

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK dan FRAKSI KULIT BATANG TRENGGULI (*Cassia fistula L*) DENGAN METODE DPPH

Aji Najihudin, Anis Chaerunisaa, Anas Subarnas

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia

Abstrak

Kulit batang trengguli (*Cassia fistula L*) mengandung senyawa yang bersifat antioksidan yang dapat ditentukan dengan metode peredaman radikal bebas 1,1-Difenil-2- Pikrilhidrazil (DPPH). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya peredaman radikal bebas DPPH oleh ekstrak etanol kulit batang trengguli (EEKBT), fraksi Etil asetat (FEAKBT), fraksi n-Heksan (FnHKBT), fraksi air (FAKBT) dan vitamin C sebagai pembanding. Identifikasi golongan senyawa dilakukan dengan penapisan fitokimia. Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Aktivitas antioksidan dilakukan dengan peredaman warna radikal bebas DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Penelitian menunjukkan bahwa Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan paling baik dengan nilai IC_{50} 3,980 $\mu\text{g/ml}$ dibandingkan vitamin C 4,716 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan nilai IC_{50} ekstrak etanaol, fraksi n-heksan, fraksi air adalah 10,613 $\mu\text{g/ml}$, 38,904 $\mu\text{g/ml}$ dan 7,636 $\mu\text{g/ml}$ terhadap peredaman warna DPPH.

Kata kunci: Antioksidan, *Cassia fistula*, Fraksinasi, metode DPPH

ANTIOXIDANT ACTIVITY IN THE EXTRACT ETHANOL AND FRACTION TRENGGULI BARK (*Cassia fistula L*) BY DPPH METHOD

Abstract

The bark Trengguli (*Cassia fistula L*) containing compounds are antioxidants which can be determined by the method of reduction of free radicals 1,1-Diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH). This study was conducted to investigate the reduction of free radicals DPPH by Trengguli stem bark ethanol extract (EEKBT), Ethyl acetate fraction (FEAKBT), the fraction n-Hexane (FnHKBT), the water fraction (FAKBT) and vitamin C as a standard. The identification of the class of compounds was performed by phytochemical screening. Fractionation is done by liquid-liquid extraction method with a different degree of polarity. Reduction of antioxidant activity with DPPH free radical colors using UV-Vis spectrophotometry. Research shows that ethyl acetate fraction has the best antioxidant activity with IC_{50} value 3,980 $\mu\text{g} / \text{ml}$ compared to vitamin c with IC_{50} value 4,716 $\mu\text{g} / \text{ml}$. While the IC_{50} value of ethanol extract, n-hexane fraction, the fraction of water is 10.613 g / ml , 38.904 ug / ml and 7.636 mg / mL against DPPH color reduction.

Keywords: Antioxidant, *Cassia fistula*, Fraction, DPPH Method

Pendahuluan

Radikal bebas merupakan suatu senyawa atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan, dengan mengikat elektron molekul yang berada di sekitarnya. Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh sebagai bagian dari hasil proses metabolisme. Sedangkan radikal bebas yang bersumber dari luar tubuh dapat disebabkan oleh faktor lingkungan, termasuk kebiasaan merokok, penggunaan pestisida pada makanan, polusi dan radiasi (Mbaoji et al., 2016).

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (donor elektron) yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Antioksidan berperan menangkal radikal bebas dalam tubuh sehingga dapat melawan kerusakan oksidatif juga menghambat proses oksidasi lemak/minyak sehingga mempunyai fungsi sebagai pengawet (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

Antioksidan memiliki kemampuan untuk menetralkan radikal bebas tanpa menjadi radikal bebas itu sendiri (Widyawati, 2016). Ketika antioksidan menetralkan radikal bebas dengan menerima atau menyumbangkan elektron, mereka tidak akan berubah menjadi radikal bebas dan tetap stabil. Antioksidan banyak terdapat pada sayuran, buah-buahan dan tanaman obat (Fatima, Abderrahmane, Seddik, & Lekhmici, 2016).

