

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK BUAH MENGGUDU (*Morinda citrifolia*, L)**  
**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MENGGUDU (*Morinda citrifolia*, L) FRUIT EXTRACTS**

Abdul Rohman dan Sugeng Riyanto\*)

**ABSTRACT**

*This research aimed to determine antioxidant activity of Morinda citrifolia, L fruit extracts. Morinda citrifolia, L fruit was ground, extracted by methanol, and partitioned by using chloroform and ethyl acetate to recover extracts of methanol, chloroform and ethyl acetate respectively. These extracts were diluted to various concentrations i.e. 1, 5, and 10 %, and were determined their antioxidant activities by linoleic-thiocyanate method. The result showed that extracts of Morinda citrifolia, L fruit had antioxidant activity in the order of ethyl acetate extract > chloroform extract > methanol extract.*

*Antiradical activity tests were carried out by using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) method, the results showed that ethyl acetate extract, chloroform extract, and methanol extract revealed  $IC_{50}$  46,7, 227,7 and 888,6  $\mu$ g/ml, respectively.*

**Keywords:** Antioxidant, antiradical, and mengkudu fruit.

**PENDAHULUAN**

Salah satu komponen bahan makanan yang berguna bagi kesehatan adalah antioksidan. Antioksidan dapat diperoleh secara alami maupun sintesis. Antioksidan sintesis mempunyai efektifitas yang tinggi, namun kurang aman bagi kesehatan sehingga penggunaannya diawasi dengan ketat di berbagai negara. Oleh karena itu, perlu dicari sumber antioksidan alami yang lebih aman daripada antioksidan sintesis untuk dikembangkan misalnya antioksidan yang berasal dari rempah-rempah, buah, atau tanaman (Pujimulyani, 2003).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif/spesies nitrogen reaktif (ROS/RNS) dan juga radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti karsinogenesis, kardiovaskuler dan penuaan (Halliwell and Gutteridge, 2000).

Radikal bebas dapat menginduksi penyakit kanker, arteriosklerosis dan penuaan yang disebabkan oleh kerusakan jaringan karena oksidasi sehingga diperlukan suatu antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas tersebut sehingga tidak dapat menginduksi suatu penyakit (Kikuzaki, *et al.*, 2002).

Antioksidan sintesis seperti BHA (butil hidroksi anisol), BHT (butil hidroksi toluen), PG (propil galat), dan TBHQ (*tert*-butil Hidrokuinon) dapat meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Amarowicz *et. al.*, 2000) sehingga penggunaan antioksidan yang alami mengalami peningkatan.

Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) masuk dalam familia Rubiaceae (Syamsul Hidayat dan Hutapea, 1991). Buah mengkudu dapat menghambat pertumbuhan tumor dengan merangsang sistem imun yang melibatkan makrofag dan atau limfosit (Hirazumi *et al.*, 1994). Ekstrak buah ini juga terbukti paling efektif menghambat sell RAS yang menyebabkan kanker diantara 500 ekstrak yang diuji (Hiramatsu *et.al.*, 1993). Younos *et.al* (1990) melakukan studi mengenai efek analgesik dan sedatif ekstrak tanaman mengkudu dan menyatakan bahwa ekstrak mengkudu mempunyai aktivitas analgesik secara konsisten, tidak toksis dan tergantung pada dosis.

Beberapa studi epidemiologi menunjukkan bahwa peningkatan konsumsi antioksidan fenolik alami yang terdapat dalam buah, sayur mayur dan tanaman serta produk-produknya mempunyai manfaat besar terhadap kesehatan yakni dapat mengurangi resiko terjadinya penyakit jantung koroner (Ghiselli *et.al.*, 1998). Hal ini disebabkan karena adanya kandungan beberapa vitamin (A,C,E dan folat), serat dan kandungan kimia lain seperti polifenol yang mampu menangkap radikal bebas (Gill *et.al.*, 2002).

Senyawa-senyawa fenol seperti vitamin E dan flavonoid yang terdapat pada tanaman mampu berfungsi sebagai antioksidan primer (Pokorni *et.al.*, 2001). Flavanoid dapat berperan sebagai penangkap (*scavenger*) anion superoksida dan radikal hidroksi. Flavonoid dapat mendonorkan atom hidrogen ke radikal peroksi membentuk radikal flavonoid yang mudah bereaksi dengan radikal bebas sehingga reaksi radikal rantai berhenti (terminasi) (Pedricelli *et al.*, 2001).

Beberapa senyawa aktif telah diidentifikasi dari buah mengkudu ini antara lain skopoletin (suatu kumarin), polisakarida, asam askorbat,  $\beta$ -karoten, l-arginin, proxironin, dan proxeroninase (Sjabana dan Bahalwan, 2002).

**BAHAN DAN METODE**

**Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Buah mengkudu yang diperoleh dari daerah Gamping, Sleman. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil), vitamin E (Sigma. Co). Fero klorida, amonium tiosianat, etanol, methanol, kloroform, etil asetat, asam klorida, kalium dihidrogen fosfat, kalium hidroksida (E. Merck), dan asam linoleat.

\*) Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Univeritas Gadjah Mada.

## Metode

### 1. Pembuatan ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*, L)

Sebanyak 10 kg buah mengkudu segar digerus lalu ditambah 10 L metanol, campur homogen sambil sesekali diaduk. Campuran didiamkan selama 4 hari, selanjutnya filtrat diambil melalui penyaringan menggunakan pompa vakum dan dienapkan selama satu hari. Setelah dienapkan, disaring, dan pelarut penyari diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh sari pekat metanol. Selanjutnya sari pekat metanol dipartisi menggunakan kloroform. Setelah selesai dilakukan lagi partisi sari pekat metanol dengan etil asetat. Proses penguapan dilanjutkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak metanol, etil asetat dan kloroform. Masing-masing ekstrak ini digunakan untuk membuat seri konsentrasi untuk digunakan uji aktivitas antioksidan dan antiradikal.

### 2. Penentuan aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan ekstrak uji dengan berbagai konsentrasi ditentukan dengan metode linoleat-tiosianat (Osawa dan Namiki, 1981). Sebanyak 100 µl ekstrak dengan berbagai konsentrasi (1, 5 dan 10 %) ditambah dengan 130 µL asam linoleat, 10 ml etanol dan 10 ml buffer fosfat pH 7. Selanjutnya diencerkan dengan aquades sampai volume 25 ml. Larutan ini kemudian diinkubasi dalam *conical flask* pada suhu 40 °C dan setiap 24 jam sekali diukur kandungan peroksida dengan cara: sebanyak 100 µl larutan di atas, ditambah 9,4 ml etanol; 200 µl larutan amonium tiosianat 30 %; dan 200 µl fero klorida (20 mM dalam 3,5 % HCl), vorteks selama 3 menit dan ukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi kontrol seperti semua proses di atas tapi tanpa penambahan ekstrak uji. Hasil aktivitas antioksidan ekstrak buah mengkudu dibandingkan dengan larutan vitamin E 1%.

