

ARTIKEL PENELITIAN

Perbandingan Aktivitas Antioksidan dan Kadar Tanin Ekstrak Pegagan dengan Produk Jadi Pegagan

Achmad Zaki Maulidzy,¹ Adisti Dwijayanti^{2*}

¹Program Studi Pendidikan Dokter

²Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran, FK Universitas Indonesia

*Korespondensi: adisti.dwijayanti@ui.ac.id

Diterima 3 Februari 2016; Disetujui 22 April 2016

Abstrak

Centella asiatica (pegagan) merupakan tanaman berkhasiat yang sudah banyak diolah menjadi produk jadi herbal dan dipasarkan. Produsen produk jadi herbal tersebut mengklaim bahwa produknya memiliki efek antioksidan yang bermanfaat bagi tubuh. Belum ada penelitian yang membandingkan aktivitas antioksidan ekstrak pegagan dengan produk jadinya yang telah beredar di pasaran. Tujuan penelitian ini adalah membandingkan aktivitas antioksidan dan kadar tanin ekstrak air dan ekstrak etanol pegagan dengan tiga produk jadi herbal pegagan yang beredar di masyarakat. Ekstrak air pegagan dibuat dengan cara infusa sedangkan ekstrak etanol pegagan dibuat dengan cara maserasi. Tiga jenis produk jadi herbal pegagan yang diuji diperoleh secara bebas dari pasaran. Aktivitas antioksidan diukur dengan membandingkan nilai EC_{50} kelima sampel uji menggunakan pereaksi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Kadar tanin diuji secara kualitatif dan semikuantitatif menggunakan pereaksi $FeCl_3$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak air dan etanol pegagan lebih baik daripada ketiga produk jadinya ($p \leq 0,05$). Hasil uji kualitatif tanin menunjukkan bahwa semua sampel memiliki kandungan tanin namun pada hasil uji semikuantitatif diperoleh kadar tanin yang sangat sedikit sehingga dapat diabaikan.

Kata kunci: *Centella asiatica*, antioksidan, tanin

Comparison of Antioxidant Activity and Tannin Level of Pegagan Extract to Commercially Available Product

Abstract

Centella asiatica (pegagan) is a well-known traditional medicinal plant that has been processed into many commercial herbal products. Those herbal products were claimed to have antioxidant effects which were beneficial to overcome free radicals in the body. Antioxidant activity of those commercial products compared to the extracts has not been studied yet. The aim of this study is to compare the antioxidant activity and tannin levels of water and ethanol extracts of *C. asiatica* compared to three herbal products of *C. asiatica*. Water extract is made by infusion while ethanol extract is made by maceration. Three brands of *C. asiatica* products were obtained from the market. Levels of antioxidants were measured by comparing the EC_{50} value using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Tannin levels were measured qualitatively and semiquantitatively using $FeCl_3$. Results showed that antioxidant activity of the water and ethanol extract of *C. asiatica* were significantly higher than the commercial products ($p \leq 0.05$). Tannin's semiquantitative test showed that all samples contained tannins but the amount was very low.

Keywords: *Centella asiatica*, antioxidants, tannin

Pendahuluan

Radikal bebas merupakan salah satu dari sekian banyak penyebab kerusakan sel dan jaringan dalam tubuh.¹ Radikal bebas dalam bentuk *reactive oxygen species* (ROS) mengakibatkan stres oksidatif yang menimbulkan kerusakan sel.² Pada proses penuaan, peningkatan produksi radikal bebas berperan dalam proses stres oksidatif yang berdampak pada penurunan kerja sel.¹ Selain pada proses penuaan, radikal bebas juga berperan dalam berbagai patogenesis penyakit kardiovaskular, gangguan neurologis, dan kanker.² Menurut laporan *Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2010*,³ penyakit kardiovaskular merupakan penyakit dengan mortalitas tertinggi diikuti oleh kanker. Untuk menangani radikal bebas tersebut, tubuh membutuhkan antioksidan yang dapat menetralkan reaksi oksidatif dari radikal bebas.⁴

Tubuh manusia memiliki mekanisme untuk menetralkan reaksi oksidatif dengan membentuk zat antioksidan yang disebut antioksidan endogen. Selain dihasilkan di dalam tubuh, antioksidan juga dapat berasal dari luar tubuh yang disebut antioksidan eksogen. Antioksidan eksogen memiliki efek penting karena membantu antioksidan endogen menghadapi radikal bebas.¹