Penggunaan bahan alam sebagai obat tradisional tidaklah cukup hanya berdasarkan pengalaman yang diwariskan secara turun-temurun, akan tetapi tumbuhan obat yang digunakan perlu dibuktikan secara ilmiah. Tumbuhan obat telah diketahui mengandung zat aktif yang dapat berkhasiat untuk penyembuhan penyakit. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk melihat aktivitas farmakologi dan kandungan kimia dari bahan alam. Salah satu bahan alam

yang telah dilaporkan memiliki beberapa aktivitas farmakologi adalah trengguli (*Cassia fistula L*) (Jothy, Zuraini, & Sasidharan, 2011).

Ekstrak biji trengguli memiliki aktivitas antioksidan dengan menghambat DPPH (Bhalodia et al., 2011). Ekstrak biji methanol trengguli memiliki aktivitas antitumor (Gupta et al., 2000) dan ekstrak bunga trengguli menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap mikroorganisme gram positif dan memiliki aktivitas antifungi terhadap *Trichophyton mentagrophytes* dan *Epidermophyton floccosum* (Duraipandiyani & Ignacimuthu, 2007). Selain itu, senyawa antraquinon dari bunga trengguli memiliki sitotoksitas terhadap sel kanker kolon manusia, COLO 320 DM (Duraipandiyani & Ignacimuthu, 2007).

Berbagai penelitian yang telah dilakukan menunjukkan berbagai aktivitas farmakologi dari berbagai bagian tanaman trengguli. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan pada ekstrak dan fraksi n Heksan, etil asetat dan air dari kulit batang trengguli dengan metode peredaman radikal bebas DPPH.

Metode

Bahan

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang trengguli (*Cassia fistula L*) yang diambil Balai tanaman Obat Tradisional (BALITRO) Manoko Lembang Kab Bandung Jawa Barat. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu etanol 70 %, etanol 96% pa, DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil), vitamin C, n-heksan, etil asetat, aquadest, kloroform, metanol, pereaksi dragendorf, pereaksi mayer, pereaksi besi (III) klorida, pereaksi kalium hidroksida, asam klorida encer, HCl 2N, gelatin 1%, KOH 5%, iso amil alkohol, H₂SO₄, FeCl₃ 1%, asam asetat 0,7%.

Alat

Peralatan yang digunakan adalah batang pegaduk, botol semprot, gelas ukur, maserator, neraca analitik, vial 20 ml, vial 100 ml, pipet, corong, labu ukur 10 ml, labu ukur 100 ml, *rotary evaporator*, tabung reaksi, *beaker glass*, bejana kromatografi, pelat KLT silika gel GF 254, lampu UV 254 nm dan 366 nm, spektrofotometri dan kuvet, stopwach, dan alat laboratorium yang mendukung.

Pengumpulan Bahan dan Determinasi Tumbuhan

Bahan yang digunakan yaitu simplisia kulit batang tumbuhan trengguli dari spesies *Cassia fistula* L. yang diperoleh dari perkebunan Manoko, Lembang, Bandung. Determinasi tumbuhan dilakukan pada Laboratorium Taksonomi, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA UNPAD.

Ekstraksi Simplisia

Ekstraksi simplisia kulit batang tumbuhan trengguli dilakukan dengan cara maserasi dengan pelarut etanol 70% selama 3 kali 24 jam. Ekstrak cair dipisahkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C kemudian di uapkan diatas penangas air dengan suhu 40°C sehingga diperoleh berat ekstrak yang konstan. Rendemen ekstrak dapat dihitung dengan rumus:

Rendemen ekstrak (%) =

$$\frac{\text{massa ekstrak}}{\text{massa simplisia}} \times 100\%$$

Selanjutnya dilakukan pemeriksaan organoleptik ekstrak yang terdiri dari bentuk, warna, bau, dan rasa ekstrak.

