

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOLIK KULIT BUAH JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) DENGAN METODE DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

Ismiyyatun Khasanah¹⁾, Maria Ulfah¹⁾, Sumantri²⁾

1) Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

2) Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

INTISARI

Buah jeruk nipis diketahui mengandung senyawa flavonoid dan Vitamin C yang tinggi. Salah satu efek dari flavonoid dan Vitamin C adalah sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan untuk mengetahui golongan senyawa aktif terkandung di dalamnya.

Penelitian dilakukan dengan membuat seri kadar ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis yaitu 10, 20, 40 dan 80 µg/mL. Sebagai pembanding digunakan vitamin C dengan konsentrasi 1, 2, 4 dan 8 µg/mL. Sebagai blanko digunakan DPPH 0,1 mM. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Data yang diperoleh dihitung untuk diketahui aktivitas antioksidannya. Analisis statistik digunakan uji T-Test. Untuk mengetahui IC₅₀ (*Inhibition Concentration*)₅₀ digunakan analisis probit dan untuk mengetahui kandungan senyawa aktifnya dilakukan identifikasi dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis mempunyai aktivitas antioksidan dengan IC₅₀ sebesar 54,458 µg/mL dan 4,768 µg/mL untuk vitamin C. Hasil uji statistik aktivitas antioksidan menunjukkan tidak signifikan. Hasil KLT menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis adalah golongan flavonoid dan vitamin C.

Kata Kunci: Ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.), metode DPPH, antioksidan dan IC₅₀

ABSTRACT

Citrus aurantifolia is known contains flavonoid compound and high Vitamin C. One of the effects of flavonoid and Vitamin C are antioxidant. This research aims to knowing the antioxidant activity of citrus aurantifolia etanolic extract by using the DPPH (1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil) method and to knowing the active compound that containing whithin.

The research was done by making level series of citrus aurantifolia etanolic extract, they were 10, 20, 40 and 80 µg/ml. As a standard of comparison was used vitamin C with concentrations 1, 2, 4 and 8 µg/ml. As a blank was used DPPH 0,1 mM. The antioxidant activity test was done by the DPPH method. The achieved data was counted to know it's antioxidant activity. The statistical analysis was used T-Test. To know IC₅₀ (*Inhibition Concentration*)₅₀ was used the probit analysis and to know it's active compound content was done an identification with TLC (Thin Layer Chromatography).

The result of the research shows that etanolic extract of citrus aurantifolia has antioxidant activity IC₅₀ about 54,458 µg/ml and 4,768 µg/ml for vitamin C. The statistical test result of antioxidant activity shows that there is no any significant difference. The TLC result shows that compound contained in etanolic extract of citrus aurantifolia are flavonoid and Vitamin C.

Keywords: Citrus aurantifolia extract, DPPH method, antioxidant and IC₅₀.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan ketersediaan hayati menurut catatan *word health organization* (WHO) sangat besar, diperkirakan hampir 80% dari umat manusia terutama di negara-negara yang sedang berkembang masih

menggantungkan dirinya pada tumbuh-tumbuhan sebagai bahan obat untuk menjaga kesehatannya (Nugraheni, 2007).

Dewasa ini bumi semakin dipenuhi oleh radikal bebas sebagai senyawa atau bahan potensial yang mengancam kehidupan sel-sel

dalam tubuh yang normal. Bahkan sampai saat ini semakin banyak masyarakat terkena penyakit degeneratif yang disebabkan oleh radikal bebas dan membahayakan bagi kesehatan seperti kardiovaskuler, karsinogenesis, aterosklerosis dan juga proses penuaan dini. Oleh karena itu untuk bertahan hidup dan mengurangi jumlah radikal bebas dalam tubuh, manusia memerlukan antioksidan (Olivia *et al.*, 2007).

