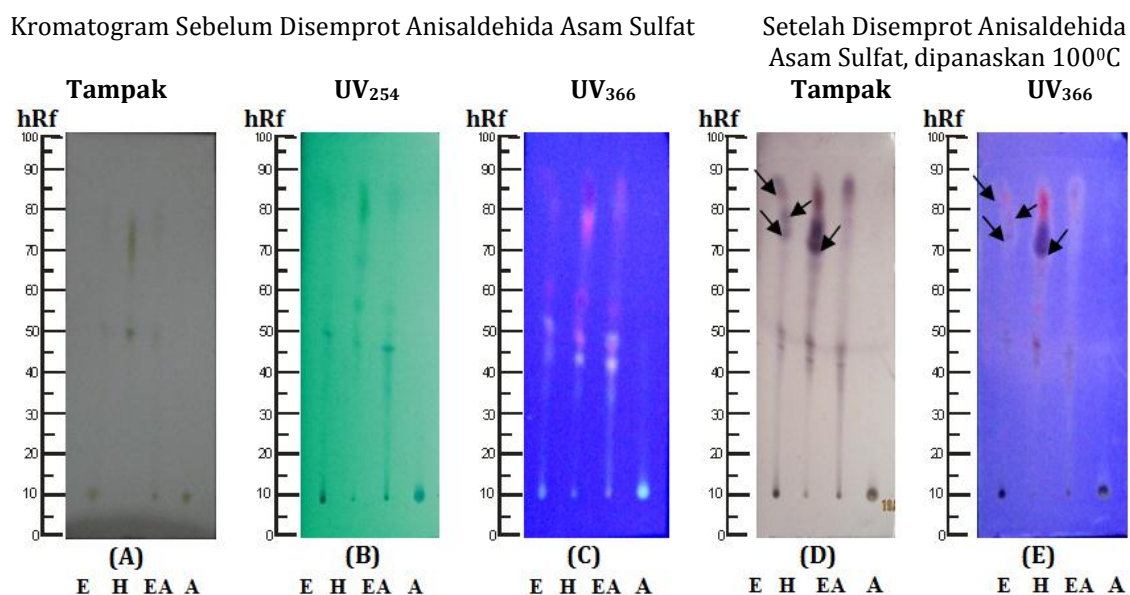
menunjukkan adanya senyawa golongan terpenoid.

Untuk mendeteksi keberadaan senyawa golongan flavonoid lempeng KLT diuapi dengan amonia dan disemprot dengan sitroborat. Semua flavonoid menyebabkan pepadaman, sehingga terlihat bercak biru gelap dengan latar belakang kuning pada lempeng KLT dibawah UV_{254} . Sedangkan pada UV_{366} flavonoid berfluoresensi kuning, ungu, biru, dan hijau (Wagner dkk, 1984).

Pada gambar 4 (B), kromatogram di bawah sinar UV_{254} terlihat pepadaman bercak pada ekstrak etanolik dengan hRf 44 dan 46; fraksi n-heksana dengan hRf 32 dan 41; fraksi etil asetat dengan hRf 41 dan 44. Suatu senyawa yang meredam pada UV_{254} memiliki gugus karbonil, fenolik, atau gugus lain yang mengandung setidaknya 2 ikatan rangkap terkonjugasi. Pengamatan UV_{366} terlihat bercak berfluoresensi kuning kehijauan (Gambar 4C) pada ekstrak etanolik dengan hRf 44 dan 34 dan fraksi etil asetat dengan hRf 31 dan 41. Hal ini menunjukkan adanya kandungan flavonol tanpa 5-OH bebas atau flavonol dengan 5-OH tersubsitusi. Pada fraksi n-heksana tampak bercak berfluoresensi orange kemerahan. Pada UV_{366} bercak tampak berfluoresensi menunjukkan senyawa mengandung ikatan rangkap terkonjugasi yang lebih panjang (Wagner dkk, 1984).

Deteksi dengan pereaksi semprot sitroborat pada kromatogram gambar 5 (A) menunjukkan bahwa pada ekstrak etanolik dengan hRf 52, fraksi etil asetat dengan hRf 50, dan fraksi air dengan hRf 0 terlihat warna kuning yang lebih intens pada pengamatan sinar tampak. Pengamatan UV_{366} terlihat bercak pada ekstrak etanolik dengan hRf 52 dan fraksi etil asetat dengan hRf 50 berfluoresensi kuning orange (Gambar 5 (B)) setelah disemprot sitroborat. Bercak tersebut merupakan senyawa golongan flavonoid.