### 3. Penentuan aktivitas antiradikal

Aktivitas antiradikal ditentukan dengan metode DPPH dengan cara berikut: Sebanyak 50 µL ekstrak (dengan berbagai konsentrasi memberikan nilai IC<sub>50</sub> yaitu konsentrasi ekstrak yang memberikan persen penangkapan radikal sebanyak 50 % dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linier), ditambah dengan 1,0 mL DPPH 0,4 mM, dan 3,950 ml etanol. Campuran selanjutnya divorteks dan dibiarkan selama 30 menit. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm terhadap blanko (yang terdiri dari 50 µl ekstrak dan 4,950 ml etanol). Dilakukan juga pengukuran absorbansi kontrol yang terdiri atas 1,0 ml DPPH dan 4,0 ml etanol. Hasil aktivitas antiradikal ekstrak buah mengkudu dibandingkan dengan vitamin E. Besarnya aktivitas anti radikal atau penangkapan radikal (*Radical Scavenging*) dihitung dengan rumus:

$$\text{Persen antiradikal} = \frac{(\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel})}{\text{Abs kontrol}} \times 100 \%$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Aktivitas antioksidan ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*, L) dengan metode linoleat-tiosianat

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang mampu menunda, memperlambat atau menghambat reaksi oksidasi pada makanan atau obat yang dapat mengakibatkan ketengikan (*rancidity*) pada makanan maupun kerusakan (degradasi) pada obat (Pokorni *et al*, 2001). Dalam sistem linoleat-tiosianat ini sebagai sumber radikal adalah asam linoleat yang merupakan asam lemak tidak jenuh.

Gambar 1; 2; dan 3 merupakan hasil pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak metanol, kloroform, dan etil asetat buah mengkudu 1, 5 dan 10 % dengan menggunakan metode linoleat-tiosianat selama 7 hari yang ditandai dengan menurunnya absorbansi ketiga macam konsentrasi ekstrak tersebut dibanding dengan kontrol. Sebagai pembandingan digunakan vitamin E (α-tokoferol) 1%.

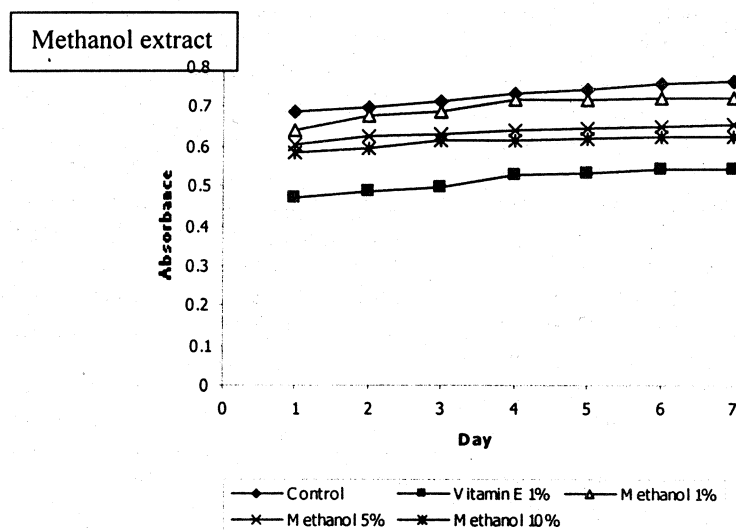


Figure 1. Correlation between methanol extract of Mengkudu fruit 1%, 5%, 10 %, vitamin E 1%, as well as control and its absorbances for 7 days.

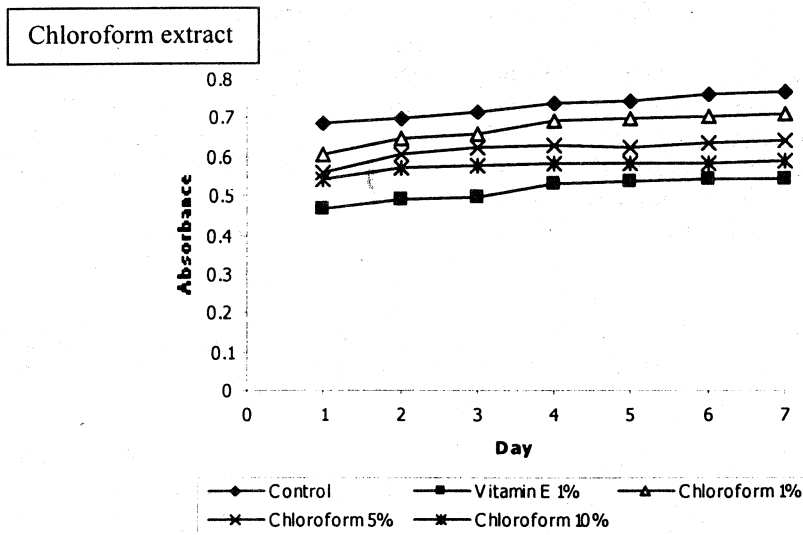


Figure 2. Correlation between chloroform extract of Mengkudu fruit 1%, 5%, 10 %, vitamin E 1%, as well as control and its absorbances for 7 days.

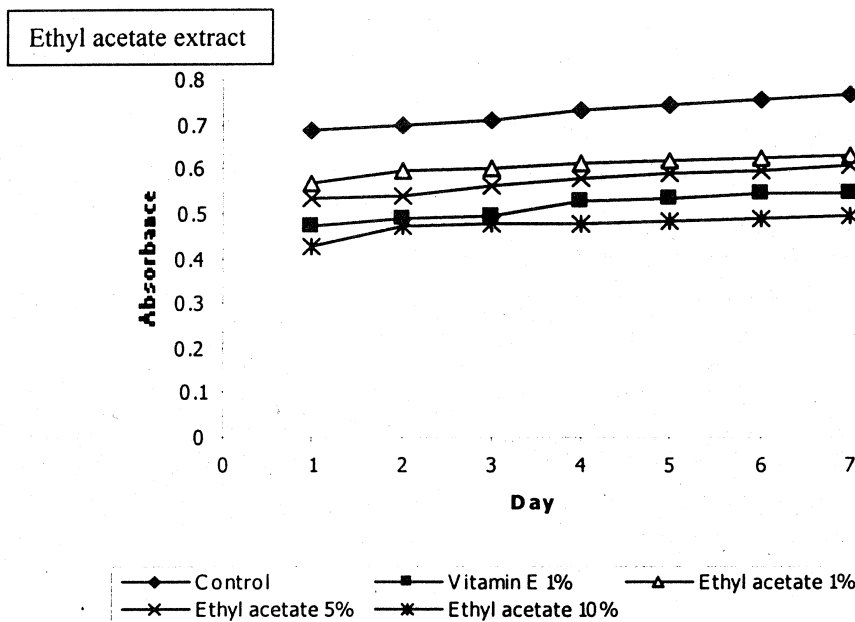


Figure 3. Correlation between ethyl acetate extract of Mengkudu fruit 1%, 5%, 10 %, vitamin E 1%, as well as control and its absorbances for 7 days.

Adanya aktivitas antioksidan ekstrak uji dengan metode linoleat-tiosianat ditunjukkan dengan adanya penurunan absorbansi karena penambahan ekstrak uji dibandingkan dengan kontrol. Ekstrak etil asetat menunjukkan aktivitas antioksidan yang paling besar daripada kedua ekstrak lainnya. Hal ini dapat dilihat bahwa penurunan absorbansi karena penambahan ekstrak etil asetat lebih besar daripada kedua ekstrak lainnya dengan konsentrasi ekstrak yang sama.

Secara umum ketiga ekstrak yakni ekstrak metanol; kloroform; dan etil asetat mempunyai aktivitas antioksidan dengan urutan aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat > ekstrak kloroform > ekstrak metanol pada konsentrasi yang sama. Dari sini dapat disimpulkan bahwa komponen aktif yang terdapat dalam ekstrak etil asetat lebih

bertanggung jawab pada aktivitas antioksidannya daripada dalam ekstrak kloroform dan metanol.