Antioksidan berperan aktif dalam menanggulangi kelebihan radikal bebas yang pada umumnya bekerja sebagai penangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi menjadi dua yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami yang berasal dari dalam tubuh seperti enzim superoksida dismutase (SOD), glutathione dan katalase, sedangkan antioksidan alami yang berasal dari luar tubuh seperti vitamin C, vitamin E, β -karoten, xantofil dan flavonoid (Nugraheni, 2007). Antioksidan sintetis seperti BHA (butil hidroksil anisol), BHT (butil hidroksiltoluen), PG (propil galat) dan TBHQ (*tert*-butil hidrokuinon) penggunaannya selain memberikan efek manfaat, ternyata dalam jangka waktu lama dan pemberian yang terus menerus dapat menimbulkan efek samping yang berbahaya, salah satunya yaitu dapat meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Amarowicz *et al.*, 2000). Oleh karena itu diperlukan sumber antioksidan alami yang mudah diperoleh dan ketersediaannya di alam dalam jumlah yang melimpah juga mempunyai efek samping yang rendah dibanding antioksidan sintetis (Nugraheni, 2007). Diantara beragam jenis jeruk, jeruk nipis yang paling banyak mengandung flavonoid (Anonim, 2008). Bangsa-bangsa di Asia Tenggara sering menggunakan jeruk nipis sebagai salah satu bahan ramuan obat tradisional (jamu) untuk menjaga kebugaran tubuh agar sehat dan awet muda (Sarwono, 2006).

Penelitian terhadap kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) telah dilakukan di Jepang yang melaporkan bahwa kulit buah jeruk nipis memperlihatkan efek anti alergi. Penelitiannya telah diisolasi dan diidentifikasi senyawa flavonoid golongan flavanon dengan cara KLT (Kromatografi Lapis Tipis) bidimensional (dua dimensi) dan KLT Preparatif. Uji farmakodinamik terhadap isolat menggunakan trakea marmot terisolasi yang diinduksi histamin secara *in vitro* dan identifikasi komponen berkhasiat dengan cara spektroskopi-ultra-violet (Irawan, 2008). Penelitian mengenai aktivitas antioksidan dari ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis belum

pernah dilakukan sebelumnya. Oleh karena itu penulis tertarik untuk meneliti tanaman ini dengan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) berdasarkan IC_{50} (*Inhibition Concentration*)₅₀.

Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning yang diukur pada panjang gelombang 517 nm (Hanani *et al.*, 2005). *Inhibition Concentration* (IC_{50}) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan % penghambatan 50% (Suratmo, 2008),

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain: timbangan elektrik, gelas beker, gelas ukur, batang pengaduk, kertas saring, cawan porselin, kompor listrik, kipas angin, botol gelas, pipet ukur, mikropipet, stirer, tabung reaksi, *stop watch*, spektrofotometer UV-Vis, lempeng KLT, bejana kromatografi dan tutup bejana, pipa kapiler, kertas penjenuh dan penyemprot bercak.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain: kulit buah jeruk nipis, vitamin C, DPPH, etanol 70%, silika gel 60 F₂₅₄, selulose, kloroform-metanol (50:50), etil asetat, asam formiat, asam asetat, aquadest, asam fosfomolibdat, ammonia dan rutin.

Jalannya Penelitian

Identifikasi dan determinasi tanaman

Identifikasi tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang dan dideterminasi menurut cara dalam buku '' *Flora untuk Sekolah di Indonesia*'' (Stenis, 1975).

Pengumpulan bahan dan pembuatan serbuk simplisia

Kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S) diperoleh dari daerah Jatibarang Brebes yang berwarna hijau tua. Bahan yang telah diperoleh dari pengumpulan, dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, tiriskan, kemudian diangin-anginkan di tempat yang teduh atau tidak terkena sinar matahari langsung dan ditutup dengan kain hitam sampai kering. Tujuannya adalah simplisia tidak mudah rusak dan tidak terjadi kerusakan

dekomposisi kandungan senyawa dalam tanaman kulit buah jeruk nipis. Simplisia yang sudah kering diblender dan diayak dengan ayakan ukuran 25 mesh.

