



Kandungan Total Fenol Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.)

*Total Content of Fenol and Antioxidant Activity of The Aqueous Extract of Cherry Leaf (*Muntingia calabura* L.)*

Mhd Riza Marjoni¹, Afrinaldi¹, Ari Devi Novita¹

¹Pharmaceutical Academy, Dwi Farma Bukittinggi, West Sumatera

KATA KUNCI *Aktivitas Antioksidan; Muntingia Calabura L.; Total Fenol; DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)*

KEYWORDS *Antioxidant Activity; Total Phenolic; Muntingia Calabura L.; DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)*

ABSTRAK *Telah dilakukan penelitian penetapan kandungan fenolik total dan aktivitas antioksidan ekstrak air daun kersen (*Muntingia calabura* L.). Penelitian ini bertujuan untuk melihat perbedaan kandungan fenolik total dan nilai IC₅₀ dari ekstrak air daun kersen. Ekstrak dibuat menggunakan metoda infusa dengan pelarut air. Hasil pemeriksaan kandungan fenolik total menggunakan metode Folin-Ciocalteu adalah 2,86 mg/50 gram dan uji aktivitas antioksidan yang dilakukan dengan menggunakan metode DPPH didapatkan IC₅₀ 196,80 µg/mL.*

ABSTRACT *The study of determination of total phenolic content and antioxidant activity of the aqueous extracts of cherry leaves (*Muntingia calabura* L.) was conducted. This study was aimed to know the total phenolic content and the IC₅₀ value of the water extract of cherry leaves. The extracts were made using the method of infusion with water solvent. The total phenolic content found using the Folin-Ciocalteu method was 2.86 mg/50 grams and the antioxidant activity using the DPPH method showed the IC₅₀ of 196.80 µg/mL.*

PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Atom-atom ini

untuk mencapai kestabilan, akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron.

Correspondence:

Mhd Riza Marjoni, Pharmacy Academy, Dwi Farma Bukittinggi
Email : mhdriza.marjoni@gmail.com

Reaksi ini akan berlangsung secara terus-menerus dalam tubuh dan apabila tidak dihentikan dapat merusak sel sehingga sangat berbahaya bagi kesehatan serta akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya. (Kikuzaki, *et al.*, 2002)

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Radikal bebas adalah atom yang tidak stabil karena kehilangan pasangan elektronnya. (Yuliarti, 2008)

Antioksidan dapat diperoleh dari makanan yang banyak mengandung vitamin C, vitamin E dan beta karoten serta senyawa fenolik. Bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami, seperti rempah-rempah, coklat, biji-bijian, buah-buahan, sayur-sayuran seperti buah tomat, pepaya, jeruk dan sebagainya. (Prakash, 2001; Trevor, 1995). Antioksidan dari tumbuhan bekerja menghalangi kerusakan oksidatif dengan membentuk kelat dengan senyawa logam katalitik, dan menangkap oksigen. (Khelifi *et al.*, 2005)

Flavonoida merupakan komponen fenolik yang terdapat dalam buah-buahan, sayur-sayuran yang bertindak sebagai penampung yang baik terhadap radikal hidroksil dan superoksida dengan melindungi lipida membran terhadap reaksi oksidasi yang merusak. (Lee *et al.*, 2003)

Tumbuhan kersen yang banyak tumbuh di berbagai tempat di

Sumatera Barat memiliki berbagai kandungan seperti flavonoida, tanin, vitamin C, karoten, riboflavin (Ekayaton, 2010). Hal ini memungkinkan untuk dieksplorasi sebagai antioksidan alami. Menurut penelitian terdahulu diketahui bahwa ekstrak metanol daun kersen memiliki aktivitas antioksidan sebesar 21,786 µg/mL. (Indah, 2013; Kuntorini, 2013)

Berdasarkan hal di atas maka dilakukan penelitian ini, dengan tujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan dan kadar fenolat total, dari ekstrak air daun kersen. Untuk menentukan kadar fenolat total digunakan metoda *Folin-Ciocalteu* dengan senyawa pembanding asam galat. Sedangkan pada pengujian aktivitas antioksidan dengan metode serapan radikal bebas DPPH.