Jika dibandingkan dengan vitamin E yang merupakan senyawa pembanding, maka ketiga ekstrak tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan yang jauh lebih lemah dibandingkan dengan vitamin E. Hal ini dapat dilihat bahwa dengan konsentrasi vitamin E 1% saja, penurunan absorbansinya lebih besar dibanding dengan ekstrak metanol dan kloroform 1%; 5%; dan 10 %. Hanya ekstrak etil asetat 10% yang penurunan absorbansinya lebih besar dari vitamin E 1% akan tetapi penurunan absorbansi vitamin E 1% ini masih lebih besar jika dibandingkan dengan penurunan absorbansi ekstrak etil asetat 1%, dan 5 %.

## 2. Aktivitas antiradikal buah mengkudu dengan metode DPPH

Uji aktivitas antiradikal dengan DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) dimaksudkan untuk menguatkan aktivitas suatu senyawa uji (ekstrak metanol, kloroform, dan etil asetat) buah mengkudu sebagai antioksidan karena sebagaimana diketahui aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan berbagai macam metode.

Meskipun suatu senyawa uji menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi dengan salah satu metode, tidak selalu akan memberikan hasil yang sama baiknya dengan menggunakan metode lainnya sehingga disarankan untuk mengukur aktivitas antioksidan dengan berbagai macam metode (Takaya, Y. *et.al.*, 2003).

Table 1. Antiradical activity of methanol extract of Mengkudu fruit by using DPPH method.

Concentration of methanol extract ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbance (n=3)	% antiradical activity ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	Linier regression equation
100	0,832	7,82 $\pm$ 0,165	$y = 0,0555 x + 0,067$ $r = 0,9975$
250	0,778	13,94 $\pm$ 0,607	$\text{IC}_{50} = 888,6 \mu\text{g/ml}$
500	0,666	26,27 $\pm$ 0,368	x = concentration of methanol extract
750	0,518	42,73 $\pm$ 0,385	y = antiradical activity of methanol extract
1000	0,389	56,94 $\pm$ 0,974	

Absorbance of control = 0,904

Table 2. Antiradical activity of chloroform extract of Mengkudu fruit by using DPPH method.

Concentration of chloroform extract ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbance (n=3)	% antiradical activity ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	Linier regression equation
100	0,591	34,08 $\pm$ 0,804	$y = 0,1312 x + 20,115$ $r = 0,9975$
200	0,461	48,59 $\pm$ 1,056	$\text{IC}_{50} = 227,7 \mu\text{g/ml}$
300	0,375	58,15 $\pm$ 0,692	x = concentration of chloroform extract
400	0,311	65,26 $\pm$ 0,341	y = antiradical activity of chloroform extract
500	0,077	91,37 $\pm$ 0,844	

Absorbance of control = 0,896

Table 3. Antiradical activity of ethyl acetate extract of Mengkudu fruit by using DPPH method.

Concentration of ethyl acetate extract ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbance (n=3)	% antiradical activity ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	Linier regression equation
10	0,744	17,37 $\pm$ 0,647	$y = 0,9493 x + 5,667$ $r = 0,9740$
20	0,686	23,81 $\pm$ 0,947	$\text{IC}_{50} = 46,7 \mu\text{g/ml}$
30	0,628	30,18 $\pm$ 0,063	x = concentration of ethyl acetate extract
40	0,493	45,26 $\pm$ 0,336	y = antiradical activity of ethyl acetate extract
50	0,413	54,11 $\pm$ 0,291	

Absorbance of control = 0,900

Dari ketiga ekstrak yang diuji aktivitas antiradikalnya, terlihat bahwa ekstrak etil asetat mempunyai keefektifan antioksidan yang paling baik dibanding dua ekstrak lainnya karena nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etil asetat paling kecil dibanding dua ekstrak lainnya. Hal ini dimungkinkan karena kandungan senyawa aktif sebagai antiradikal paling banyak/aktif dibanding kandungan senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak metanol dan kloroform. IC<sub>50</sub>

merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal sebanyak 50% yang diperoleh melalui persamaan regresi linier. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin aktif sebagai antiradikal. Sebagai pembanding digunakan vitamin E yang sudah diketahui sebagai antiradikal.

Table 4. Antiradical activity of vitamin E by using DPPH method.

Concentration of vitamin E (µg/ml)	Absorbance (n=3)	% antiradical activity ( ± SD)	Linier regression equation
2,5	0,792	12,43 ± 0,127	y = 6,588 x - 4,46
5,0	0,648	28,28 ± 0,254	r = 0,9995
7,5	0,505	44,10 ± 1,441	IC <sub>50</sub> = 8,27 µg/ml
10	0,343	62,06 ± 0,508	x = concentrartion of vitamin E
20	0,116	87,17 ± 0,291	y = antiradical activity of vitamin E

Absorbance of control 0,904

Nilai IC<sub>50</sub> vitamin E masih lebih kecil dibandingkan dengan nilai IC<sub>50</sub> etil asetat yang berarti dibandingkan dengan ketiga ekstrak yang diuji, vitamin E merupakan antiradikal yang paling efektif.

#### KESIMPULAN

- 1) Ekstrak metanol, kloroform, dan etil asetat buah mengkudu menunjukkan aktivitas antioksidan dengan urutan keefektifan sebagai antioksidan sebagai berikut: ekstrak etil asetat > ekstrak kloroform > ekstrak metanol pada konsentrasi yang sama.
- 2) Aktivitas antiradikal ekstrak etil asetat buah mengkudu > ekstrak kloroform > ekstrak metanol, masing-masing dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 888,6; 227,7; dan 46,7 µg/ml. Nilai IC<sub>50</sub> untuk vitamin E sebesar 8,27 µg/ml.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada atas biaya yang diberikan melalui dana DIK MAK tahun 2004 untuk melaksanakan penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Amarowicz, R., Naczek, M., and Shahidi, F., 2000, Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls, *JAOCs*, 77, 957-961.
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., and Scaccini, C., 1998, Antioxidant Activity of Different Phenolics Fractions Separated from an Italian Red Wine, *J. Agric. Food Chem*, 46, 361 - 367.
- Gill, M.I., Tomas, F.A.B., Pierce, B.H., and Kader, A.A., 2002, Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from California, *J. Agric. Food Chem*, 50, 4976-4982.

Halliwell, B and Gutteridge, J.M.C., 2000, *Free Radical in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York.

Hiramatsu, T., Imoto, M., Koyano, T., Umezawa, K., 1993, Induction of Normal Phenotypes in RAS-transformed Cells by Damncanthal from *Morinda citrifolia*, *Cancer letter*, 73, 161-166.

Hirazumi, A., Furrasawa, E., Chou, S.C., and Hokama, Y., 1994, Anticancer Activity of *Morinda citrifolia* on Intraperitoneally Implanted Lewis Lung Carcinoma in Syngenic Mice, *Proc. West Pharmacol Soc*, 37, 145-146.

Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K and Taniguchi, H., 2002, Antioxidants Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds, *J. Agric. Food Chem*, 50, 2161-2168.

Osawa, T., and Namiki, M., 1981, A Novel Type of Antioxidant Isolated from Leaf Wax of Eucalyptus Leaves, *J. Agric. Biol. Chem*, 45, 735-739.