Pembuatan ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis

Pembuatan ekstrak dengan metode maserasi adalah sebagai berikut kurang lebih 100,0 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam toples, kemudian dituangi 750 ml etanol 70%, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari diserakai dengan bugner dan ampas ditambah cairan penyari 250 ml, diaduk dan diserakai kembali sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 1000 ml. Kemudian sari ditutup dan dibiarkan di tempat sejuk, terlindung cahaya selama 2 hari, kemudian endapan dipisahkan (Depkes RI, 1986). Sari kemudian dipekatkan dan diuapkan dengan evaporator sampai diperoleh ekstrak kental.

Pembuatan blanko DPPH 0,1 mM

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 3,9 mg dan dilarutkan dalam etanol p.a sampai tepat 100,0 mL (0,1 mM) (Nugraheni, 2007).

Pembuatan kadar sampel dan pembandingan vitamin C

Ekstrak etanol kulit buah jeruk ditimbang dengan seksama 0,25 gram, kemudian dilarutkan dengan etanol 70% sampai 25 ml, sehingga diperoleh kadar 1%. Dari kadar 1% dibuat seri konsentrasi sebesar 10, 20, 40 dan 80 µg/mL.

Vitamin C sebanyak 0,5 mg ditambahkan air sampai 50,0 ml sehingga diperoleh kadar 1%. Dari kadar ini dibuat seri konsentrasi sebesar 1, 2, 4 dan 8 µg/mL.

Penentuan panjang gelombang maksimal larutan DPPH 0,1 mM

Penentuan panjang gelombang (λ) dengan cara mengukur 4,0 mL larutan DPPH 0,1 mM pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 400-600 nm untuk mendapatkan absorbansi \pm 0,2-0,8 (Nugraheni, 2007).

Penentuan *operating time* larutan DPPH 0,1mM

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mereaksikan 50 µl baku pembandingan vitamin C ditambah 4,0 mL larutan DPPH 0,1 mM, dihomogenkan dengan stirer selama 1 menit dan diukur absorbansinya pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40,

45, 50, 55, dan 60 pada λ maksimal yang sudah diperoleh (Nugraheni, 2007).

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Sebanyak 4,0 mL DPPH 0,1 mM dimasukkan tabung reaksi, tambahkan 50,0 µL ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis dengan berbagai konsentrasi, kemudian distirer 1 menit sampai homogen dan diamkan selama 30 menit ditempat gelap, baca absorbansinya pada λ maksimal (525 nm). Untuk uji aktivitas baku pembandingan vitamin C perlakuannya sama.

Uji kromatografi lapis tipis untuk identifikasi kandungan senyawa aktif dari ekstrak etanolik herba alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Bejana pengembang (chamber) dijenuhi dengan fase gerak yang sesuai untuk masing-masing golongan senyawa aktif. Fase gerak untuk vitamin C adalah kloroform-metanol (50:50), fase gerak flavonoid adalah etil asetat, asam formiat, asam asetat dan air (100:11:11:27). Totolkan ekstrak pada lempeng KLT (silika gel 60 F₂₅₄) untuk vitamin C dan selulosa untuk flavonoid, pastikan ekstrak yang ditotolkan sampai kering. Kemudian lempeng KLT dielus, dikeringkan kemudian dideteksi sinar UV λ 254 nm dan 365 nm kemudian disemprot dengan penampak bercak untuk vitamin C adalah asam fosfomolibdat dan flavonoid adalah uap amoniak. Kemudian dihitung Rf-nya.

