

**PENGARUH PEMBERIAN INFUSA DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)
TERHADAP PROFIL KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*)**

Lusi Setiowati, Lizma Febrina, Febrina Mahmudah, Adam M Ramadhan

Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Kefarmasian “Farmaka Tropis”,
Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Indonesia

*Email: lusisetiowati21@gmail.com

ABSTRACT

*Soursop leaves (*Annona muricata* L.) is a plant that has been used empirically by the community because one of its benefits as an antioxidant. Soursop leaves are known to contain many compounds including steroids / terpenoids, flavonoids, coumarins, alkaloids, and tannins. The aim of the study was to determine IC₅₀, MDA levels of soursop leaf infusion and the effect of giving soursop leaf infusion (*Annona muricata* L.) to white rats exposed to cigarette smoke based on measurements of malondialdehyde (MDA) levels. This study used 20 white rats which were divided into four treatment groups, namely the control group, 7 days exposure, 14 days exposure and 7 days exposure then giving 7 days soursop infusion. The method used in measuring MDA levels is the Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) method measured by a UV-Vis spectrophotometer at $\lambda = 531$ nm. The statistical analysis used in this study is the t-test. The results obtained were IC₅₀ of 66.08 ppm (strong), MDA levels in the group of soursop leaf infusion on the 0th, 7th and 14th days of the values of 0.470 nmol/mL; 0.652 nmol/mL and 0.470 nmol/mL. Statistical results showed that there was an effect of giving soursop leaf infusion to the profile of MDA levels ($p < 0.05$).*

Keywords: *Annona muricata* L., malondialdehyde, infusion method.

ABSTRAK

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan tanaman yang telah digunakan secara empiris oleh masyarakat karena salah satu manfaatnya sebagai antioksidan. Daun sirsak diketahui banyak mengandung berbagai senyawa antara lain steroid/terpenoid, flavonoid, kumarin, alkaloid, dan tanin. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui IC₅₀, kadar MDA pemberian infusa daun sirsak dan pengaruh pemberian infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap tikus putih yang terpapar asap rokok berdasarkan pengukuran kadar malondialdehida (MDA). Penelitian ini menggunakan 20 tikus putih yang dibagi dalam empat kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol, paparan 7 hari, paparan 14 hari dan paparan 7 hari lalu pemberian infusa daun sirsak 7 hari. Metode yang digunakan dalam pengukuran kadar MDA yaitu metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS) yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda = 531$ nm. Analisis statistik yang digunakan pada penelitian ini yaitu uji-t. Hasil penelitian yang didapatkan yaitu IC₅₀

sebesar 66,08 ppm (kuat), kadar MDA pada kelompok pemberian infusa daun sirsak pada hari ke 0, 7 dan 14 nilainya berturut-turut sebesar 0,470 nmol/mL; 0,652 nmol/mL dan 0,470 nmol/mL. Hasil statistik menunjukkan bahwa adanya pengaruh pemberian infusa daun sirsak terhadap profil kadar MDA ($p < 0,05$).

Kata kunci: *Annona muricata* L., malondialdehida, metode infusa.

DOI: <https://doi.org/10.25026/mpc.v8i1.320>

PENDAHULUAN

Merokok merupakan hal yang tidak asing dan sering dilakukan pada masyarakat Indonesia. Di Indonesia perilaku merokok penduduk usia >15 tahun mengalami peningkatan sebesar 36,3 %. Jumlah rokok yang dihisap per harinya rata-rata yaitu 12-13 batang atau setara dengan sebungkus^[3]. Bahan kimia yang berbahaya dalam asap rokok seperti bahan karsinogen, tar, nikotin, nitrosamin, karbonmonoksida, senyawa *Polynuclear Aromatic Hydrocarbon* (PAH), fenol, karbonil, klorin dioksin dan furan. Bahan kimia berbahaya tersebut dapat meningkatkan radikal bebas didalam tubuh dan mempengaruhi penurunan antioksidan didalam tubuh sehingga memicu terjadinya stres oksidatif^[14].

Stres oksidatif biasanya terjadi apabila jumlah antioksidan didalam tubuh lebih rendah dibandingkan dengan jumlah radikal bebas. Stres oksidatif tubuh dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameternya, yaitu kadar malondialdehid (MDA) dalam plasma^[16]. Malonaldehid merupakan produk akhir dari radikal hasil peroksida lipid yang bersifat toksik terhadap sel hidup. Semakin tinggi kadar MDA plasma, maka semakin tinggi stress oksidatif yang terjadi dalam sel-sel tubuh^[12].