Pedrielli, P., 2001, Antioxidant Mechanism of Flavonoids, Solvent Effect on Rate Constant for Chain Breaking Reaction of Quersetin and Epicatechin Autoxidation of Methyl linoleat, *J. Agric. Food Chem*, 49, 3034-3040.

Pokorni, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M., 2001, *Antioxidant in Food; Practical Applications*, CRC Press, New York.

Pujimulyani, D., 2003, Pengaruh Bleaching terhadap Sifat Antioksidasi Sirup Kunir Putih (*Curcuma mangga* val.), *Agritech*, 23 (3), 137-141.

Syabana, D. dan Bahalwan, R.R., 2002, *Seri Referensi Herbal: Pesona Tradisional dan Ilmiah Buah mengkudu (Morinda citrifolia, L)*, Salemba Medika, Jakarta.

Syamsul Hidayat, S.S., dan Hutapea, J.R., 1991, *Inventaris tanaman Obat Indonesia*, edisi I, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, departemen Kesehatan RI, Jakarta.

Takaya, Y., Kondo, Y., Furukawa, T and Niwa, M., 2003, Antioxidant Constituents of Radish Sprout (Kaiware-daikon), *Raphanus sativus* L., *J. Agric. Food Chem.*, 51, 8061-8066.

Younos, C., Rolland, A., Fluerentin, J., Lanchers, M., Misslin, R., and Mortier, F., 1990, Analgetic and Behavioral Effects of *Morinda citrifolia*, *Plant medica*, 56, 430-434.

**POTENSI DAUN KEMANGI (*Ocimum basilicum* Linn) SEBAGAI PENANGKAP RADIKAL BEBAS DPPH  
(2,2-Diphenyl-1-ptycrylhidrazil radical)**

*THE POTENCY OF BASIL (*Ocimum basilicum* Linn) AS DPPH  
(2,2-Diphenyl-1-ptycrylhidrazil radical) FREE RADICAL SCAVENGER*

**Paini Sri Widyawati\*)**

**ABSTRACT**

*The commercial development of plants as sources of natural antioxidant to enhance health and food preservation is of current interest. It is related to phenolic compounds containing in foods and beverages to prevent many diseases. The natural antioxidant is more safety than the synthetic antioxidant such as TBHQ (tertier butylated hydroxyquinone), BHT (butylated hydroxytoluene) and BHA (butylated hydroxyanisole).*

*Basil (*Ocimum basilicum* Linn) contains a wide range of essential oils and is rich in phenolic compounds. These can be extracted by two methods i.e. soxhlet and hydrodistillation. The ethanolic extracts are resulted by soxhlet and essential oils are extracted by hydrodistillation.*

*The oils are analyzed by gas chromatography to know the phenolic compound contents. The spectra are identified by standard compounds i.e. eugenol and linalool. These compounds are used because these are the dominant phenolic compounds in basil. The result showed that linalool spectrum is found in peak number 7 with 6,5 time retention.*

*Total phenolics analysis showed that the highest concentration of them in the ethanolic extracts is 0,25 mg/g sample and in the essential oil is 5,20 mg/g essential oil.*

*The DPPH (2,2-Diphenyl-1-ptycrylhidrazil radical) free radical scavenging activity of the ethanolic extracts and the essential oil is tested and compared with  $\beta$ -carotene and TBHQ. The result showed that the DPPH free radical scavenging activity of these antioxidant is in the order of  $\beta$ -carotene > essential oil > ethanolic extracts > TBHQ respectively.*

**Keywords :** *Basil (*Ocimum basilicum* Linn), radical scavenger, DPPH, essential oil.*

**PENDAHULUAN**

Kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) merupakan tanaman herba yang banyak ditemukan di Indonesia, hampir sebagian besar tanaman tersebut telah dimanfaatkan sebagai tanaman obat (zat antiseptik), hal ini terkait dengan kandungan senyawa kemosintesis yang sangat bervariasi seperti estragole turunan allil fenol (metil kavikol, eugenol, metil eugenol dan linalool alkohol monoterpen) (Lewinsohn *et al.*, 2000). Senyawa terpenoid yang banyak ditemukan pada kelompok basil (*ocimum*) yang dibudidayakan biasanya mengandung satu atau lebih fenil propanoid seperti eugenol, kavikol, metil eugenol, metil kavikol dan metil sinamat tetapi pada varietas tertentu hampir tidak ditemukan fenil propanoid akan tetapi tanaman ini kaya akan linalool atau 1,8-sineol (Ioannidis *et al.*, 2002).

Biasanya kemangi dikonsumsi dalam bentuk segar sebagai laapan untuk menghilangkan bau badan (Manan, 2002, Hasliza, 1999).

Kemangi mengandung minyak esensial yang kaya senyawa fenolik (Simon *et al.*, 1990, Phippen and Simon, 2000) dan senyawa alami yang meliputi polifenol seperti flavonoid dan antosianin (Phippen and Simon, 1998). Kemangi dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan alami untuk mengawetkan bahan pangan (Rice-Evans *et al.*, 1997). Penggunaan tanaman sebagai sumber antioksidan terkait dengan kandungan komponen bioaktif seperti fenolik yang meliputi antara lain flavonoid dan fenilpropanoid (Rice-Evans *et al.*, 1996). Selain itu pemanfaatan antioksidan alami dapat mereduksi pemakaian antioksidan sintesis yang disinyalir sebagai penyebab penyakit degeneratif (Widyawati dkk, 2003). Minyak atsiri yang terkandung dalam kemangi dapat dipakai sebagai sumber aroma dan flavor berbagai produk makanan (Lougrin and Kasperbauer, 2003).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melindungi bahan pangan terutama yang mengandung lemak dari oksidasi. Industri pangan nasional biasa menggunakan antioksidan sintesis maupun alami untuk mencegah peroksidasi lemak sehingga meningkatkan kualitas dan stabilitas produk pangan (Yun *et al.*, 2002), antioksidan sintesis yang sering digunakan diantaranya : BHT (Butil Hidroksi Toluena), BHA (Butil Hidroksi Anisol), TBHQ (Tersier Butil Hidroquinon). Sedangkan antioksidan alami adalah  $\beta$ -karoten dan  $\alpha$ -tokoferol.

Senyawa fenol, flavonoid, isoflavon, terpen, glikosinolat dan senyawa lain yang ada dalam bahan pangan dapat bersifat sebagai antioksidan. Kemampuan menangkap radikal bebas dari senyawa ini disebabkan adanya keterlibatan gugus hidroksil bebas pada cincin B untuk mendonorkan atom H, sedangkan kemampuan kelatung disebabkan terjadinya penyusunan struktur pada 1). 3,4-O-dihidroksikatekol pada cincin B, 2). Gugus 3- hidroksil yang terkonjugasi dengan gugus fungsi 4-okso pada cincin C, 3) gugus 5-hidroksil pada cincin A yang terkonjugasi pada gugus okso pada cincin C (Sugihara *et al.*, 2001).

Oleh karena itu sangat menarik dilakukan pengkajian kandungan senyawa fenolik dalam tanaman herba kemangi dan pengkajian kemampuan menangkap radikal bebas dalam hal ini digunakan DPPH (2,2-diphenyl-1-ptycrylhidrazil radical) sebagai sumber radikal bebas dan membandingkannya dengan  $\beta$ -karoten dan TBHQ yang biasa digunakan dalam industri pangan yang berbasis lemak.