Antioksidan eksogen dapat berasal dari bahan kimia maupun alamiah. Secara alamiah, terdapat berbagai sumber antioksidan yang umumnya berasal dari bahan pangan. Contoh bahan pangan yang menghasilkan antioksidan adalah buah-buahan dan tanaman terutama tanaman obat. Sebagai salah satu sumber antioksidan, tanaman obat memiliki kemampuan untuk melawan radikal bebas.^{5,6}

Pegagan memiliki efek neuroprotektif yang melindungi otak dari reaksi oksidasi.⁶ Selain itu, pegagan juga meningkatkan kemampuan belajar dan memori pada model tikus yang mengalami penyakit alzheimer.⁵ Pegagan dapat ditemukan tumbuh di halaman rumah dan digunakan sebagai sayuran serta mengobati penyakit.⁶

Saat ini, banyak perusahaan farmasi yang memproduksi ekstrak berbagai jenis herbal, termasuk pegagan dalam bentuk kapsul dan pil dengan tujuan agar mudah dikonsumsi. Produsen mengklaim bahwa produk jadi tersebut selain mengandung antioksidan juga dapat mengobati pikun, melancarkan peredaran darah, dan sebagai nutrisi bagi otak. Dari klaim produsen tersebut muncul pertanyaan apakah tingkat dan kandungan antioksidan pada ekstrak herbal tersebut sama

dengan kandungan antioksidan ekstrak air dan etanol herbal pegagan hasil ekstraksi sendiri.

Metode

Penelitian laboratorium ini dilakukan untuk mengetahui tingkat aktivitas antioksidan dan kadar fitokonstituen tanin ekstrak air herbal pegagan, ekstrak etanol herbal pegagan dan tiga produk jadi ekstrak herbal pegagan. Sampel penelitian adalah pegagan yang diperoleh dari Badan Penelitian Tanaman Obat dan Rempah (Balitro) dan tiga produk herbal berbeda dari tanaman pegagan yang dibeli secara bebas (disebut Produk A, Produk B, dan Produk C). Ketiga produk tersebut telah terdaftar di Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) dan termasuk kategori jamu.

Alat yang digunakan adalah spektrofotometer UV VIS (Optima 3000), lemari pengering, mikropipet 25 μ l dan 1000 μ l, timbangan analitik merk Mettler A 200, gelas ukur, tabung reaksi, *rotary evaporator* merk Buchi dan kertas saring. Bahan yang digunakan adalah DPPH, FeCl₃ 0,1%, larutan standar tanin, dan akuades. Penelitian dikerjakan di laboratorium Departemen Ilmu Farmasi Kedokteran FKUI dari bulan Juli hingga Desember 2015.

Sebanyak 150g daun pegagan kering yang sudah dihaluskan direndam dalam 150ml air lalu diekstraksi dengan metode infusa untuk memperoleh ekstrak air pegagan. Hasil infusa dievaporasi kemudian diukur kadar airnya dengan metode gravimetri. Ekstrak etanol pegagan dibuat dengan merendam 150g daun pegagan kering yang sudah dihaluskan ke dalam 150ml etanol 70%, kemudian diekstraksi dengan metode maserasi. Hasil maserasi dievaporasi dan diukur kadar airnya dengan metode gravimetri.

Larutan DPPH dibuat dengan menimbang 3,9mg DPPH yang dilarutkan dalam 10ml metanol. Larutan blanko dibuat dengan memasukkan metanol 70% sebanyak 2500 μ l dalam tabung reaksi. Larutan kontrol DPPH didapat dengan mencampurkan 2000 μ l metanol 70% dengan 500 μ l larutan DPPH ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya dibuat larutan stok ekstrak pegagan dengan menimbang ekstrak air pegagan 0,612g (kadar air = 18,40%) dan menimbang ekstrak etanol pegagan 0,671g (kadar air = 25,5%). Ekstrak air dan etanol pegagan yang telah ditimbang dilarutkan dalam 5ml akuades.

Larutan stok ketiga produk jadi herbal pegagan dibuat dengan menimbang satu kapsul produk herbal kemudian dilarutkan dalam larutan akuades

untuk membuat larutan dengan konsentrasi 10%. Sebagai contoh, apabila berat kapsul adalah 500mg, maka dilarutkan dalam 5ml larutan akuades. Sebelum digunakan, larutan produk herbal dikocok terlebih dahulu karena produk herbal tidak larut sepenuhnya.