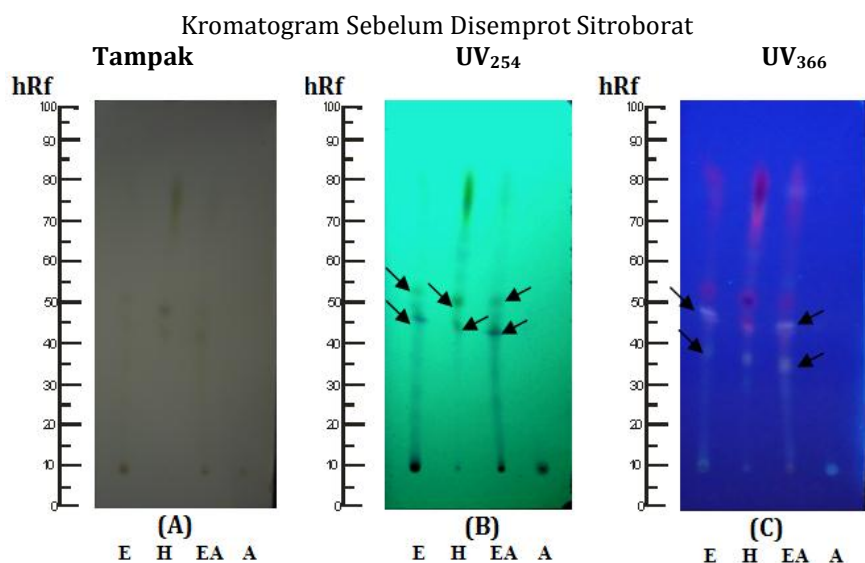
Berdasarkan data kromatogram pada bercak ekstrak etanolik, fraksi etil asetat, dan fraksi air memiliki aktivitas antioksidan yang mengandung senyawa kumarin dan flavonoid.



Keterangan :

E : Ekstrak Etanolik; EA : Fraksi Etil Asetat; A : Fraksi Air; H : Fraksi n-heksana

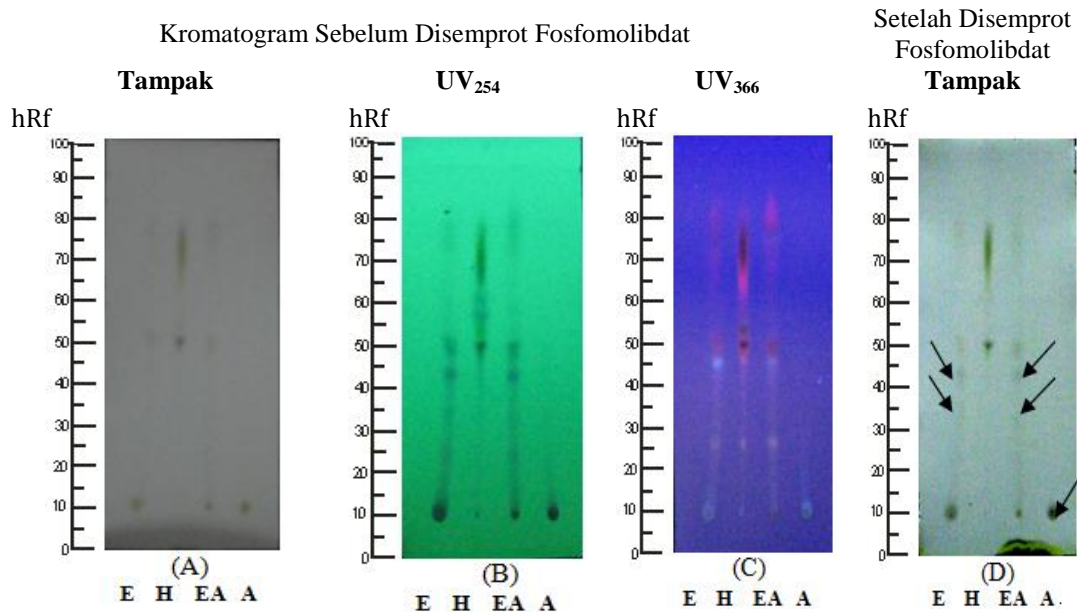
Gambar 3. Kromatogram ekstrak etanolik batang brotowali dan fraksinya sebelum dan setelah disemprot anisaldehyde asam sulfat. Adanya senyawa terpenoid ditunjukkan dengan tanda panah



Keterangan :

E : Ekstrak Etanolik; A : Fraksi Air; H : Fraksi n-heksana; EA : Fraksi Etil Asetat