Fraksinasi Ekstrak

Fraksinasi ekstrak dilakukan secara partisi dengan menggunakan campuran dua pelarut yang memiliki kepolaran yang berbeda. Campuran pelarut pertama adalah campuran n-heksan : air dan yang kedua adalah campuran etil asetat : air. Pertama. Ekstrak etanol dengan berat tertentu dilarutkan dalam air dengan volume tertentu sehingga ekstrak terlarut semuanya, kemudian n-heksan dengan volume tertentu ditambahkan untuk melarutkan ekstrak yang terlarut dalam pelarut non polar. Campuran tersebut dimasukkan kedalam corong pisah dan dikocok kuat-kuat hingga diperoleh lapisan air dan lapisan n-heksan, kedua lapisan kemudian dipisahkan. Kedalam lapisan air, selanjutnya ditambahkan etil asetat dan campuran tersebut dikocok kuat-kuat sehingga diperoleh lapisan air dan lapisan etil asetat, dan kedua lapisan tersebut dipisahkan. Lapisan n-heksan, lapisan air dan lapisan etil asetat kemudian diuapkan dalam *rotary evaporator* hingga diperoleh fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air (Hikmah, 2012).

Pola Kromatogram Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa kimia di dalam ekstrak. Dalam analisis kromatografi lapis tipis digunakan fase diam yaitu pelat silika gel GF 254 dan fase gerak yaitu kombinasi pelarut toluene, etil asetat, dan asam format dengan perbandingan 5:4:1. Ekstrak dilarutkan terlebih dahulu dalam etanol lalu ditotolkan pada pelat silika gel ukuran 10 cm x 1,0 cm dan dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan cairan pengembang. Proses kromatografi dihentikan ketika cairan pengembang mencapai garis akhir. Pola kromatogram diamati pada sinar tampak di bawah lampu UV 254 dan 366 nm, kemudian dihitung nilai Rf.

Uji Pendahuluan Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi kulit Batang Trengguli

Penyiapan Sampel

Ekstrak etanol sebanyak 1% dibuat larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm sehingga diperoleh konsentrasi 0,1%. Larutan stok 1000 ppm dibuat larutan standar 2, 4, 6, 8, 10, 12 ppm.

Penyiapan Larutan Pemanding

Vitamin C sebanyak 1% dibuat larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm sehingga diperoleh konsentrasi 0,1%. Larutan stok 1000 ppm dibuat larutan standar 2, 4, 6, 8, 10, 12 ppm.

Pembuatan Larutan DPPH (2,2-dipenil-1-pikril-hidrazil)

Kristal DPPH dilarutkan dalam etanol pada konsentrasi 0,01% b/v sebanyak 100 mL. Larutan DPPH dijaga dalam temperatur rendah dan terlindung cahaya.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan DPPH sebanyak 1 ml diencerkan dengan etanol sampai tanda batas labu takar 5 mL, blanko digunakan 5 mL etanol, diukur pada panjang gelombang 500-530 nm untuk mendapatkan absorbansi $\pm 0,2-0,8$.

Penentuan IC₅₀ dengan Metode DPPH

Ekstrak etanol, hasil fraksi maupun vitamin C dari berbagai konsentrasi masing-masing diambil 1 mL ditambahkan 1 mL DPPH, lalu divorteks dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Ukur absorbansinya pada panjang gelombang

515 nm. Dilakukan pengukuran serapan DPPH sebagai blanko pada panjang gelombang yang sama. Setelah diperoleh nilai absorbansi hitung % perendaman dengan menggunakan persamaan (Mbaoji et al., 2016)(Zuhra, Tarigan, & Sihotang, 2008) di bawah ini. Dari % perendaman yang diperoleh ditentukan IC₅₀ yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal bebas.

$$\% \text{ perendaman} = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100\%$$

Keterangan:

Ab = Absorbansi blanko = nilai absorbansi DPPH

As = Absorbansi sampel = nilai absorbansi sampel

Hasil

Hasil determinasi tumbuhan *Cassia fistula* ini termasuk ke dalam Famili: Fabaceae (suku polong-polongan), Genus: Cassia, Spesies: *Cassia fistula* L. Ekstraksi kulit batang trengguli (1000 g) secara maserasi dengan pelarut etanol 70% menghasilkan ekstrak kental kulit batang trengguli 33,6 (rendemen 33,6 %). Hasil penapisan fitokimia ekstrak kental kulit batang dapat dilihat pada Tabel 1.