Larutan sampel uji dibuat dengan mengencerkan larutan stok ekstrak dari ekstrak air pegagan, ekstrak etanol pegagan, dan 3 produk jadi herbal pegagan (produk A, B, dan C) menjadi lima variasi kadar yaitu 4%, 3%, 2%, 1%, dan 0,5%. Masing-masing sampel uji dibuat duplo dengan komposisi 100 μ l ekstrak + 500 μ l larutan DPPH + 1900 μ l air. Setelah itu larutan diaduk hingga homogen dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Seluruh larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 515nm.⁹ Pengukuran ini diulang sebanyak tiga kali.

Uji kualitatif tanin dilakukan dengan mencampur masing-masing ekstrak dengan 2ml air lalu ditetaskan 0,1% FeCl₃. Apabila terdapat perubahan warna menjadi hijau kecoklatan atau biru kehitaman maka ekstrak positif mengandung tanin. Uji semikuantitatif tanin dilakukan dengan membuat stok larutan standar tanin yaitu asam galat sebanyak 1mg yang dilarutkan dalam 10ml akuades untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 0,01%. Selanjutnya, dilakukan pengenceran untuk mendapatkan dua variasi kadar tanin dengan penurunan konsentrasi 0,004% sehingga didapatkan kadar 0,006% dan 0,002%. Absorbansi ketiga konsentrasi diukur pada panjang gelombang 370nm. Pengukuran semikuantitatif tanin larutan uji dilakukan dengan menyiapkan larutan stok ekstrak air dan etanol pegagan serta 3 produk herbal jadi A, B, dan C. Pengenceran dilakukan dari kelima larutan stok untuk membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 0,1%. Selanjutnya, sebanyak 3 tetes FeCl₃ 0,1% dimasukkan ke dalam masing-masing larutan ekstrak. Masing-masing ekstrak diukur absorbansinya pada panjang gelombang 370nm.

Pengolahan data aktivitas antioksidan dilakukan dengan memasukkan data absorbansi ke dalam rumus untuk mencari nilai Q yaitu persentase inhibisi DPPH, A₀ adalah absorbansi blanko, dan A_c adalah absorbansi sampel. Nilai Q diproses untuk mendapatkan rumus regresi linier. Selanjutnya ditentukan nilai EC₅₀ dari rumus regresi linier. Hasil EC₅₀ yang diperoleh dibandingkan satu dengan yang lain untuk melihat aktivitas antioksidan ekstrak air pegagan, ekstrak etanol pegagan, dan 3 produk herbal ekstrak pegagan kemudian dilakukan

uji normalitas distribusi data EC₅₀ menggunakan uji Saphiro-Wilk dan uji variansi. Jika didapatkan hasil variansi berbeda, maka dilakukan transformasi data menggunakan *power estimation* dengan *levene test* agar variansi data homogen. Apabila data terdistribusi normal ($p \leq 0,05$) dan variansi datanya sama ($p > 0,05$) digunakan uji statistik anova. Apabila data terdistribusi tidak normal ($p > 0,05$) dan/atau variansi datanya berbeda ($p \leq 0,05$), digunakan uji statistik Kruskal Wallis. Hasil dari uji statistik, baik Anova maupun Kruskal Wallis akan menghasilkan nilai p. Apabila nilai $p \leq 0,05$, maka terdapat perbedaan bermakna secara statistik antar aktivitas antioksidan. Jika nilai $p > 0,05$, maka tidak terdapat perbedaan bermakna antar aktivitas antioksidan. Bila terdapat kemaknaan, selanjutnya dilakukan *post hoc analysis* dengan *Least Significant Difference* (LSD) untuk Anova dan Mann-Whitney untuk Kruskal Wallis untuk melihat perbandingan antar sampel. Jika nilai $p \leq 0,05$, maka terdapat perbedaan bermakna antara 2 sampel yang dibandingkan.

Pada uji semikuantitatif fitokonstituen tanin diperoleh rumus regresi linier dari data absorbansi dari tiga konsentrasi larutan standar tanin. Absorbansi dari ekstrak air pegagan, ekstrak etanol pegagan, produk A, produk B, dan produk C pada konsentrasi 0,1% dimasukkan ke dalam rumus regresi tersebut untuk mendapatkan kadar taninnya.