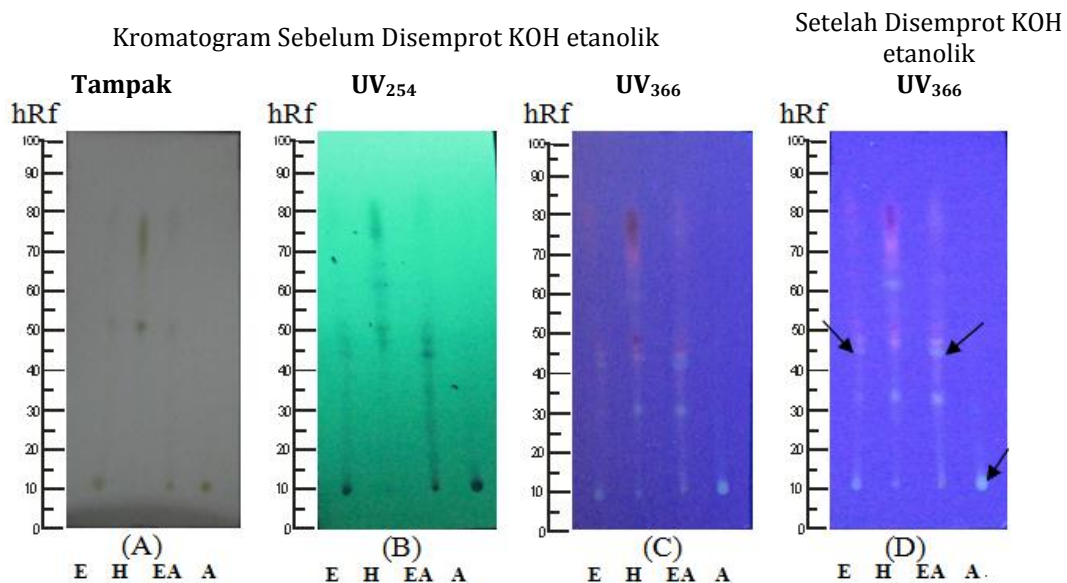
Gambar 4. Kromatogram ekstrak etanolik batang brotowali dan fraksinya pada fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak toluen:etil asetat:asam asetat (5:4:1) dengan jarak rambat 8 cm sebelum disemprot sitroborat.



Keterangan :

E : Ekstrak Etanolik; H : Fraksi n-heksana; EA : Fraksi Etil Asetat; A : Fraksi Air

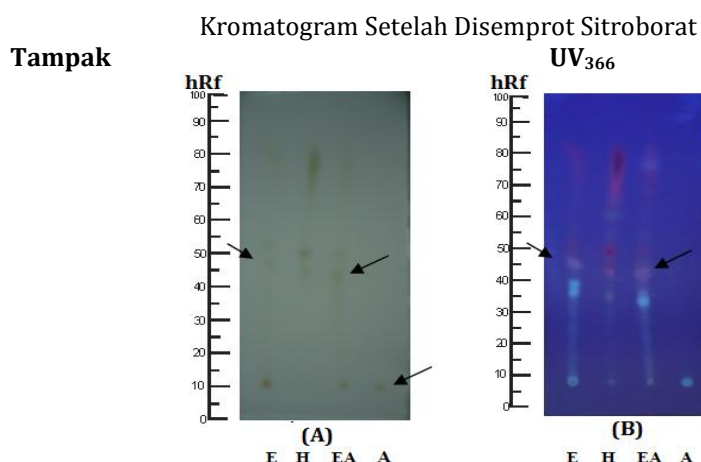
Gambar 1. Kromatogram ekstrak etanolik batang brotowali dan fraksinya sebelum dan setelah disemprot asam fosfomolibdat. Adanya senyawa antioksidan ditunjukkan dengan tanda panah.



Keterangan :

E : Ekstrak Etanolik; EA : Fraksi Etil Asetat; A : Fraksi Air; H : Fraksi n-heksana

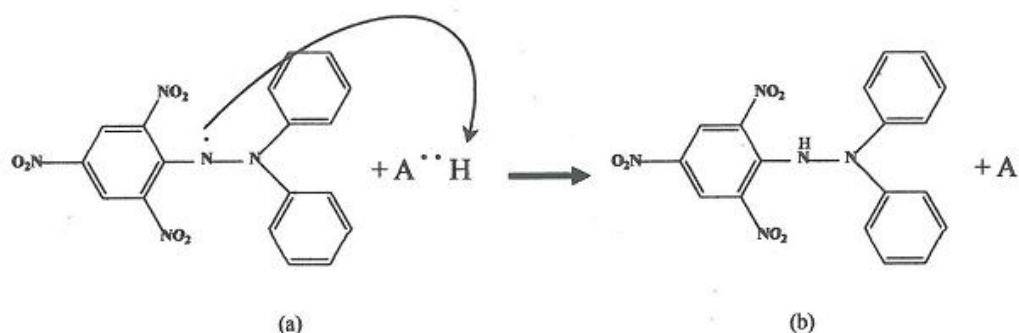
Gambar 2. Kromatogram ekstrak etanolik batang brotowali dan fraksinya sebelum dan setelah disemprot KOH etanolik. Adanya senyawa kumarin ditunjukkan dengan tanda panah.