Pembahasan

Fraksinasi ekstrak etanol kulit batang trengguli sebanyak 110 g dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan air dihasilkan data pengamatan organoleptik dan persen rendemen dari ekstrak dan seluruh fraksi. Hasil Pengamatan organoleptik dari ekstrak dan seluruh fraksi dapat dilihat pada tabel 2. Hasil fraksinasi bobot dan persen rendemen dari ekstrak dan seluruh fraksi dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 1 Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Trengguli

Golongan Senyawa	Hasil Pengujian
Alkaloida	-
Tanin	-
Polifenol	+
Saponin	+
Flavonoid	+
Monoterpenoid dan seskuiterpenoid	(+/+)
Steroid	-
Triterpenoid	-
Kuinon	+

Keterangan : terdeteksi (+); tidak terdeteksi (-).

Tabel 2 Hasil Pengamatan Organoleptik dari Ekstrak dan Seluruh Fraksi

Parameter	Komponen Ekstrak dan Fraksi			
	Ekstrak Etanol	n-Heksan	Etil Asetat	Air
Bentuk	Cairan Kental	Cairan Encer	Cairan Kental	serbuk kristal
Bau	Khas Trengguli	Khas Trengguli	Khas Trengguli	Khas Trengguli
Warna	Coklat tua	Coklat	Coklat muda	Coklat
Rasa	Pahit	Pahit	Pahit	Pahit

Tabel 3 Hasil Fraksinasi Bobot dan Persen Rendemen dari Ekstrak Etanol Kulit Batang Trengguli

Fraksi	Bobot Fraksi	Rendemen
	(g)	(%)
n-Heksan	4,25	3,86
Etil Asetat	40,57	36,88
Air	16,8	15,27

Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan dengan menggunakan lempeng silika gel GF 254, dengan pengembang toluene, etil asetat, dan asam format dengan perbandingan 5:4:1. Hasil KLT dilihat pada sinar tampak, UV 254 nm dan UV 366 nm Hasil KLT dapat dilihat pada Tabel 4.

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan: Pemeriksaan aktivitas antiradikal bebas DPPH secara spektrofotometri dilakukan dengan mereaksikan sampel dengan larutan DPPH. DPPH merupakan radikal sintetik yang larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol. DPPH merupakan radikal yang stabil yang dapat diukur intensitasnya pada panjang

gelombang 515 nm (Brand-Williams et al., 1995)(Thaipong, et al., 2006).

Pengukuran absorbansi sampel dilakukan pada konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 12 ppm. Uji daya antioksidan dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) dimaksudkan untuk menguatkan aktivitas suatu senyawa uji (ekstrak etanol dan seluruh fraksi kulit batang trengguli) sebagai antioksidan karena sebagaimana diketahui daya antioksidan dapat dilakukan dengan berbagai macam metode (Rohman, 2006). Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksan, etil

asetat, dan air kulit batang trengguli dapat dilihat pada Tabel 5-8.

Sebagai pembanding digunakan vitamin C yang sudah diketahui sebagai antioksidan. Hasil pengukuran daya Antioksidan vitamin C dengan metode

DPPH pada Tabel 8. Hubungan antara konsentrasi antioksidan ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksan, etil asetat, dan air kulit batang trengguli terhadap persen inhibisi dapat dilihat pada gambar 1.