BAHAN DAN CARA KERJA

Alat-Alat

Alat yang digunakan adalah: kertas saring Whatman No. 1, cawan penguap, timbangan digital, labu ukur, plat tetes, pipet ukur, pipet mikro, spatel, aluminium foil, desikator, labu Erlenmeyer, kaca arloji, *vial*, gelas ukur, corong pisah, tabung reaksi, seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis. (Rayleigh 7200)

Bahan

Bahan yang digunakan antara lain: Daun kersen, air suling, metanol p.a (Merck), asam galat p.a (Merck), Reagen *Folin-Ciocalteu*, Natrium karbonat p.a (Merck), DPPH p.a (Merck), Etanol 96%.

Pembuatan Reagen

- Pembuatan larutan induk asam galat (1 mg/mL) (Waterhouse, 1999)

Ditimbang 50 mg asam galat tambahkan 1 mL etanol 96 %, ditambahkan aquades sampai volume akhir 50 mL.

- b. Pembuatan larutan Na_2CO_3 10 % (Waterhouse, 1999)

Ditimbang 10 g Na_2CO_3 dan tambahkan aquades sampai 20 mL kemudian didiamkan selama 24 jam

- c. Pembuatan larutan DPPH (Molyneux, 2004)

Ditimbang sebanyak 5 mg DPPH dan dilarutkan dengan metanol dalam labu sampai 250 mL sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi $\pm 50 \mu\text{M}$.

Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan adalah daun kersen yang diambil di daerah Kamang Kabupaten Agam, Sumatera Barat.

Penyiapan Sampel

Daun kersen segar (*Muntingia folium*) dicuci bersih, dikeringkan dan dirajang. Ditimbang sebanyak 50 g, ditambahkan aquades sampai 500 mL lalu diaduk homogen. Dididihkan pada suhu 90°C selama ± 15 menit dalam panci infus sambil sesekali diaduk. Hasil infusa disaring panas dan diperas. Ampas dibilas berulang kali sampai filtrat terakhir negatif dengan FeCl_3 . Filtrat yang didapat lalu dikeringkan (berat ekstrak kering total = 2,14 gram).

Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat dengan Reagen Fenol Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 1999)

Ditimbang 50 mg asam galat, ditambahkan 1 mL etanol 96 %, lalu ditambahkan aquades sampai volume akhir 50 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/mL. Dari larutan induk asam galat konsentrasi 1

mg/mL dipipet 1 mL, 1,25 mL, 1,5 mL, 1,75 mL dan 2 mL, secara berturut turut lalu diencerkan dengan aquades sampai volume akhir 10 mL sehingga dihasilkan konsentrasi 100, 125, 150, 175, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ asam galat, secara berturut-turut.

Dari masing-masing konsentrasi larutan asam galat dipipet 0,2 mL lalu ditambah 15,8 mL aquades dan 1 mL Reagen *Folin-Ciocalteu* dan dikocok sampai homogen serta didiamkan selama 8 menit. Diambahkan 3 mL larutan Na_2CO_3 10% lalu dikocok homogen, dan selanjutnya didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm, lalu dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dengan serapan.

Penetapan Kandungan Fenol Total dengan Metoda Folin-Ciocalteu (Orak, 2006)

Ditimbang 100 mg ekstrak kemudian dilarutkan sampai 10 mL dengan aquades sehingga diperoleh konsentrasi 10 mg/mL. Dari konsentrasi 10 mg/mL dipipet 1 mL dan diencerkan dengan aquades hingga 10 mL dan diperoleh konsentrasi ekstrak 1 mg/mL. Dipipet 0,2 mL ekstrak, ditambahkan 15,8 mL aquades dan 1 mL reagen *Folin-Ciocalteu* lalu dikocok. Didiamkan selama 8 menit kemudian ditambahkan 3 mL Na_2CO_3 10% ke dalam campuran. Didiamkan larutan selama 2 jam pada suhu kamar. Diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm. Dilakukan 3 (tiga) kali pengulangan sehingga kadar fenol yang diperoleh hasilnya didapat sebagai mg ekuivalen asam galat/g sampel segar.

Pentapan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH (Okawa, 2001)

Dipipet sebanyak 3,8 mL larutan DPPH 50 μ M dan ditambahkan 0,2 mL metanol. Setelah dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap, serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500 - 700 nm.

Penetapan Serapan Kontrol (Okawa, 2001)

Dipipet larutan DPPH 50 μ M sebanyak 3,8 mL dan ditambahkan aquades 0,2 mL. Diukur serapan dengan spektrofotometer UV-Vis.

Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan (Hanani, 2005; Okawa, 2001)

Ditimbang ekstrak sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan dengan aquades sampai 100 mL dalam labu ukur maka didapatkan konsentrasi 1 mg/mL. Dari larutan induk, dilakukan pengenceran dengan menambahkan aquades dengan perbandingan yang telah ditetapkan, sehingga diperoleh sampel dengan konsentrasi (100, 150, 200, 250, 300 μ g/mL). Untuk penentuan aktivitas antioksidan masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,2 mL larutan sampel dengan pipet mikro dan masukan ke dalam vial, kemudian ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 50 μ M. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap, absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

Pengolahan Data

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi

serapan DPPH dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Serapan kontrol} - \text{Serapan sampel}}{\text{Serapan kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

Serapan kontrol : Serapan radikal DPPH 50 μ M pada panjang gelombang 508 nm.

Serapan sampel : Serapan dalam radikal DPPH 50 μ M pada panjang gelombang 508 nm

Nilai IC₅₀ masing-masing konsentrasi sampel dihitung dengan menggunakan rumus persamaan regresi linier

HASIL

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut :

1. Ekstrak kering yang diperoleh adalah 2,14 g dari 50 g sampel kering
2. Panjang gelombang maksimum DPPH yang didapat adalah 508 nm pada konsentrasi 50 μ M
3. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH terhadap ekstrak air pada konsentrasi 100, 150, 200, 250, dan 300 μ g/mL, diperoleh IC₅₀ sebesar 196,80 μ g/mL
4. Kadar fenolat total yang terdapat pada daun kersen adalah setara dengan asam galat 2,86 mg/50 g daun segar.

PEMBAHASAN

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metoda infusa dengan menggunakan air karena cara ini merupakan metoda yang mudah

dilakukan dan menggunakan alat-alat sederhana. Perlakuan hanya dengan cara menyari dengan pelarut air pada temperatur 96 °C-98 °C selama 15-20 menit. Semua filtrat yang diperoleh dari hasil infusa, dikeringkan sehingga diperoleh ekstrak kering sebanyak 2,14 g dari 50 g sampel kering. Pada penelitian yang terdahulu diuji struktur anatomi dan aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kersen dengan IC_{50} yang didapatkan sebesar 21,786 $\mu\text{g/mL}$ (Kuntorini, 2013). Sementara itu, sebagian besar senyawa polifenol dan flavonoida yang terdapat dalam daun kersen, juga bisa larut dalam pelarut polar lain seperti air.

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode serapan radikal DPPH karena merupakan metode yang sederhana, mudah, dan menggunakan sampel

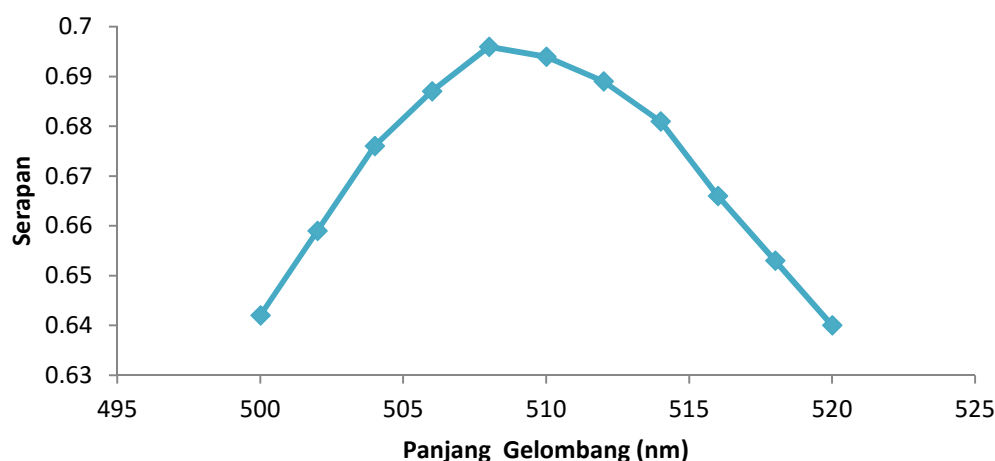
dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat. (Hanani, 2005) Adanya aktivitas antioksidan dari sampel mengakibatkan terjadinya perubahan warna pada larutan DPPH dari ungu pekat menjadi kuning pucat. (Permana, 2003)

Panjang gelombang maksimum DPPH yang didapat adalah 508 nm pada konsentrasi 50 μM . Adanya aktifitas antioksidan dari sampel mengakibatkan perubahan warna pada larutan DPPH yang semula berwarna ungu pekat menjadi kuning pucat. Aktivitas antioksidan dari ekstrak air daun kersen dinyatakan dalam persentase inhibisinya dari perbedaan serapan antara serapan kontrol DPPH dengan serapan sampel yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 1. Daun Kersen (*Muntingia folium*)