Hasil

Dari kelima sampel yang diuji, nilai EC₅₀ terdistribusi normal ($p > 0,05$) untuk ekstrak air pegagan ($p = 0,491$), ekstrak etanol pegagan ($p = 0,874$), produk A ($p = 0,079$), produk B ($p = 0,261$), dan produk C ($p = 0,164$) namun variansi data tidak sama ($p = 0,002$). Oleh karena itu selanjutnya data EC₅₀ dianalisis menggunakan metode Kruskal-Wallis yang kemudian dilanjutkan dengan *post hoc analysis* menggunakan metode Mann-Whitney. Dari hasil pengujian, tidak ada perbedaan bermakna antara ekstrak air herba pegagan dan ekstrak etanol herba pegagan ($p = 0,513$). Perbedaan bermakna ditemukan pada pengukuran antara ekstrak air herba pegagan dengan produk A, produk B, dan produk C ($p = 0,05$) dan ekstrak etanol herba pegagan dengan produk A, produk B, dan produk C ($p = 0,05$). Hasil pengukuran nilai EC₅₀ dapat dilihat pada Tabel dengan urutan aktivitas terbaik ekstrak etanol pegagan, ekstrak air pegagan, produk A, produk B, dan produk C.

Tabel 1. Hasil Pengukuran EC₅₀ (dalam %)

Sampel	EC ₅₀ 1	EC ₅₀ 2	EC ₅₀ 3	Mean ± SD
Ekstrak air pegagan	2,90	2,55	2,64	2,70 ± 0,000
Ekstrak etanol pegagan	3,36	2,23	1,33	2,31 ± 0,000
Produk A	5,35	5,72	5,33	5,47 ± 0,000
Produk B	3,93	4,75	9,48	6,05 ± 2,9942
Produk C	9,04	10,09	20,07	13,07 ± 6,0913

Uji kualitatif pada larutan uji menunjukkan perubahan warna menjadi hijau pada semua larutan uji (hasil positif) namun hasil uji semikuantitatif tanin menunjukkan kadar yang sangat rendah (di bawah 0%).

Pembahasan

Dari tiga kali pengukuran, EC₅₀ ekstrak etanol pegagan semakin menurun yang dapat dipicu oleh ketidakstabilan larutan DPPH. Penelitian Klen dan Vodopivec⁷ menjelaskan bahwa larutan DPPH dapat terdegradasi akibat pajanan sinar UV yang digunakan pada pengukuran spektrofotometri UV-Vis. Larutan DPPH dapat terdegradasi sampai 70% akibat pajanan sinar UV dari UV-Vis selama 1 jam. Sharma et al⁸ menjelaskan bahwa perubahan absorbansi dari DPPH dipengaruhi oleh cahaya, oksigen, pH, dan tipe pelarut. Atas dasar tersebut, dapat disimpulkan bahwa ketidakstabilan DPPH berpengaruh pada hasil EC₅₀ dari ekstrak etanol pegagan.

Pada pengukuran kelima larutan uji, terdapat kenaikan EC₅₀ yang signifikan pada pengukuran ketiga produk B dan C akibat ketidakstabilan DPPH seperti yang dijelaskan pada penelitian Klen dan Vodopivec⁷ serta Sharma et al.⁸ Faktor kedua yang dapat mengakibatkan inkonsistensi EC₅₀ pada pengukuran tersebut adalah komposisi obat.

Pada komposisi ekstrak produk B dan C, tertulis tiap kapsul mengandung 500mg ekstrak, namun setelah isi kapsul ditimbang ternyata beratnya bervariasi. Kapsul produk B memiliki berat 570mg pada penimbangan pertama, 541mg pada penimbangan kedua, dan 573mg pada penimbangan ketiga. Kapsul produk C memiliki berat 500 mg pada penimbangan pertama, 503mg pada penimbangan kedua, dan 482mg pada penimbangan ketiga. Pada hasil pengukuran aktivitas antioksidan produk B dan C yang ketiga, terjadi peningkatan nilai EC₅₀ dua kali lipat dari pengukuran sebelumnya padahal berat pengukuran ketiga pada produk C lebih rendah dari pengukuran

kedua (perbedaan sebanyak 21mg). Produk B lebih berat 32mg pada pengukuran ketiga dibandingkan pengukuran kedua. Perbedaan berat produk B dan C pada pengukuran ketiga tidak sampai dua kali lipat dari pengukuran sebelumnya. Komposisi ekstrak tanaman yang tidak sama antar kapsul dapat membuat inkonsistensi dari pengukuran EC₅₀ kedua produk. Hal tersebut didukung pula dengan status kedua produk herbal yang masih terdaftar sebagai jamu dan belum menjadi obat herbal terstandar (OHT). Akibatnya, mulai dari penanaman sampai produksi, ketiga obat tersebut belum terstandar sehingga kemungkinan komposisi ekstrak yang tidak sama antar kapsul semakin meningkat.