Tabel 4 Hasil Pengujian KLT Ekstrak Etanol, Tablet Ekstrak, Fraksi Etil Asetat Dan Tablet Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Trengguli

Jenis	Bercak	Sinar Tampak	RF	
			UV ₃₆₆	UV ₂₅₄
Ekstrak	1 (biru)	-	0,508	-
	2 (merah)	-	0,678	-
	3 (hijau)	-	0,763	-
Fraksi	1 (biru)	-	0,508	-
	2 (jingga)	-	0,712	-

Tabel 5 Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak etanol 70% Kulit Batang Trengguli

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi*	% inhibisi*	regresi	IC 50
2	0,738	19,344		
4	0,713	22,077		
6	0,603	34,098	$y = 3,761x + 10,613$	
8	0,539	41,093		$\mu\text{g/ml}$
10	0,503	45,027		
12	0,395	56,831		

* Hasil 3 kali pengukuran ; * Absorbansi kontrol 0,915

Tabel 6 Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksan Kulit Batang Trengguli

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi*	% inhibisi*	regresi	IC 50
2	0,758	17,158		
4	0,737	19,454		
6	0,729	20,328	$y = 0,885x + 15,57$	
8	0,7	23,497		$\mu\text{g/ml}$
10	0,696	23,934		
12	0,675	26,230		

* Hasil 3 kali pengukuran ; * Absorbansi kontrol 0,915

Tabel 7 Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil asetat Kulit Batang Trengguli

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi*	% inhibisi*	regresi	IC 50
2	0,549	40,000		
4	0,465	49,180		
6	0,368	59,781	$y = 4,788x + 30,944$	3,980
8	0,241	73,661		$\mu\text{g/ml}$
10	0,22	75,956		
12	0,108	88,197		

* Hasil 3 kali pengukuran ; * Absorbansi kontrol 0,915

Tabel 8 Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi Air Kulit Batang Trengguli

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi*	% inhibisi*	regresi	IC 50
2	0,339	38,475		
4	0,333	39,564		
6	0,312	43,376	$y = 2,5201x + 30,756$	7,64
8	0,273	50,454		$\mu\text{g/ml}$
10	0,242	56,080		
12	0,207	62,432		

* Hasil 3 kali pengukuran ; * Absorbansi kontrol 0,915

Tabel 9 Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Vitamin C

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi*	% inhibisi*	regresi	IC 50
2	0,625	31,69		
4	0,548	40,11		
6	0,301	67,10	$y = 6,117x + 21,151$	4,716
8	0,259	71,69		$\mu\text{g/ml}$
10	0,166	81,86		
12	0,079	91,37		

* Hasil 3 kali pengukuran ; * Absorbansi kontrol 0,915

Tabel 10 Nilai IC₅₀ Pengujian Aktivitas Antioksidan Kontrol, Ekstrak dan Fraksi Kulit Batang Trengguli

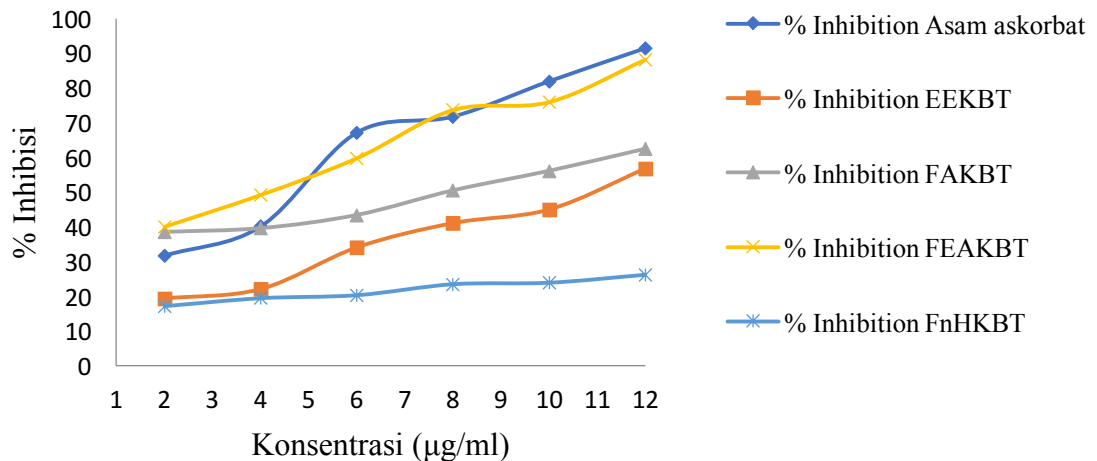
No	Sample	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
1	Vitamin C	4,716
2	EEKBT	10,613
3	FnHKBT	38,904
4	FEAKBT	3,980
5	FWKBT	7,636