\*) Staf Pengajar Jurusan Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, Unika Widya Mandala Surabaya

## METODOLOGI PENELITIAN

### BAHAN DAN METODE

Bahan kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) diperoleh dari pasar lokal tradisional. Bahan-bahan kimia (*analytical grade*) yang digunakan adalah etanol, *Folin ciocalteu phenol*, (+)-asam gallat, kloroform, metanol, natrium karbonat, eugenol, linalool dibeli dari merck, TBHQ dibeli dari Brataco Chemika QB 2395-98, radikal DPPH (*2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl radical*) dibeli dari sigma,  $\beta$ -karoten dibeli dari TCI-GR CO560, akuabides dibeli dari PT. Ikapharmindo Putramas Pharmaceutical D.2018020-IV, whatman 42, aluminium foil dan akuades.

### Ekstraksi Komponen Fenolik dalam Kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) (Modifikasi Metode Julkunen-Tiitto, 1985)

Senyawa fenolik yang terkandung dalam daun kemangi diekstrak dengan dua macam cara yaitu soxhlet dan hidrodistilasi. Secara metode ekstraksi soxhlet, daun kemangi dalam keadaan segar hasil sortasi diekstraksi dengan menggunakan etanol suhu ekstraksi 80°C, ekstrak yang diperoleh tersebut selanjutnya dipekatkan dengan *rotary evaporator* (Buchi Swizerland Waterbath B-480, Rotavapor R-124,B-169 Vacuum System) dalam kondisi gelap (tutup dengan aluminium foil). Sedangkan secara metode hidrodistilasi, sejumlah tertentu daun kemangi segar hasil sortasi didistilasi dengan pelarut akuades. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya disimpan ditempat gelap untuk menghindari oksidasi sampai analisis berikutnya.

### Penentuan Total Fenol dalam Ekstrak dari Kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) (Metode Julkunen-Tiitto, 1985)

Analisa ini menggunakan pereaksi *folin-ciocalteu phenol*. Sebanyak 50-100  $\mu$ l sampel dilarutkan dalam etanol sampai dicapai volume 2 ml di dalam labu ukur 10 ml. Kemudian sebanyak 1 ml pereaksi *folin ciocalteu phenol* ditambahkan lalu labu takar tersebut digoyang perlahan-lahan. Setelah itu sebanyak 5 ml sodium karbonat 20% segera ditambahkan dan volume ditepatkan menjadi 10 ml, lalu labu takar digoyang kembali. Setelah 20 menit, larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (UV-Vis-1201, Shimadzu), absorbansi campuran tersebut dibaca pada panjang gelombang 750 nm. Penentuan kadar total fenol digunakan (+)-asam gallat sebagai standar.

### Identifikasi Komponen Senyawa Fenolik dalam Kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) (Metode Laboratorium Kimia Organik UGM)

Komponen aktif yang terkandung dalam ekstrak kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) diidentifikasi dengan metode kromatografi gas (GC Hewlet Pacard 5890 Series II) dengan detector FID suhu deteksi 300 °C jenis kolom HP5 suhu injektor 270°C, dimana sampel diinjeksikan secara autosampel sebesar 0,2  $\mu$ L dan gas He sebagai gas pembawa dengan kecepatan alir 10/40 mL/min. Suhu awal kolom 140 °C kenaikan 10 °C/menit dan suhu akhir 280°C. Identifikasi senyawa fenolik terkandung dilakukan berdasarkan pustaka dan senyawa standar yang ada (*eugenol dan linalool*) sebagai komponen fenolik terbesar.

### Penentuan Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH Komponen Senyawa Fenolik dalam Ekstrak dari Kemangi (*Ocimum basilicum* Linn)

Kemampuan penangkapan radikal bebas total dari ekstrak kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) dilakukan menurut prosedur Yun (2001) dengan menggunakan radikal bebas stabil DPPH. Sejumlah larutan etanol yang mengandung ekstrak tertentu dicampur dengan pelarut etanol dan 2 ml larutan etanol dari radikal DPPH (1mM DPPH dalam 0,250 ml) ditambahkan, sehingga akhirnya diperoleh larutan 6 ml dengan konsentrasi total fenol masing – masing sebanyak 0, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225 dan 250 ppm. Campuran divortex selama 15 detik, kemudian dibiarkan udara terbuka selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan metode spektrofotometri (UV-Vis-1201, Shimadzu) pada panjang 517 nm dengan etanol sebagai blanko. Selanjutnya dilakukan uji komparatif kapasitas penangkapan radikal bebas stabil DPPH dilakukan antara ekstrak dari kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) dengan  $\beta$ -Karoten dan TBHQ.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi Komponen Senyawa Fenolik dari Kemangi (*Ocimum basilicum* Linn)

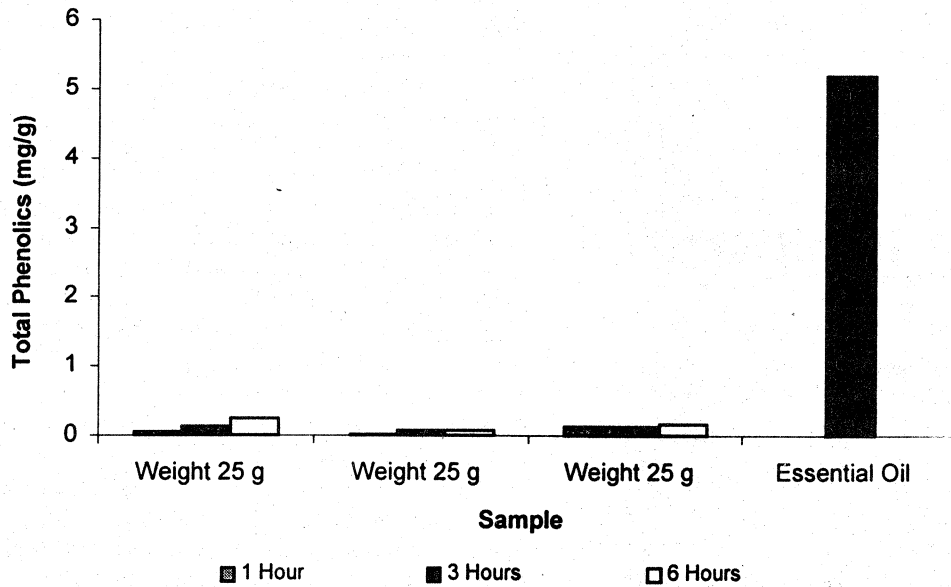
Senyawa antioksidan yang terkandung dalam kemangi diperoleh melalui ekstraksi metode soxhlet dan hidrodistilasi terhadap daun kemangi. Ekstrak antioksidan kasar (*crude antioxidant*) merupakan hasil ekstraksi metode soxhlet dengan pelarut etanol, sedangkan minyak atsiri adalah hasil metode hidrodistilasi dengan pelarut akuades. Ekstraksi metode soxhlet digunakan etanol karena senyawa yang dipisahkan bersifat polar yaitu senyawa fenolik terutama eugenol, metil kavikol dan linalool yang biasanya terikat oleh lemak atau senyawa lain dalam bentuk teresterifikasi (Julkunen-Tiitto, 1985). Penghilangan lemak (*defatted*) dapat mengaktifkan gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa fenolik. Penggunaan etanol dapat melarutkan senyawa turunan fenolik sehingga mempunyai aktivitas antioksidan. Etanol merupakan senyawa yang mempunyai dua gugus fungsi yaitu polar (gugus OH) dan non polar gugus (R), penggunaan senyawa ini dapat mengantisipasi kelemahan yang dihadapi selama proses ekstraksi, yaitu perbedaan tingkat kelarutan senyawa antioksidan dalam air dan lemak (Miller *et al.*, 2000), sehingga secara keseluruhan senyawa yang larut lemak dan air dapat terekstrak. Etanol merupakan pelarut yang *food grade* sehingga cenderung aman bagi kesehatan jika dibandingkan pelarut yang lain. Menurut Gamez-Meza *et al.* (1999) bahwa berbagai macam pelarut yang digunakan untuk ekstraksi senyawa fenol, hasil ekstrak akan meningkat seiring dengan bertambahnya kepolaran pelarut. Menurut Julkunen-Tiitto (1985) bahwa penggunaan pelarut etanol dalam ekstraksi senyawa fenolik dapat meningkatkan 6 kali lipat konsentrasi senyawa fenolik yang diperoleh.