Analisa Data

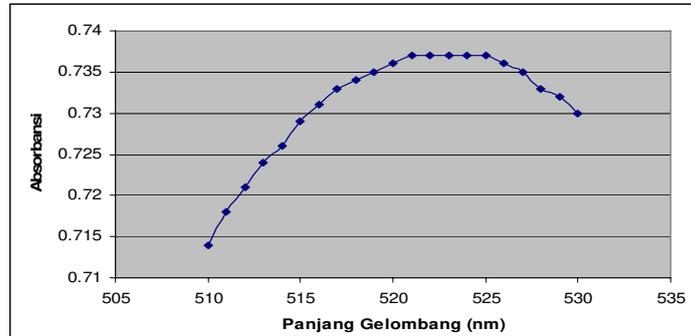
Data nilai absorbansi dari ekstrak etanolik herba alfalfa serta baku pembandingan, dihitung dengan rumus:

% aktivitas antioksidan = $\frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$
(Absorbansi ekstrak etanolik herba alfalfa dan vitamin C dibagi Absorbansi blanko (Absorbansi DPPH) dikali 100%). Data diolah menggunakan analisa probit antara log konsentrasi larutan uji (x) dengan persentase aktivitas antioksidan (y) sehingga diperoleh IC₅₀. Untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan antara ekstrak etanolik herba alfalfa digunakan uji Tukey.

HASIL PENELITIAN

Pada penelitian diperoleh ekstrak kental dengan hasil rendemen sebesar 23,17%.

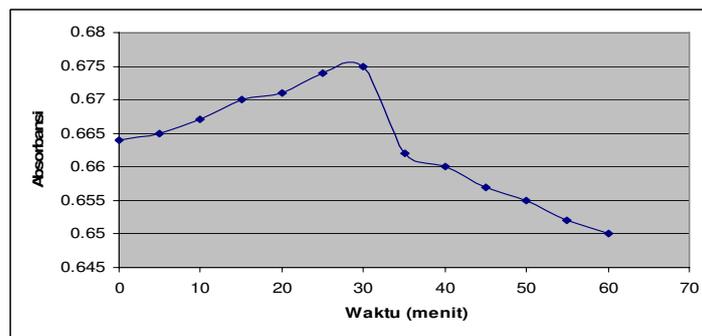
$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat serbuk mula-mula}} \times 100\% \\
 &= \frac{23,17 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 23,17\%
 \end{aligned}$$



Gambar 1. Grafik Hubungan antara Panjang Gelombang DPPH 0,1 mM terhadap Absorbansi

Nilai absorbansi stabil dari panjang gelombang 521 nm sampai 525 nm sehingga pengujian

sampel dan kontrol positif dilakukan pada panjang gelombang 525 nm.



Gambar 2. Grafik Hubungan antara *Operating Time* Vitamin C dengan DPPH 0,1 mM terhadap Absorbansi

Hasil penentuan *operating time* vitamin C dengan DPPH 0,1 mM diperoleh pada menit ke 15 sampai 30. Maka pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada menit ke 15 sampai dengan 30.

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Tabel I. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis dan Vitamin C dengan Metode DPPH

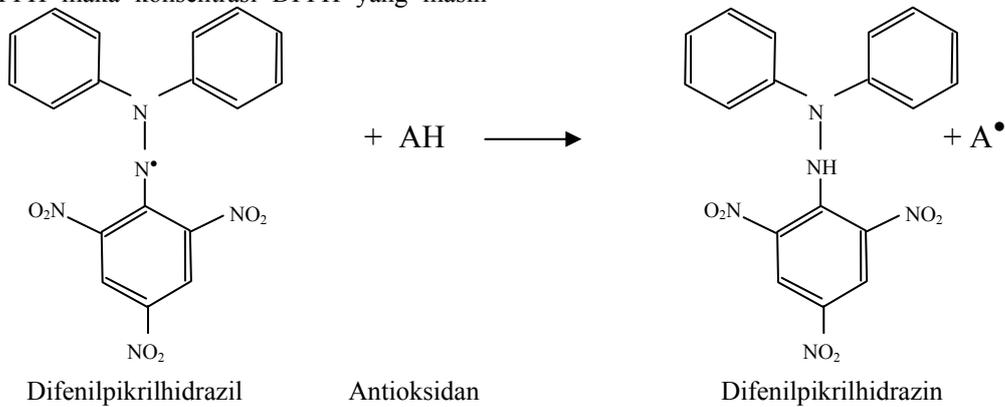
Sampel	Konsentrasi sampel (µg/ml)	Absorbansi*	Aktivitas antioksidan (%)*	Persamaan garis
Ekstrak	10	0,668	7,61	Y = 0,7885x+2,7983 r = 0,9946
	20	0,568	21,44	
	40	0,467	35,41	
	80	0,253	65,01	
Vitamin C	1	0,679	7,87	Y = 8,5546x+2,9952 r = 0,9843
	2	0,589	20,08	
	4	0,415	43,69	
	8	0,231	68,66	