Tabel 10 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai daya antioksidan dengan metode DPPH dengan nilai IC₅₀

sebesar 3,980 $\mu\text{g/ml}$. IC₅₀ merupakan konsentrasi kulit batang trengguli yang mampu memberikan persen penangkapan

radikal sebanyak 50 % dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linier, semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin kuat daya antioksidannya. Fraksi Etil asetat memiliki aktivitas yang lebih

baik diantara kontrol, ekstrak dan fraksi lain dengan nilai IC₅₀ 3,980 µg/ml dibandingkan dengan vitamin C dengan nilai IC₅₀ 4,716 µg/ml.



Gambar 1 Hubungan Antara Konsentrasi Antioksidan Ekstrak Etanol 70% dan Fraksi Kulit Batang Trengguli terhadap Persen Inhibisi

Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air kulit batang trengguli memberikan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan paling baik dengan nilai IC₅₀ 3,980 µg/ml dibandingkan vitamin c dengan nilai IC₅₀ 4,716 µg/ml. Sedangkan nilai IC₅₀ ekstrak etanaol, fraksi *n*-heksan, fraksi air adalah 10,613 µg/ml, 38,904 µg/ml dan 7,636 µg/ml.

Daftar Pustaka

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 1995; 28(1), 25–30.
- Duraipandiyar, V., & Ignacimuthu, S. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant, 2007; 112, 590–594.
- Fatima, Z., Abderrahmane, B., Seddik, K., & Lekhmici, A. Antioxidant Activity Assessment Of *Tamus Communis* L. Roots, 2016; 8(12).
- Gupta, M., Mazumder, U. K., Rath, N., & Mukhopadhyay, D. K. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich Ascites Carcinoma, 2000; 72, 151–156.
- Hikmah, F. dinul. Pengaruh partisi bertingkat cair-cair ekstrak etanol rimpang jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) terhadap profil kandungan senyawa kimia dan aktivitas antiradikalnya. Pengaruh Partisi Bertingkat Cair-Cair Ekstrak Etanol Rimpang Jahe (*Zingiber Officinale* Rosc.) Terhadap Profil Kandungan Senyawa Kimia Dan Aktivitas Antiradikalnya, 2012; 1–17.
- Jothy, S. L., Zuraini, Z., & Sasidharan, S. Phytochemicals screening, DPPH free radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities of *Cassia fistula* seeds extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011; 5(10), 1941–1947.
- Mbaoji, F. N., Ezike, A. C., Nworu, C.

- S., Onyeto, C. A., Nwabunike, I. A., Okoli, I. C., & Akah, P. A. Antioxidant And Hepatoprotective Potentials Of *Stemonocoleus Micranthus* Harms (Fabaceae) Stem Bark Extract, 2016; 8(7).
8. Rohman, A. Aktivitas antioksidan , kandungan fenolik total dan kandungan flavonoid total ekstrak etil asetat buah Mengkudu serta fraksi-fraksinya, 2006; 17(3), 136–142.
 9. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006; 19(6-7), 669–675.
 10. Widyawati, P. S. R. I. Determination Of Antioxidant Capacity In *Pluchea Indica* Less Leaves Extract And Its Fractions, 2016; 8(9).
 11. Zuhra, C. F., Tarigan, J. B., & Sihotang, H. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid Dari Daun Katuk (*Sauropus androgunus* (L) Merr .), 2008; 3(1), 10–13.