Metode hidrodistilasi dilakukan untuk mendapatkan minyak atsiri yang bersifat volatil, senyawa ini mempunyai aktivitas antioksidan karena mengandung sejumlah senyawa fenolik (Juliani dan Simon, 2002). Hidrodistilasi dilakukan selama 3 jam dengan pelarut akuades, pertimbangan yang dilakukan adalah eugenol,

metil kavikol dan linalool yang terkandung dalam minyak atsiri bersifat polar sehingga mudah dipisahkan. Selama hidrodistilasi digunakan sampel dalam jumlah besar, hal ini mengingat kadar minyak atsiri dalam daun kemangi relatif rendah.

**Figure 1. Total Phenolics in Ethanolic Extracts and Essential Oil of Kemangi Leaves from Various Treatment Samples**



Minyak atsiri tersusun atas beberapa komponen kimia yang digolongkan sebagai senyawa fenolik dan non fenolik. Senyawa fenolik penyusun minyak atsiri dari daun kemangi sebagian besar tersusun atas senyawa fenolik golongan terpenoid terutama eugenol, metil kavikol dan linalool yang paling dominan (Loughrin and Kasperbauer, 2003 ; Grayer *et al.* 1996).

Kadar total fenol dalam ekstrak dan minyak atsiri dari daun kemangi ditentukan dengan metode *Folin Ciocalteu Phenol* yang didasarkan pada kemampuan senyawa fenolik bereaksi dengan pengoksidasi, sehingga dihasilkan senyawa kompleks molibdenum-tungsten biru. Semakin tua intensitas warna larutan menunjukkan kadar total fenol dalam sampel semakin besar. Reagen ini tidak bersifat spesifik untuk senyawa fenol dan warna yang dihasilkan sangat tergantung pada gugus hidroksi dan kedudukan gugus tersebut dalam struktur molekul. Warna biru yang dihasilkan tidak hanya ditentukan oleh jumlah senyawa fenolik yang ada, tetapi juga oleh variasi struktur dan agen pereduksi non fenolik. Oleh karena itu hasil

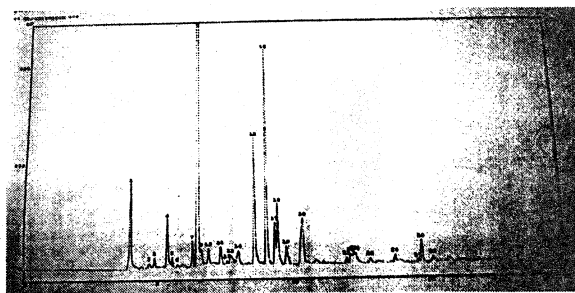
analisa yang diperoleh merupakan hasil relatif dari senyawa fenolik (Julkunen-Tiito, 1985).

Larutan standar (+)- Asam gallat digunakan untuk menentukan kadar senyawa fenol dalam ekstrak maupun minyak atsiri, hal ini disebabkan senyawa ini mempunyai gugus hidroksi dan ikatan rangkap yang terkonjugasi pada masing-masing cincin menyebabkan senyawa ini sangat efektif membentuk senyawa kompleks dengan reagen *Folin Ciocalteu Phenol*, sehingga reaksi yang terjadi lebih sensitif dan intensif (Julkunen-Tiito, 1985).

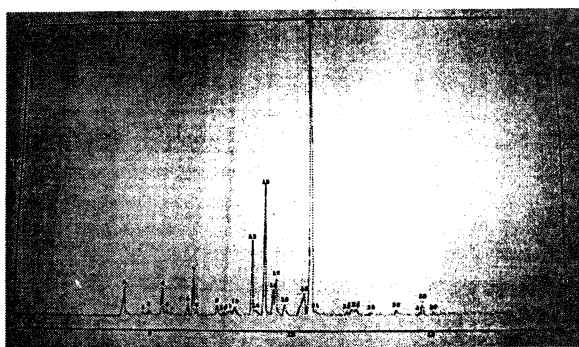
Gambar 1 menunjukkan bahwa ekstraksi sampel daun kemangi pada berbagai variasi perlakuan dengan pelarut etanol 100 ml menghasilkan kadar total fenol terbesar pada sampel dengan berat 25 gr dan waktu ekstraksi 6 jam (0.25 mg/g sampel). Sedangkan untuk proses ekstraksi dengan metode hidrodistilasi diperoleh total fenol sebesar 5,20 mg/g minyak atsiri dengan waktu ekstraksi 3 Jam.

Berat dan waktu ekstraksi berpengaruh pada kadar total fenol yang diperoleh, semakin besar waktu ekstraksi menyebabkan semakin besar waktu kontak antara pelarut dengan sampel. Peningkatan berat sampel pada waktu ekstraksi yang sama menyebabkan frekuensi kontak antar pelarut dengan sampel berbeda. Semakin banyak jumlah kontak antara pelarut dengan bahan menyebabkan meningkatnya jumlah ekstrak yang terambil.

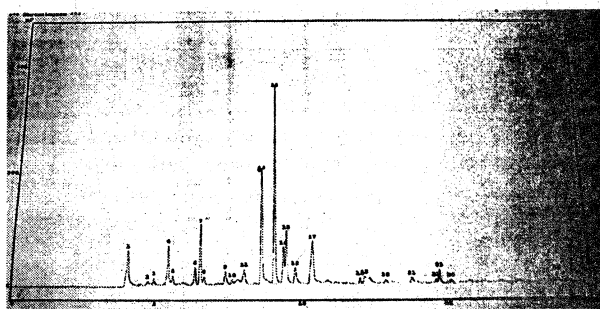
**Identifikasi Komponen Senyawa Fenolik dari Ekstrak Kemangi (*Ocimum basilicum* Linn)**



(a)



(b)



(c)

Figure 2. Chromatogram of Essential oil in Kemangi Leaves with a) Linalool Internal Standar Addition is showed in Peak No 8 with 6,5 time retention b) Eugenol Internal Standar Addition is showed in Peak No 20 with 10,7 time retention and c) without Internal Standar Addition is showed in Peak No 7 with 6,5 time retention

Ekstrak hasil metode soxhlet maupun hidrodistilasi mengandung sejumlah senyawa fenolik yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Ekstrak dari metode soxhlet biasanya mengandung minyak atsiri yang bersifat volatil dan senyawa fenolik yang mempunyai rantai yang panjang maupun senyawa non fenolik (Mustafa, 1981). Sedangkan ekstrak hasil metode hidrodistilasi diperoleh senyawa – senyawa fenolik yang bersifat volatil (minyak atsiri). Hal ini sesuai dengan Simon *et al.*, 1990 serta Phippen and Simon, 2000 bahwa kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) mengandung minyak essential yang kaya senyawa fenolik, sedangkan senyawa alami yang meliputi polifenol seperti flavonoid dan antosianin (Phippen and Simon, 1998).