KANDUNGAN TOTAL FENOL DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK AIR DAUN KERSEN
(*MUNTINGIA CALABURA L.*)



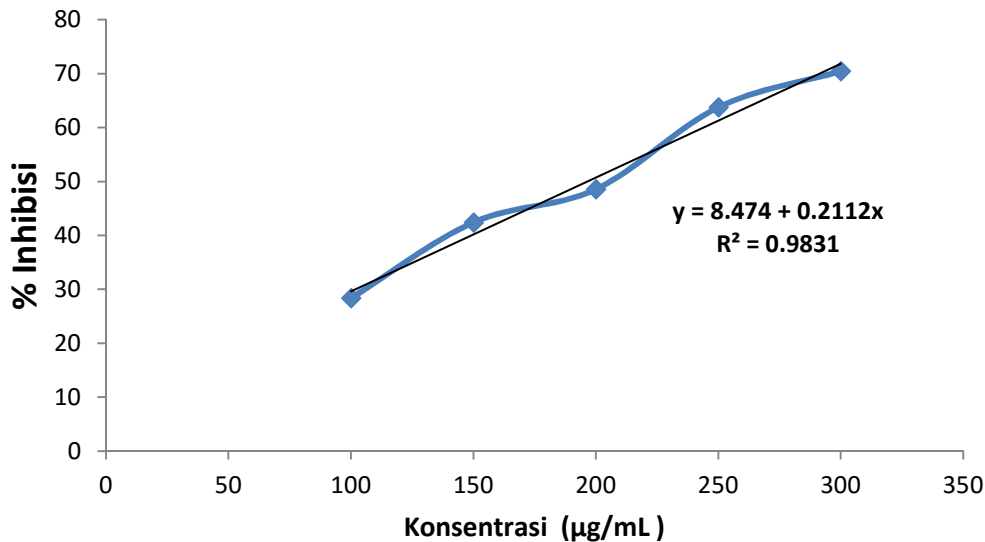
Gambar 2. Grafik Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Tabel 1. Data Pengukuran Serapan Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia folium*)

Konsentra si (µg/mL)	Serapan pada setiap ulangan			Rata-rata Serapan	% Inhibisi Rata-rata	IC ₅₀ Rata- rata (µg/m L)
	1	2	3			
100	0,500	0,500	0,501	0,500 ± 0.1171	28,36	196,80
150	0,402	0,403	0,402	0,402 ± 0.0057	42,40	
200	0,360	0,359	0,359	0,359 ± 0.0056	48,56	
250	0,254	0,254	0,253	0,253 ± 0.0057	63,75	
300	0,208	0,206	0,205	0,206 ± 0.0012	70,48	

Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH terhadap ekstrak air pada konsentrasi 100, 150, 200, 250, dan 300 µg/mL, diperoleh IC₅₀ sebesar 196,80 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak mempunyai aktivitas

antioksidan yang kuat karena mempunyai IC₅₀ kurang dari 200 µg/mL (Blouis, 1958). Ekstrak air daun kersen pada penelitian ini memiliki harga IC₅₀ 196,80 µg/mL. Harga IC₅₀ ini masih lebih kecil jika dibandingkan dengan ekstrak metanol, hal ini diduga karena zat yang mempunyai aktivitas antioksidan lebih banyak terlarut dalam metanol dibandingkan dalam air.



Gambar 3. Kurva Kalibrasi Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia folium*)
persamaan regresi linier $Y = 8,474 + 0.2112x$, $R^2 = 0,9831$, $SD = 16,844$, $BD = 239,48$
 $\mu\text{g/mL}$ dan $BK = 798,3 \mu\text{g/mL}$

Keterangan: SD = standar deviasi, BD = batas deteksi, dan BK = batas kuantisasi

Untuk mendapatkan persamaan regresi dibuat kurva kalibrasi untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi dengan serapan, sehingga didapatkan persamaan regresi. Setelah dilakukan pengukuran didapatkan persamaan regresi linier $\hat{y} = 8,474 + 0,211x$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9915$ dan koefisien determinasi $R^2 = 0,983$. Artinya 98,3% dari persen inhibisi dipengaruhi oleh konsentrasi, sedangkan sisanya dipengaruhi oleh faktor lain seperti suhu, cahaya dan lain sebagainya. Dari penelitian yang telah dilakukan didapat IC_{50} dari ekstrak air daun kersen sebesar $196,80 \mu\text{g/mL}$. Artinya, pada konsentrasi $196,80 \mu\text{g/mL}$ sampel dapat menghambat 50% radikal bebas.