Sistem antioksidasi tubuh makhluk hidup dapat digunakan untuk melindungi tubuh dari bahaya radikal bebas atau dikenal sebagai spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*,

ROS) yang terbentuk sebagai hasil dari metabolisme oksidatif. Tubuh secara alami dapat menghasilkan antioksidan, seperti *superoksida dismutase* (SOD), *katalase* (CAT), *glutation peroksidase* (GPx), *glutation reduktase* (GR) dan *seruloplasmin* disebut sebagai antioksidan endogen. Apabila sistem antioksidan endogen tidak mencukupi untuk mengatasi radikal bebas, maka sangat dibutuhkan antioksidan dari luar (antioksidan eksogen) seperti vitamin E, vitamin A, vitamin C dan senyawa-senyawa flavonoid untuk mencegah kerusakan oksidatif yang dapat mengakibatkan terjadinya berbagai macam penyakit^[13].

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki kandungan senyawa antara lain steroid/terpenoid, flavonoid, kumarin, alkaloid, dan tanin. Flavonoid dalam ekstrak daun sirsak berperan sebagai zat antioksidan yang dapat membantu mencegah terjadinya stres oksidatif dalam tubuh akibat ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan. Ekstrak daun sirsak sebagai antioksidan berpengaruh pada penurunan kadar MDA yang merupakan biomarker biologis peroksidasi lipid untuk menilai stres oksidatif^[9]. Di Indonesia daun sirsak secara empiris digunakan sebagai pengobatan tradisional dengan merebus daun sirsak dengan air untuk mengobati kanker yang disebabkan oleh radikal bebas. Menurut penelitian yang telah dilakukan infusa daun sirsak memiliki

aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 76,91 ppm^[4].

METODE PENELITIAN

Alat

Box induksi kaca, gunting bedah, holder, mikropipet, hot plate, sentrifuge, timbangan hewan, timbangan analitik, tabung eppendorf, Spektrofotometer UV-Vis.

Bahan

Daun sirsak (*Annona muricata L.*), aquadest, asam tiobarbiturat (TBA), asam trikloro asetat (TCA), tetra metoksi propana (TMP), rokok, kapas, alkohol, FeCl₃, pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi dragendroff, HCl pekat, serbuk Mg, metanol p.a dan pereaksi DPPH.

Pembuatan Infusa

Infusa dibuat dengan menimbang 10 g simplisia daun sirsak dimasukkan ke dalam panci infus kemudian ditambahkan air 100 mL. Kemudian dipanaskan dalam tangas air selama 15 menit, dihitung mulai suhu di dalam panci mencapai 90°C sambil sesekali diaduk.

Pengujian Metabolit Sekunder

Pengujian metabolit sekunder yang dilakukan yaitu alkaloid, flavonoid, polifenol tanin dan saponin^[10].

Pengujian Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Infusa daun sirsak diuapkan diatas penangas air sampai pekat, dibuat larutan stok 1000 ppm dengan melarutkan infusa daun sirsak dengan metanol p.a lalu dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm.

Diambil larutan uji berbagai konsentrasi sebanyak 2 mL, ditambahkan 2 mL larutan pereaksi DPPH dalam ruangan tertutup, dikocok dan didiamkan selama 30 menit, dibaca serapan aktivitasnya pada panjang gelombang maksimum (λ max).

Persiapan Hewan Coba

Disiapkan hewan coba, yakni tikus putih yang sehat, normal dan anggota tubuh lengkap. Setelah itu tikus yang ada dibagi menjadi 4 kelompok yang berbeda sesuai dengan perlakuan masing-masing. dan setiap kelompok berjumlah 5 ekor tikus. Kelompok I adalah kontrol negatif (kelompok normal), tidak diberi paparan asap rokok dan tidak diberi infusa daun sirsak. Kelompok II adalah perlakuan yang dilakukan pemaparan asap rokok selama 7 hari. Kelompok III adalah perlakuan yang dilakukan pemaparan asap rokok selama 14 hari. Kelompok IV perlakuan yang dilakukan pemaparan asap rokok selama 7 hari, lalu diberikan infusa daun sirsak selama 7 hari. Kelompok tikus yang ada diberikan waktu minggu pertama untuk beradaptasi dengan lingkungan, diberikan pakan standart dan minuman standart serta penggantian sekam setiap 2 kali seminggu.

Pemaparan Asap Rokok dan Pengambilan Sampel Darah

Dimasukkan hewan coba dalam chamber induksi yang berukuran 38,5 x 28,5 x 22,5 cm, dialirkan asap yang telah dikumpulkan dalam chamber pengumpul asap hingga asap habis. Proses pemaparan dilakukan setiap pagi dan sore hari dengan menggunakan asap dari 3 batang rokok. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan mengusap bagian ekor tikus dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol, lalu dipotong sedikit ujung ekor tikus. Diusap secara perlahan dari pangkal hingga ujung ekor, ditampung 1 mL darah yang keluar dan dikumpulkan dalam *microtube*. Disentrifugasi darah yang telah ditampung dalam tabung reaksi pada tahap sebelumnya dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Diambil supernatan untuk pengujian tahap selanjutnya.