Analisis pengujian senyawa fenolik hanya dilakukan pada minyak atsiri kemangi, hal ini dilakukan dengan pertimbangan bahwa minyak atsiri adalah komponen terbesar penentu aroma dan flavor serta bersifat volatil (Juliani and Simon, 2002). Uji kromatografi dilakukan dengan menambahkan larutan standar internal ke dalam sampel, hasil uji menunjukkan kromatogram dengan standar internal eugenol tampak pada puncak no 20 dengan waktu retensi 10,7 dengan konsentrasi sebesar 41,7 %. Sedangkan dengan standar internal linalool diperoleh puncak no 8 dengan waktu retensi 6,5 sebesar 39,6%. Hasil kromatogram untuk sampel tanpa penambahan standar internal menunjukkan bahwa sampel hanya mengandung senyawa linalool tampak pada puncak no 7 dengan waktu retensi 6,5 sebesar 7,1%. Sedangkan senyawa eugenol tidak ditemukan dalam minyak atsiri daun kemangi, namun demikian terdapat beberapa kromatogram yang menunjukkan adanya senyawa fenolik yang lain yang dimungkinkan berfungsi sebagai antioksidan (Juliani and Simon, 2002).

**Penentuan Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH Komponen Senyawa Fenolik dari Ekstrak Kemangi serta Antioksidan TBHQ dan  $\beta$ -Karoten**

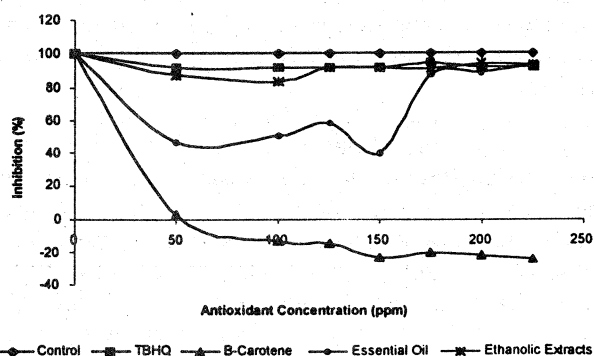


Figure 3. The Capacity of Phenolic Compounds in Ethanoic Extracts and Essential Oils From Kemangi Leaves Scavenged DPPH Free Radical and compared it with TBHQ and  $\beta$ -Carotene in Various Concentrations

Penentuan kemampuan penangkap radikal bebas oleh senyawa antioksidan didasarkan pada prosentase penghambatan antioksidan tersebut terhadap kontrol yang hanya berisi 2 ml radikal DPPH 1 mM dan etanol secara spektrofotometri UV-Vis pada  $\lambda$  517 nm. Hasil yang diperoleh menyatakan semakin besar prosentase penurunan radikal bebas ini menunjukkan aktivitas penangkap radikal bebas antioksidan bertambah, hal ini ditandai dengan menurunnya intensitas warna larutan terhadap kontrol (ungu). Berdasarkan Gambar 3 diperoleh bahwa aktivitas penangkap radikal bebas DPPH secara berurutan adalah sebagai berikut :  $\beta$ -karoten > minyak atsiri kemangi > ekstrak kemangi > TBHQ. Perbedaan tingkat aktivitas antioksidan ini disebabkan oleh adanya perbedaan struktur molekul yang dimiliki oleh senyawa aktif dari masing-masing antioksidan tersebut yang dapat terlibat dalam reaksi dengan radikal bebas DPPH.  $\beta$ -karoten merupakan senyawa isoprena yang mempunyai 10 ikatan rangkap terkonjugasi, sedangkan minyak atsiri dan ekstrak kemangi mengandung senyawa aktif, salah satunya linalool, mempunyai struktur fenol dan TBHQ berstruktur difenol tersubstitusi tertier butil.

$\beta$ -karoten mempunyai aktivitas menghambat radikal bebas DPPH paling besar. Berdasarkan strukturnya  $\beta$ -karoten tersusun atas cincin  $\beta$ -ionona dan beberapa ikatan rangkap pada rantai terbuka, terkait dengan struktur molekul tsb senyawa ini sangat reaktif sebagai penangkap radikal bebas (Hernandez *et al.*, 2001). Menurut Some (2002) dan Eskin and Przybylski (2001) bahwa  $\beta$ -karoten berfungsi sebagai antioksidan sekunder yang dapat mendekomposisi peroksida lemak dan mencegah terjadinya reaksi berantai melalui mekanisme *penangkap* oksigen reaktif (oksigen *singlet*). Menurut Ozcelik *et al.* (2001) bahwa  $\beta$ -karoten merupakan penangkap oksigen *singlet* dan mempunyai aktivitas penangkap radikal bebas karena senyawa ini dapat mendonorkan elektron atau hidrogen.  $\beta$ -karoten juga bereaksi dengan peroksil atau radikal bebas sehingga dihasilkan senyawa sangat kompleks.

Ekstrak kemangi hasil metode soxhlet maupun hidrodistilasi mempunyai aktivitas yang berbeda, hal ini sangat dimungkinkan karena perbedaan struktur molekul senyawa fenolik yang terkandung didalamnya. Kemampuan senyawa fenolik dalam menangkap radikal bebas terkait dengan adanya ikatan rangkap terkonjugasi dalam molekulnya. Menurut Almeida-Doria *et al.* (2000) dan Castelluccio *et al.* (1996) menyatakan bahwa antioksidan senyawa fenolik dapat mendonorkan hidrogen kepada radikal bebas sehingga menghasilkan radikal stabil yang berenergi rendah yang berasal dari senyawa fenolik yang kehilangan atom hidrogen, struktur radikal baru ini menjadi stabil karena terjadinya resonansi pada cincin bensenanya (radikal ariloksil).

Linalool adalah golongan terpenoid dan terdapat cincin bensenana merupakan antioksidan yang sangat potensial karena struktur senyawa radikal fenoksil yang dihasilkan karena kehilangan atom hidrogen terstabilkan oleh resonansi, oleh karena itu senyawa ini sangat efektif sebagai penangkap radikal bebas DPPH serta terdapatnya ikatan rangkap terkonjugasi. Keberadaan gugus hidroksil pada posisi ortho dan para pada struktur bensenana dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dalam sistem

peroksidasi lemak melalui kemampuannya stabilisasi radikal fenoksil yang terbentuk akibat dari donating atom hidrogen.

TBHQ menunjukkan aktivitas sebagai penangkap radikal bebas DPPH sangat rendah, hal ini terbukti dari prosentase penghambatannya sangat lemah. TBHQ merupakan senyawa difenol dengan gugus hidroksi pada posisi para serta tersubstitusi gugus donor elektron tersier butil pada posisi ortho. Berdasarkan strukturnya senyawa ini sangat efektif sebagai donor elektron atau hidrogen. Hasil pengujian, TBHQ tidak efektif sebagai penangkap radikal DPPH disebabkan tingkat kelarutannya rendah dalam sistem berbasis air, namun demikian TBHQ lebih efektif sebagai antioksidan dalam sistem lemak maupun minyak (Trilaksani, 2003).