Absorbansi blanko DPPH = 0,737

Ket : * = hasil tersebut merupakan hasil dari 3 kali pengukuran

Dari Tabel 1 dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel yang digunakan maka aktivitas antioksidan juga semakin besar, ditandai dengan berkurangnya intensitas warna menggambarkan penurunan konsentrasi DPPH yang diberi sampel maupun perbandingan. Semakin besar aktivitas peredaman radikal DPPH maka konsentrasi DPPH yang masih

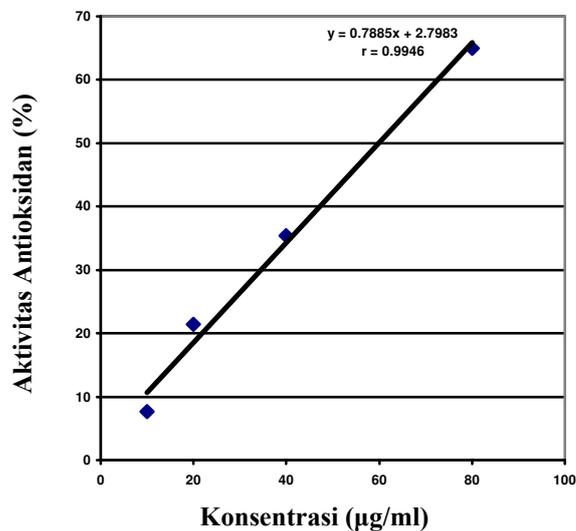
ada semakin kecil, sehingga nilai absorbansi yang dihasilkan semakin turun. Adapun reaksi senyawa yang bersifat sebagai antioksidan dengan molekul DPPH dapat dilihat pada Gambar 3.



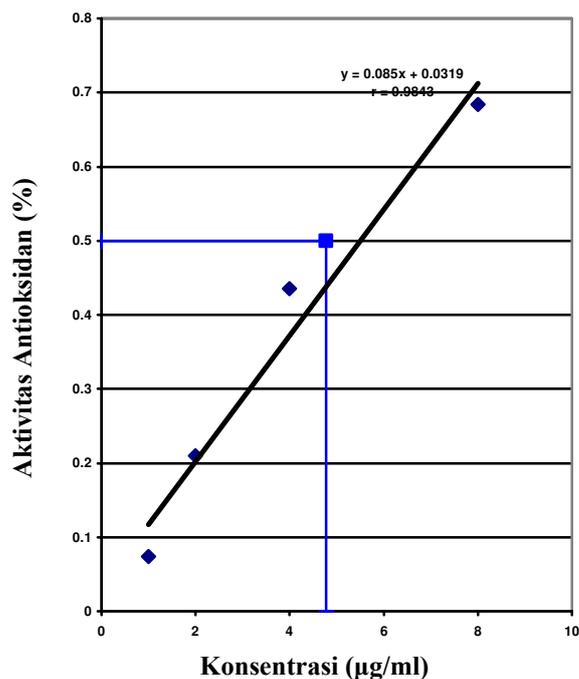
Gambar 3. Reaksi Peredaman DPPH dengan Senyawa Antioksidan (Molyneux, 2004)