Dari sejumlah penelitian pada tanaman obat dilaporkan bahwa banyak tanaman obat yang mengandung antioksidan dalam jumlah besar. Efek antioksidan terutama disebabkan karena adanya

senyawa fenol seperti flavonoida, asam fenolat. Biasanya senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi orto dan para terhadap gugus $-OH$ dan $-OR$. Setelah dilakukan pemeriksaan kandungan kimia ternyata daun kersen mengandung fenolat dan flavonoida, maka dilanjutkan dengan penentuan kandungan fenolat total.

Pada penetapan kadar senyawa fenolat total digunakan asam galat sebagai larutan standar. Serapan maksimum asam galat diperoleh pada panjang gelombang 765 nm. Sebelum dilakukan pemeriksaan kadar fenolat total, terlebih dahulu dibuat kurva kalibrasi larutan standar asam galat dengan konsentrasi 100, 125, 150, 175, dan $200 \mu\text{g/mL}$. Pembuatan kurva kalibrasi ini berguna untuk membantu menentukan kadar fenol dalam sampel melalui persamaan regresi dari kurva kalibrasi.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Serapan Larutan Standar Asam Galat pada Panjang Gelombang 765 nm dengan Spektrofotometer UV-Vis

Nomor	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Serapan
1	100	0,179
2	125	0,209
3	150	0,228
4	175	0,244
5	200	0,256

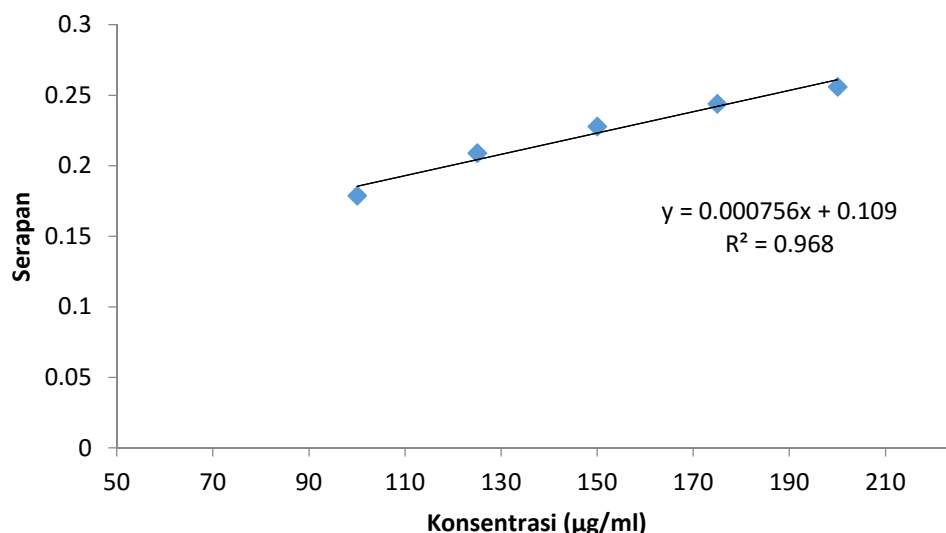
Dari pemeriksaan larutan standar asam galat didapat kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $\hat{Y} = 0,000756x + 0,1098$ dan harga koefisien korelasi (r) yaitu 0,96843; simpangan baku (SB) = 0,0005 ; batas deteksi (BD) = 1,98 $\mu\text{g/mL}$; dan batas kuantisasi = 6,61 $\mu\text{g/mL}$. Dari data persamaan regresi didapatkan bahwa nilai $b = + 0,1098$ yang berarti setiap x (Konsentrasi sampel bertambah 1 $\mu\text{g/mL}$ maka y (% Inhibisi) meningkat sebesar 0,1098. Nilai r yang mendekati 1 membuktikan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier. Kurva regresi juga menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang erat antara konsentrasi dengan % inhibisi.

Dari nilai R^2 (R square) dapat diketahui bahwa terdapat keeratan hubungan yang signifikan antara konsentrasi pelarut dengan % inhibisi yang diamati dengan derajat keeratan sebesar 0,96843 dan simpangan baku

yang kecil menunjukkan ketepatan yang cukup tinggi.