Keterangan :

E : Ekstrak Etanolik; EA : Fraksi Etil Asetat; H : Fraksi n-heksana; A : Fraksi Air

Gambar 5. Kromatogram ekstrak etanolik batang brotowali dan fraksinya pada fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak toluen:etil asetat:asam asetat (5:4:1) dengan jarak rambat 8 cm setelah disemprot sitroborat.



Keterangan: (a) 2,2-diphenylpicryl-1-hydrazyl (ungu); (b) 2,2-diphenylpicryl-1-hydrazine (kuning)
Radikal bebas non-radikal

Gambar 6. Reaksi reduksi DPPH oleh donor atom hidrogen seperti senyawa fenolik (Molyneux, 2006)

Hal ini ditunjukkan dengan fluoresensi hijau pada bercak fraksi air (hRf 0), ekstrak etanolik dan fraksi etil asetat (hRf 44) adanya senyawa golongan kumarin. Selain itu, pengamatan UV₃₆₆ terlihat bercak pada ekstrak etanolik dengan hRf 52 dan fraksi etil asetat dengan hRf 50 berfluoresensi kuning orange setelah disemprot sitroborat sehingga bercak tersebut positif terhadap senyawa golongan flavonoid.

Penentuan aktivitas antiradikal batang brotowali dengan metode DPPH ini dilakukan pada fraksi yang berbeda tingkat kepolarannya, yaitu fraksi nonpolar (n-heksana), fraksi semi polar (etil asetat) dan fraksi polar (air). Sebagai kontrol positif digunakan Butil Hidroksi Toluena

(BHT) yang telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan.

Uji aktivitas penangkapan radikal DPPH menunjukkan pada ekstrak etanol batang brotowali dapat menangkap 17,35 % ± 0,56% dan fraksi n-heksana 14,20% ± 4,21%. Sedangkan hasil tertinggi adalah fraksi etil asetat karena pada konsentrasi yang sama 200 µg/ml mampu menangkap 53,57 % ± 7,55% radikal DPPH, diikuti oleh fraksi air dengan nilai % penangkapan radikal DPPH sebesar 23,63 % ± 1,01%. Pernyataan tersebut dikuatkan pula dengan hasil analisis pendahuluan aktivitas antioksidan dengan metode KLT menggunakan pereaksi semprot asam fosfomolibdat yang menunjukkan bahwa bercak

pada fraksi air dengan hRf 0 dan fraksi etil asetat dengan hRf 44 dan 50 kemungkinan merupakan senyawa antioksidan. Hasil deteksi golongan senyawa menunjukkan bahwa pada fraksi etil asetat diduga terkandung senyawa fenolik, yaitu golongan kumarin dan flavonoid dalam bentuk aglikon. Kelarutan aglikon flavonoid lebih tinggi pada fraksi yang lebih nonpolar. Air merupakan pelarut polar, maka komponen yang tersari dalam air adalah flavonoid yang terikat dengan glikonnya yang menyebabkan hambatan sterik sehingga menghambat reaksi penangkapan radikal bebas (Kahkonen dkk, 1999). Pokorni, dkk. (2001) menyatakan bahwa glikosida flavonoid kurang efektif sebagai antioksidan jika dibanding bentuk aglikonnya.

Ekstrak etanolik dan fraksi n-heksana memiliki % penangkapan radikal DPPH dibawah 20 %. Ekstrak etanolik memiliki aktivitas antioksidan lebih kecil dari fraksi air. Pernyataan tersebut sesuai dengan hasil kromatogram ekstrak etanolik setelah disemprot asam fosfomolibdat yang menunjukkan bahwa bercak pada ekstrak etanolik memiliki intensitas warna biru yang lebih lemah dibanding bercak pada fraksi air. Hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak etanolik masih terkandung banyak senyawa didalamnya karena tidak melalui proses partisi. Sementara itu, aktivitas antioksidan ekstrak etanolik lebih tinggi dibanding fraksi n-heksana. Hal ini kemungkinan disebabkan senyawa antioksidan lebih bersifat polar dan kandungan pada fraksi n-heksana adalah resin dan asam lemak. Menurut Rohman, dkk. (2006), resin dan asam lemak merupakan senyawa nonpolar yang tidak mempunyai aktivitas antioksidan. Pernyataan tersebut dikuatkan pula dengan hasil analisis pendahuluan aktivitas antioksidan dengan metode KLT menggunakan pereaksi semprot asam fosfomolibdat yang menunjukkan bahwa pada fraksi n-heksana tidak tampak bercak yang menunjukkan aktivitas antioksidan.