Hasil rata-rata pengukuran EC₅₀ kelima sampel adalah 2,70% untuk ekstrak air, 2,31% untuk ekstrak etanol, 5,47% untuk produk A, 6,05% untuk produk B, dan 13,07% untuk produk C. Perbandingan ekstrak air dengan ekstrak etanol pegagan menunjukkan hasil yang tidak berbeda bermakna. Hasil tersebut berbeda dengan penelitian Nurlaily et al¹⁰ yang melaporkan bahwa ekstrak air pegagan memiliki potensi antioksidan lebih tinggi dari ekstrak etanol. Terdapat beberapa hal yang dapat mengakibatkan perbedaan hasil tersebut. Pertama adalah perbedaan tempat tumbuh pegagan. Studi Seevaratnam et al¹¹ menjelaskan bahwa kadar fitokonstituen dari tanaman yang sama dapat berbeda bergantung tempat dan kondisi tumbuh. Kedua adalah perbedaan hasil ekstrak yang dipakai. Ekstrak yang dipakai pada penelitian ini adalah ekstrak basah sedangkan ekstrak pada penelitian Nurlaily et al¹⁰ adalah ekstrak yang dikeringkan. Pada penelitian Nurlaily et al,¹⁰ ada kemungkinan zat aktif yang seharusnya masih larut dalam pelarut ikut menguap ketika membuat ekstrak kering dan mengakibatkan perbedaan hasil aktivitas antioksidan.

Aktivitas antioksidan antara ekstrak air dan ekstrak etanol pegagan dengan produk A, B, dan C juga berbeda bermakna. Aktivitas ekstrak air dan etanol pegagan lebih baik daripada ketiga produk herbal yang diuji yang termasuk kategori jamu. Menurut peraturan BPOM,¹² produk herbal yang tergolong jamu adalah produk yang terdiri atas bahan atau ramuan berupa bahan tumbuhan, hewan, mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran bahan tersebut yang telah digunakan secara turun-temurun untuk pengobatan berdasarkan pengalaman. Proses pembuatan termasuk proses ekstraksi jamu tidak memerlukan standardisasi yang mengakibatkan kualitas ekstrak

yang dihasilkan kurang baik. Faktor lainnya adalah tidak terekstraksinya seluruh zat aktif pada tiga produk herbal. Hal tersebut mengakibatkan tidak adanya efek sinergis yang dibutuhkan untuk memproduksi efek antioksidan yang adekuat seperti pada ekstrak air dan etanol pegagan.

Pada tanaman pegagan, terdapat senyawa yang memiliki efek antioksidan yaitu fenol dan triterpen. Ariffin et al¹³ menjelaskan jenis fenol yang terdapat pada pegagan adalah asam galat, naringin, asam klorogenik, *catechin*, rutin, asam rosmarinat, quercetin, kaempferol, dan luteolin. Studi Nurlaily et al¹⁰ menjelaskan bahwa triterpen merupakan komponen yang banyak pada pegagan dan komponen triterpenya adalah asiaticosida dan madecassosida. Tanin merupakan salah satu zat yang terkandung dalam pegagan dan memiliki aktivitas antioksidan sangat tinggi seperti yang dilaporkan oleh Meena et al.¹⁵ Studi Amarowicz¹⁶ menjelaskan bahwa terdapat korelasi antara jumlah tanin pada suatu tanaman dengan aktivitas antioksidan.

Dari hasil uji kualitatif, terbukti keseluruhan larutan uji memiliki kandungan tanin. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Rahman et al¹⁷ yang menjelaskan bahwa ekstrak air dan etanol pegagan mengandung zat tanin. Kadar tanin pada uji semikuantitatif sangat rendah yang menunjukkan bahwa tanin memiliki peran yang kecil dalam menimbulkan efek antioksidan pegagan. Studi Amarowicz¹⁶ juga menemukan zat lain dalam pegagan yang lebih berperan dalam menimbulkan efek antioksidan. Studi Zahara et al¹⁸ menjelaskan bahwa pegagan mengandung komponen fenol yang sangat tinggi dan zat itulah yang memegang peran utama dalam menghasilkan efek antioksidan. Tanin juga termasuk dalam senyawa fenol namun zat fenol lainnya dalam pegagan dapat memiliki efek antioksidan yang lebih besar. Kemungkinan lain adalah adanya efek sinergisme antara tanin dan komponen fenol lain yang menyebabkan pegagan memiliki aktivitas antioksidan tinggi meski kadar taninnya sangat sedikit.