Konsentrasi larutan sampel dapat ditentukan dengan menggunakan kurva kalibrasi dengan cara mengukur serapan sampel kemudian kadar fenolat total dalam ekstrak daun kersen dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear. Kandungan fenolat total dalam ekstrak air daun kersen 2,86 g /mL yang setara dengan 50 gr daun segar (Tabel 2). Data yang diperoleh ini cukup akurat dan teliti di mana dapat dilihat dari nilai koefisien variansi yang kecil dan nilai batas kuantisasi 6,61 $\mu\text{g/mL}$.

Kadar fenolat total yang diperoleh dalam ekstrak adalah 2,86 mg/50 g sampel segar, jadi melebihi nilai batas kuantisasi. Batas kuantisasi merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. (Miller, 1993; Riley, 1996).



Gambar 4. Kurva Kalibrasi Asam Galat dalam Reagen *Folin-Ciocalteu* pada Panjang Gelombang 765 nm

persamaan regresi linier $Y = 0,000756x + 0,109 X$, $R^2 = 0,968$, $SD = 0,0005$,

$BD = 1,98 \mu\text{g/ml}$ dan $BK = 6,61 \mu\text{g/mL}$

Keterangan: SD = standar deviasi, BD = batas deteksi, dan BK = batas kuantisasi

Kurva regresi juga menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang erat antara konsentrasi dengan serapan. Hal ini diperlihatkan dengan nilai r (koefisien korelasi), dan R^2 (koefisien determinasi). Kurva tersebut merupakan kurva dari perbandingan antara konsentrasi dengan serapan. Semakin besar konsentrasinya maka nilai serapannya akan semakin besar pula. Dari kalibrasi didapat persamaan regresi $\hat{Y} = 0,000756x + 0.1098$ dan koefisien korelasi (r) = 0,9843. Sedangkan koefisien determinasi (R^2) = 0,9688 yang mempunyai arti 96,8% serapan dipengaruhi oleh konsentrasi.

Pada penetapan kadar fenolik total sampel digunakan ekstrak dengan konsentrasi 1 mg/mL ditentukan dengan cara mengukur serapan yang merupakan hasil reagen *Folin-Ciocalteu* dengan sampel, menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi asam galat.

Pada penetapan kadar fenolik total sampel digunakan konsentrasi 1 mg/mL dan dapat ditentukan dengan mengukur serapan hasil reaksi antara reagen *Folin-Ceocalteu* dengan sampel menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi sehingga diperoleh kadar fenolik total sebesar 2,86% b/b yang dihitung sebagai asam galat.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil simpulan bahwa ekstrak air daun kersen mempunyai kemampuan meredam radikal bebas DPPH ($IC_{50} = 196,80 \mu\text{g/mL}$) dan kadar fenolat total yang terdapat pada daun kersen setara dengan asam galat 2,86 mg/50 g daun segar.

KEPUSTAKAAN

- Ekayaton dkk. 2010. Jakers (jam kersen) sebagai alternative obat asam urat PKM gagasan tertulis. Universitas Negeri Yogyakarta.
- Hanani EA, Mun'im R dan Sekarini 2005. Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *Callispongia* sp dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2(3): 127-133.
- Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, and Kim JH 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci*. 73: 167-179.
- Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, and Taniguchi H 2002. Antioxidants properties of ferulic acid and its related compound, J. *Agric.Food Chem*. 50: 2161-2168.
- Kuntorini EM, Fitriana, Setya dan Astuti MD 2013. Stuktur anatomi dan uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kersen. *Jurnal Prosidding Semirata*. Program Studi Biologi FMIPA Universitas Lambung Mangkurat.
- Molyneux P 2004. The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol*. 26(2): 211-219.
- Okawa M, J Kinjo, T Nohara and M Ono 2001. Modification method DPPH (2-2-difenil-1-pikrilhidrazil) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol. Pharm. Bull*. 24(10): 1202-1205.
- Orak H 2006. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities in red grape varieties. *Electronic Journal of Polish Agricultural University Food Science and Technology*. 9: I17 - 118.
- Prakash A 2001. Antioxidant activity medallion laboratories: analytical progres 19(2): 1-4.
- Indah, SY dan Darwati 2013. Keajaiban daun tumpas tuntas penyakit. *Tibbun Media*. Jakarta.
- Trevor R 1995. Kandungan organik tumbuhan, Diterjemahkan oleh Kosasih, Padmawinata. Edisi 6, Bandung.
- Yuliarti N 2008. Racun di sekitar kita. Andi Offset. Yogyakarta: 25-28
- Waterhouse A 1999. Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine, Department of Viticulture & Enology University of California. Davis: 152-178.