Berdasarkan hasil KLT, aktivitas antioksidan batang brotowali merupakan hasil kontribusi dari senyawa golongan kumarin dan flavonoid. Berdasarkan struktur kimianya, kumarin dan flavonoid memiliki gugus hidroksi fenolik yang mampu menangkap radikal DPPH melalui donor atom hidrogen pada radikal tersebut. Kemampuan senyawa fenolik untuk menangkap radikal DPPH dapat dilihat pada gambar 6. Radikal fenoksi (AH[•]) distabilkan oleh delokalisasi elektron yang tidak berpasangan disekitar cincin aromatik. Stabilitas radikal fenoksi akan mengurangi kecepatan autooksidasi reaksi berantai (Molyneux, 2006).

KESIMPULAN

Ekstrak etanolik, fraksi etil asetat, dan fraksi air batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Miers) memiliki aktivitas antiradikal berdasarkan metode DPPH dan memiliki kandungan senyawa kumarin dan flavonoid. Pada fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan tertinggi, diikuti oleh fraksi air, ekstrak etanolik, dan fraksi n-heksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Cavin, A., Hostettmann, K., Dyatmyko, W., & Potterat, O., 1998, Antioxidant and Lipophilic Constituents of *Tinospora crispa*, *Planta Medica* 64 (5), 393-396.
- Chantong, B., Kampeera, T., & Sirimanapong, W., 2008, *Aktivitas Antioksidan Brotowali*, http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrnrnr=786_9, 20 Juni 2009.
- Cuvelier, M.E., Richard, H., & Besset, C., 1991, comparison of the Antioxidant Activity of Some Acid Phenols: Structure-Activity Relationship, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (2), 324-325.
- Donatus, I.A., 1994, Antaraksi Kurkumin dengan Parasetamol Kajian terhadap Aspek Farmakologi Perubahan Hayati, *Disertasi*, Fakultas Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Dweck, A.C. & Cavin, J., 2007, Andawali (*Tinospora crispa*), *Georges Bizet*, 20, 32-35.
- Fagliano, V., 1999, Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wine, *J.Agric. Food. Chem*, 4, 1035-1040.
- Gitawati, R., 1995, Radikal Bebas : Sifat dan Peran dalam Menimbulkan Kematian Sel, *Cermin Dunia Kedokteran*, 102, 33-35.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C., 1992, *Free Radical in Biology and Medicine*, 3rd edition, 796-798, Oxford University Press, New York.
- Harborne, 1987, *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, 5-6, Penerbit ITB, Bandung.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., & Wimmer, H., 1989, *Thin Layer Chromatography Reagents and Detection Methods*, 377, Bassel, New York.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., & Fuorella, H.C., 1999, Antioxidant Activity of Extract Containing Phenolic Compound, *J. Agric. Food Chem*, 47, 3954-3962.
- Machek, K., 1972, *Pharmaceutical Application of Thin Layer and Paper Chromatography*, 563-565, Elsevier Publishing Company, London.
- Majeed, M., Badmaev, V., Shivakumar, U., & Rajendran, R., 1995, *Curcuminoid: Antioxidant Phytonutrient*, 32-63, Nutri

- Science Publisher Inc., Piscataway, New Jersey.
- Molyneux, P., 2004, The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *J. Sci. Technicol.*, 26(2), 211-219
- Pokorni, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M., 2001, *An Antioxidant in Food Practical Application*, 2, 10-12, 17, 44-45, 101, 107-108, Woddhead Publishing Ltd., England.
- Rohman, A., Sugeng, R., & Diah, U., 2006, Aktivitas Antioksidan, kandungan fenolik total, dan kandungan flavonoid total ekstrak etil asetat buah mengkudu serta fraksi-fraksinya, *Majalah Farmasi Indonesia*, 17(3), 136-142.
- Stahl, E., 1985, *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, 1-17, Penerbit ITB, Bandung.
- Wagner, H., Blatt, S., & Zgainski, E.M., 1996, *Plant Drug Analysis*, 23-26, Springer-Verlag Berlin Hiedelberg, New York.