Dari Gambar 3 menunjukkan bahwa adanya senyawa yang bersifat sebagai antioksidan seperti flavonoid dan vitamin C akan menangkap atau mereduksi radikal DPPH. Sebagai gantinya, molekul DPPH akan mendonorkan atom hidrogennya sehingga berubah menjadi difenil pikrilhidrazilin yang

bersifat non radikal. Sisa molekul DPPH yang masih ada dapat dibaca serapannya oleh spektrofotometer pada panjang gelombang 525 nm yang ditandai dengan berkurangnya warna ungu dari radikal DPPH menjadi warna kuning pucat yaitu warna golongan pikril (Molyneux, 2004).



Gambar 4. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis (µg/ml) dengan Aktivitas Antioksidan (%)



Gambar 5. Grafik Hubungan antara Konsentrasi Vitamin C (µg/ml) dengan Aktivitas Antioksidan (%)

Dari data pada Tabel I dibuat grafik hubungan antara konsentrasi sampel ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis dan pembanding vitamin C dengan persentase aktivitas antioksidan, dapat dilihat pada Gambar 4 dan 5. Dari Gambar 4 dan 5 dapat diketahui bahwa seiring dengan kenaikan konsentrasi sampel yang digunakan maka aktivitas antioksidan juga semakin besar.

Perolehan *Inhibition Concentration*₅₀ (IC₅₀) dan Analisis Data

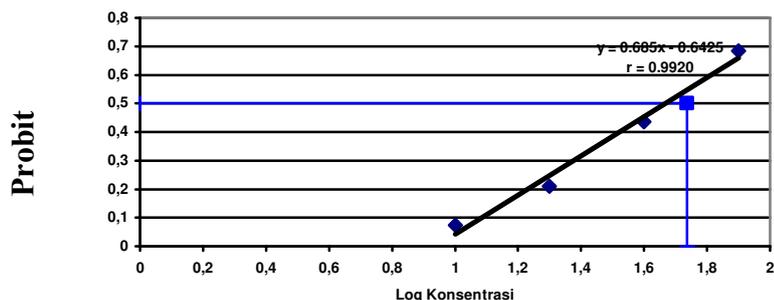
Dari Tabel II diketahui bahwa IC₅₀ sampel adalah 54,458 µg/ml dan vitamin C adalah 4,768 µg/ml. Nilai IC₅₀ dari ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis jauh lebih besar dari nilai IC₅₀ vitamin C.

Tabel II. Nilai IC₅₀ Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis dan Vitamin C

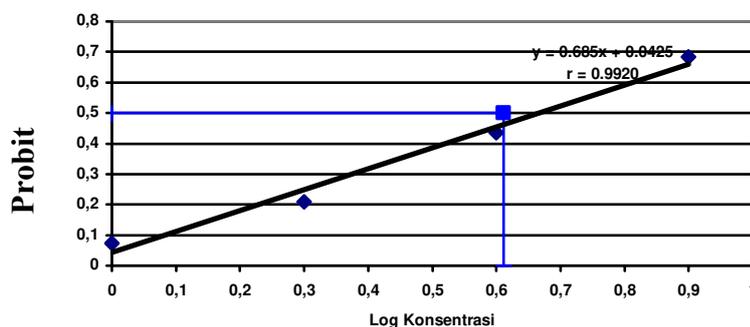
Sampel	Konsentrasi sampel (µg/ml)	Log konsentrasi	Probit	Nilai IC ₅₀ (µg/ml)
Ekstrak	10	1,000	0,075	Y = 0,685x - 0,6425
	20	1,301	0,197	r = 0,9920
	40	1,602	0,397	IC ₅₀ = 54,458
	80	1,903	0,628	
Vitamin C	1	0,000	0,074	Y = 0,685x + 0,0425
	2	0,301	0,210	r = 0,9920
	4	0,602	0,435	IC ₅₀ = 4,768
	8	0,903	0,684	

Hal ini menunjukkan bahwa daya aktivitas antioksidan ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis 10 kali lebih kecil dibanding dengan daya aktivitas antioksidan vitamin C dengan menggunakan metode DPPH. Hal ini dikarenakan kadar vitamin C dan flavonoid

yang terkandung dalam ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis lebih sedikit dibanding vitamin C murni yang merupakan senyawa tunggal yang poten sebagai antioksidan.