Pada penelitian ini hanya dilakukan uji semikuantitatif pada satu konsentrasi dengan satu kali pengukuran karena ingin mengukur kadar tanin saja, tidak mencari korelasi antara penambahan konsentrasi dengan konsentrasi tanin pada kelima larutan uji. Penelitian ini juga hanya mengukur tanin sebagai salah satu kandungan fitokonstituen pegagan yang memiliki efek antioksidan. Pengukuran zat aktif lainnya seperti flavonoid dapat dilakukan untuk melihat apakah zat-zat tersebut yang menimbulkan efek antioksidan pada pegagan

Kesimpulan

Aktivitas antioksidan ekstrak air dan etanol pegagan lebih baik daripada produk A, produk B, dan produk C. Kadar tanin pada ekstrak air dan etanol pegagan serta ketiga produk herbal jadi pegagan dapat diabaikan karena jumlahnya sangat sedikit.

Daftar Pustaka

1. Palmer DM, Kitchin JS. Oxidative damage, skin aging, antioxidants and a novel antioxidant rating system. *J Drugs Dermatol*. 2010;9:11-5.
2. Bender DA, Mayes PA. Vitamins and minerals In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, Editors. *Harper's illustrated biochemistry*. New York: McGrawHill-Company; 2010.p.481-97.
3. WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: WHO; 2011.
4. Tiwari S, Gehlot S, Gambhir IS. *Centella asiatica*: a concise drug review with probable clinical uses. *J. stress physiol. Biochem*. 2011;7:38-44.
5. Soumyanath A, Zhong YP, Henson E, Wadsworth T, Bishop J, Gold BG, et. al. *Centella asiatica* extract improves behavioral deficits in a mouse model of alzheimer's disease: investigation of a possible mechanism of action. *Int J Alzheimers Dis*. 2012;Feb 15.<http://dx.doi.org/10.1155/2012/381974>.
6. Hashim P, Sidek H, Helan MHM, Sabery A, Palanisamy UD, Ilham M. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules*. 2011;16:1310-22.
7. Klen TJ, Vodopivec BM. DPPH solution (in)stability during kinetic UV/Vis spectrometry measurements of phenols antioxidant potential. *Food Anal Methods*. 2012;5:781-3.
8. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem*. 2009;113:1202-05.
9. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. *Food Chem*. 2012;130:1036-43.
10. Nurlaily A, Noor BAR, Musalmah M. Comparative antioxidant and anti-inflammatory activity of different extracts of *Centella asiatica* (L.) urban and its active compounds, asiaticoside and madecassoside. *Medicine & Health*. 2012;7:62-72.
11. Seevaratnam V, Banumathi P, Premalatha MR, Sundaram SP, Arumugam T. Functional properties of *Centella asiatica* (L): a review. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012;4:8-14.
12. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia [Internet]. Kriteria dan tata laksana pendaftaran obat tradisional, obat herbal terstandar dan fitofarmaka; 2005 [diakses Desember 2015]. Diunduh dari: <http://www.sireka.pom.id/general/regulation>.
13. Ariffin F, Chew SH, Bhupinder K, Karim AA, Huda N. Antioxidant capacity and phenolic composition of fermented *C.asiatica* herbal teas. *J Sci Food Agr*. 2011;91:1288-96.

14. Rafamantanana MH, Rozet E, Raelison GE, Cheuk K, Ratsimamanga SU, Hubert P. An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *C.asiatica* (L.) Urb (APIACEAE). Journal of Chromatogr B. 2009;877:2396-402.
15. Meena H, Pandey HK, Pandey P, Arya MC, Ahmed Z. Evaluation of antioxidant activity of two important memory enhancing medicinal plants *Baccopa monnieri* and *C.asiatica*. Indian J Pharmacol 2012;44:114-7.
16. Amarowicz R. Tannins: The new natural antioxidant? Eur J Lipid Sci Technol. 2007;109:549-51.
17. Rahman M, Hossain S, Rahman A, Fatima N, Nahar T, Uddin B, et al. Antioxidant activity of *C.asiatica*. Urban: impact of extraction solvent polarity. J Pharmacogn and Phytochem. 2013;1: 27-32.
18. Zahara K, Bibi Y, Tabassum S. Clinical and therapeutic benefits of *C.asiatica*. Pure Appl Bio. 2014;3:152-9.