## KESIMPULAN

Senyawa fenolik dalam daun kemangi dapat diekstrak dengan metode soxhlet dan hidrodistilasi. Hasil uji total fenol menunjukkan bahwa kadar total fenol terbesar dari ekstraksi metode soxhlet diperoleh 0,25 mg/gr sampel (25 gr sampel dengan waktu ekstraksi 6 jam). Sedangkan dari metode hidrodistilasi daun kemangi sebesar 5,20 mg/g minyak atsiri. Hasil identifikasi senyawa fenolik dalam minyak atsiri daun kemangi dari metode hidrodistilasi ditemukan adanya linalool pada waktu retensi 6,5 (puncak no 7).

Ekstrak sampel daun kemangi mempunyai aktivitas menangkap radikal bebas DPPH (*2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl radical*), kemampuan menangkap radikal bebas DPPH untuk antioksidan  $\beta$ -karoten > minyak atsiri kemangi > ekstrak kemangi > TBHQ.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Widya Mandala Surabaya melalui Program WIMA GRANT tahun 2003 atas dana yang telah disediakan untuk penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Almeida-Doria, R.F dan M.A.B. Regitano-D'arce, 2000, *Antioxidant Activity of Rosemary and Oregano Ethanol Extracts in Soybean Oil under Thermal Oxidation*, Cien. Terch. Aliment, 20(2)
- Castelluccio, C., G.P. Bolwell, C. Gerrish and C. Rice-Evans, 1996, *Differential Distribution of Ferulic Acid to the Major Plasma Constituents in relation to Its potential as an Antioxidant*, Biochem. J. 316: 691-694.
- Chen, J. H. and Ho, C.T., 1997, *Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related hydroxycinnamic Acid Compounds*, J. Agric. Food Chem., 45 : 2374-2378.
- Eskin, N. A. M. and Przybylski, R. 2001. *Antioxidants and Shelf Life of Foods. Dalam N.A. M. Eskin (Ed.) Food Shelf Life Stability, Chemical, Biochemistry, and Microbiological Changes*. CRC Press LLC, USA.

- Gamez-Meza, N. et al., 1999, *Antioxidant Activity in Soybean Oil of Extracts from Thompson Grape Bagasse*, JAOCS., 76(12):1445-1447.
- Grayer, R.J., Kik, G.C., Goldtone, F.J., Bryan, S.E., Paton, A. and Putievsky, E., 1996, *Infraspecific Taxonomy and Essential Oil Chemotypes in Sweet Basil, *Ocimum basilicum**, Phytochemistry, 43 (5) : 1033-1039
- Haraguchi, H. Isikawa, H. and Kubo, J., 1997, *Antioxidative Action of Diterpenoids from *Podocarpus Nagi**, Planta Med., 63 : 213-215.
- Hasliza, N., 1999, *Peranan Tumbuhan dalam Melangsingkan Badan dan Menghilangkan Bau Badan Manusia*, [http://pkukmweb.ukm.my/ahmad/tugasans2\\_99/a71685.htm](http://pkukmweb.ukm.my/ahmad/tugasans2_99/a71685.htm)
- Hernandez, E.P. et al., 2001, *Characterization and Stability of Pigment Extracted from *Terminalia Cattapa* Leaves*, JFS, 66 (6) : 832-836.
- Huong, N.T.T., Matsumoto, K., Kasai, R., Yamasaki, K. and Watanabe, W., 1998, *In Vitro Antioxidant Activity of Vietnamese Gingseng Saponin and Its Components*, Biol.Pharm.Bull., 21 : 978-981.
- Ioannidis, D., L. Bonner and C.B. Johnson, 2002, *UV-B is Required for Normal Development of Oil Glands in *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil)*, Annals of Botany, 90 : 453-460.
- Juliani, H.R. and Simon, J.E., 2002, *Antioxidant Activity of Basil*, Trends in New Crops and New Uses in J.Janick and A. Whiphey (Eds), ASHS Press, Alexandria, VA.
- Julkunen-Tiitto, R. 1985. *Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics*. J. Agric. Food Chem., 33:213-217
- Karamac, M., Marowicz, R., Weidner, S., Abe, S. and Shahidi, F., 2002, *Antioxidant Activity of Rye *Caryopses* and Embryos Extracts*, Czech JFS., 20 : 209-214.
- Lewinsohn et al., 2000, *Biosynthesis of Estragole and Methyl-Eugenol in Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) Developmental and Chemotypic Association of Allylphenylmethyltransferase Activities*, Plant Sci., 160(1) : 27-35.
- Loughrin, J.H. and Kasperbauer, M.J., 2003, *Aroma Content of Fresh Basil (*Ocimum basilicum* Linn) Leaves is Affected by Light Reflected from Colored Molches*, J.Agric.Food. Chem., 51(8) : 2272-2276.
- Manan, H.A., 2002, *Sirih dan Beluntas Atasi Bau Mulut dan Badan*, Harian Umum Suara Merdeka (edisi Sabtu, 20 April 2002).
- Miller, H.E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A. and Kanter, M., 2000, *Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereals, Fruits and Vegetables*, J. Am. Coll.Nutr., 19 (3) : 312S - 319S.
- Mustafa, A., 1981, *Aspek Teknis Pengolahan Rempah-Rempah menjadi Oleoresin dan Minyak Rempah-Rempah*, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian, Bogor.
- Ozcelik, B. J.Lee and D.B. Min, 2001, *Evaluation of Electron Donating Ability of  $\beta$ -Karoten by Using Soybean Oil and 2,2-diphenyl-1-Pycrylhidrazil (DPPH) in Acetone System*, IFT Annual Meeting, New Orleans, Louisiana.
- Phippen, W.B. and Simon, J.E., 1998, *Anthocyanins in Basil (*Ocimum basilicum* Linn)*, J. Agr. Food. Chem., 46 : 1734-1738.
- Phippen, W.B. and Simon, J.E., 2000, *Anthocyanin Inheritance and Instability in Purple Basil (*Ocimum basilicum* Linn)*, J. Hered, 91 : 289 - 296.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1996, *Structure Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids*, Free Radical Biol. Med., 20 : 933-956.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G., 1997, *Antioxidant Properties of Phenolic Compounds*, Trends Plant Sci., 2 : 152 - 159.
- Simon, J.E., Quinn, J. and Murray, R.G., 1990, *Basil : A Source of Essential Oils*, In J. Janick and J.E. Simon (Eds), Advances New Crops, Timber Press, Portland, OR
- Sugihara, N., M. Ohnishi, M. Imamura and K. Furuno, 2001, *Differences in Antioxidative Efficiency of Catechins in Various Metal-Induced Lipid Peroxidations in Cultured Hepatocytes*, J of Health Science, 47(2):99-106.
- Trilaksani, W., 2003, *Antioksidan : Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran terhadap Kesehatan*, IPB, Bogor.
- Widyawati, P.S., Suprijono, M.M. and Frida, 2003, *Potensi Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) sebagai Antioksidan dalam Minyak Goreng*, Laporan Penelitian, Unika Widya Mandala Surabaya, Surabaya.
- Yu, L., 2001, *Free Radical Scavenging Properties of Conjugated Linoleic Acids*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49:3452-3456.
- Yu, L., Scalin, L., Wilson, J. and Schmidt, G., 2002, *Rosemary Extracts as Inhibitors of Lipid Oxidation and Color Change in Cooked Poultry Products*, JFS (in Press).