Gambar 6. Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis dengan Hasil Probit



Gambar 7. Grafik Hubungan antara Log Konsentrasi Vitamin C dengan Hasil Probit

Dari data pada Tabel II dibuat grafik hubungan antara log konsentrasi ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis dan vitamin C dengan hasil probit, dapat dilihat pada Gambar 6 dan 7.

Uji normalitas data menurut Shapiro-Wilk signifikan, ini menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen, untuk itu data dapat dilakukan uji T. Uji T menunjukkan nilai signifikan. Dengan demikian dapat diketahui bahwa secara statistik ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis dengan vitamin C tidak ada perbedaan aktivitas antioksidan

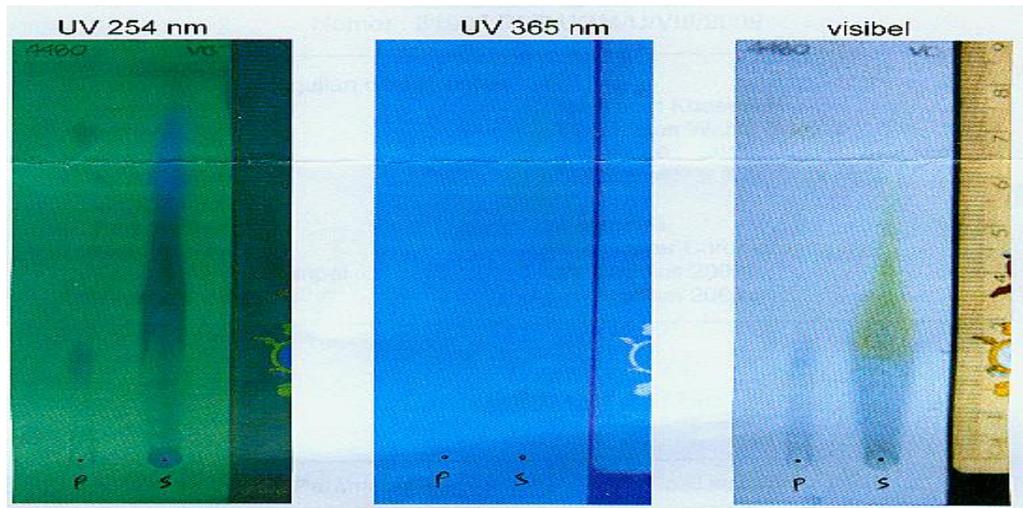
tetapi secara konsentrasi jauh berbeda, jadi sebenarnya jauh ada perbedaan aktivitas antioksidan antara ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis dengan vitamin C.

Uji Kualitatif Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol Kulit Buah Jeruk Nipis dengan Metode KLT

Hasil KLT diketahui golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis adalah flavonoid jenis lain (tabel III).

Tabel III. Nilai Rf Golongan Senyawa dalam Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis

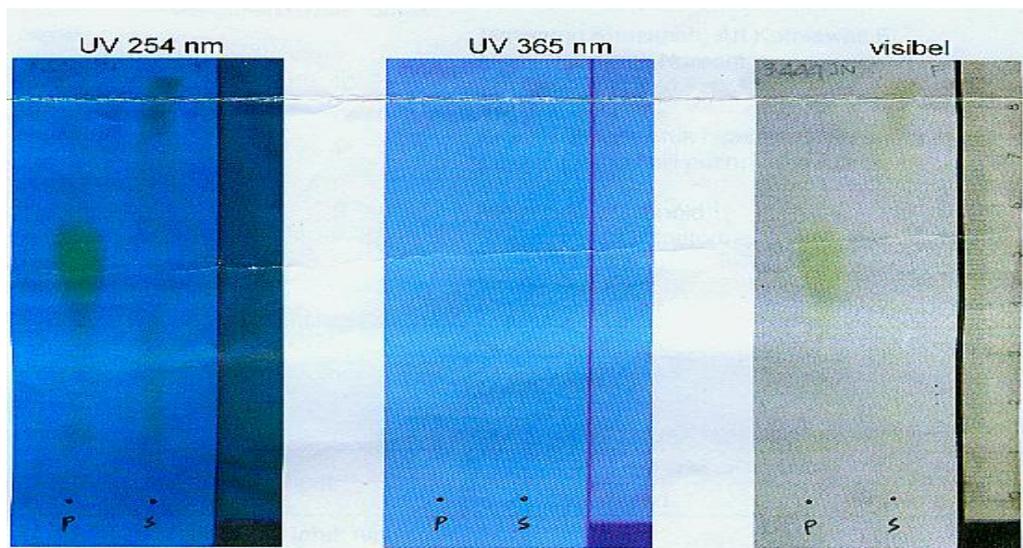
No.	Pembanding	Rf	Golongan senyawa dalam sampel	Rf
1	Rutin	0,55	Flavonoid	0,91
2	Vitamin C	0,20	Vitamin C	0,25



Gambar 8. Kromatogram Identifikasi Vitamin C dari Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis

Keterangan :

Fase diam	: Silika gel 60 F ₂₅₄
Fase gerak	: Khloroform – metanol (50-50)
Pereaksi	: Asam fosfomolibdat
Warna spot vitamin C di visibel	: Biru kelabu
Rf spot terdeteksi	: 0,25



Gambar 9. Kromatogram Identifikasi Flavonoid dari Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis

Keterangan :

Fase Diam	: Cellulose
Fase Gerak	: Etil asetat–asam formiat–asam asetat–air (100-11-11-27)
Pereaksi	: Uap amoniak
Warna spot flavonoid di visibel	: kuning
Rf spot terdeteksi	: 0,91

KESIMPULAN

Ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis mempunyai aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Nilai IC₅₀ ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis sebesar 54,458 µg/ml dan

pada vitamin C sebesar 4,768 µg/ml. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis yang berkhasiat sebagai antioksidan adalah golongan flavonoid dan vitamin C.

DAFTAR PUSTAKA

- Amarowicz, R., Naczki, M., dan Shahidi, T., 2000, *Antioxidant Activity of Crude Tani of Canola and Rapeseed Hulls*, 957-961, JAOCS.
- Anonim, 2008, *Vitamin C*, http://id.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C, diakses tanggal 6 September 2008.
- Hanani, E., Mun'im, A., dan Sekarini, R., 2005, Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons Callyspongia SP dari Kepulauan Seribu, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2, 3, 130.
- Irawan, R., 2008, *Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Citrus aurantifolia Swingle terhadap Kontraksi Trakea Marmot Terisolasi yang Diinduksi Histamin invitro*, <http://www.kalbe.co.id>, diakses tanggal 16 April 2008.
- Nugraheni, 2007, Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol dan Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sunchus arvensis* L.) serta Penentuan EC₅₀ dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), *Skripsi*, 36-39, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi, Semarang.
- Olivia, Femi, Alam, Syamsir, Hadibroto, dan Iwan, 2004, *Seluk-beluk Food Supplement*, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Sarwono, B., 2006, *Khasiat dan Manfaat Jeruk Nipis*, Agro Medika Pustaka, Jakarta.
- Steenis, V. C. G. G. J., Den, Hoed, D., Bloembergen, S., dan Eyma, P. J., 2002, *Flora untuk Sekolah di Indonesia*, Pradnya Paramita, Jakarta.
- Suratmo, 2008, *Potensi Ekstrak Daun Sirih Merah Sebagai Antioksidan*, Universitas Brawijaya, Malang