Pembuatan Kurva Baku Tetrametoksipropan (TMP)

Dibuat larutan TMP dengan konsentrasi 20 nmol/mL sebagai standar dalam pengujian kadar MDA sampel. Diambil dari larutan stok tersebut sebanyak 0,3; 0,65; 1,25; 2,5; 5 dan 10 nmol/mL. Lalu dimasukkan 1 mL kedalam 5 buah labu ukur yang berbeda. Ditambahkan Asam Trikloroasetat (TCA) 20% sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur, lalu dikocok hingga homogen. Ditambahkan aquadest ke dalam setiap labu ukur hingga volumenya mencapai 10 mL. Ditambahkan reagen Asam Tiobarbiturat (TBA) 0,01% sebanyak 1 mL ke dalam setiap labu ukur, dikocok kembali hingga homogen. Digunakan larutan yang sama tanpa TMP sebagai blanko. Dimasukkan semua tabung reaksi ke dalam pemanas air pada suhu 100° C selama 10 menit, lalu didinginkan. Diukur absorbansi pada $\lambda = 531$ nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visibel dan dibuat kurva kalibrasi.

Pengukuran Kadar MDA

Dipipet 1 mL supernatan (serum) dari semua kelompok, baik kelompok uji maupun kontrol ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan TCA 20% sebanyak 1 mL. Disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Dipipet 1 mL supernatan dan ditambahkan dengan 1 mL TBA 0,01%. Diukur absorbansi dari warna yang terbentuk pada $\lambda = 531$ nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visibel. Dihitung kadar MDA sampel dengan menggunakan kurva kalibrasi dari TMP.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian senyawa metabolit sekunder yang dilakukan pada infusa daun sirsak yaitu alkaloid, flavonoid, polifenol, saponin dan tanin. Pengujian metabolit sekunder dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang diduga dapat berkhasiat sebagai antioksidan. Dari pengujian metabolit

sekunder diperoleh hasil seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Metabolit Sekunder Infusa Daun Sirsak

Senyawa	Hasil
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Polifenol	+
Saponin	+
Tanin	+

Berdasarkan uji metabolit sekunder, infusa daun sirsak positif mengandung diketahui senyawa golongan alkaloid, flavonoid, polifenol, saponin dan tanin. Alkaloid mengandung nitrogen sebagai bagian dari sistem sikliknya serta mengandung substituen yang bervariasi seperti gugus amina, amida, fenol, dan metoksi sehingga alkaloid bersifat semipolar. Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai gugus hidroksil. Tanin termasuk golongan polifenol merupakan senyawa fenolik yang cenderung larut dalam air dan pelarut polar yang. Saponin merupakan glikosida triterpen yang memiliki sifat cenderung polar karena ikatan glikosidanya. Sehingga dapat disimpulkan senyawa terkandung dalam infusa daun sirsak sebagian besar bersifat polar.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Metode DPPH merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan suatu sampel dengan menggunakan alat Spektrofotometer UV-Visible. Metode DPPH digunakan karena sederhana, cepat dan hanya membutuhkan sedikit sampel uji. Prinsip dari metode DPPH yaitu senyawa DPPH yang tidak berpasangan akan bereaksi dengan senyawa antioksidan yang ada didalam sampel dengan menyumbangkan

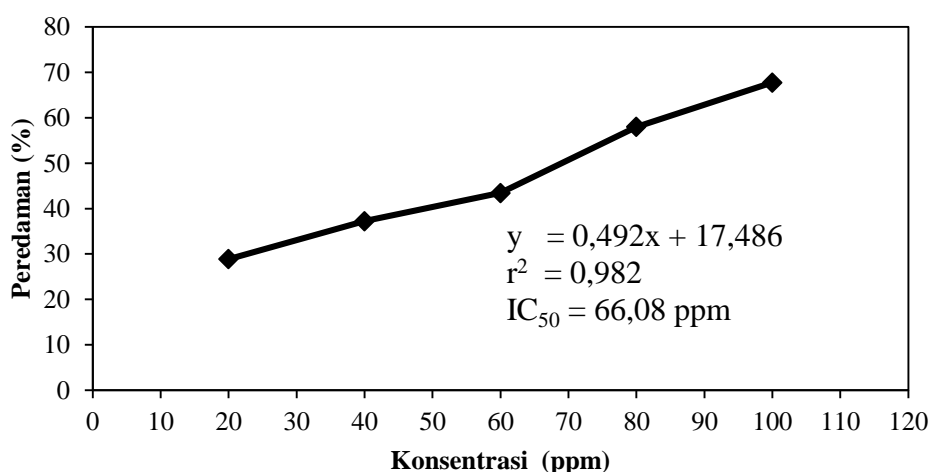
satu elektronnya sehingga membantuk senyawa yang stabil [11].

Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH yang

diperoleh adalah λ_{max} 514 nm. Dari pengujian aktivitas antioksidan didapatkan hasil yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Infusa Daun Sirsak

No.	Konsentrasi (ppm)	%Aktivitas Antioksidan (%)	IC ₅₀ (ppm)
1.	20	28,87	
2.	40	37,23	
3.	60	43,43	66,08
4.	80	57,99	
5.	100	67,78	



Gambar 1. Grafik IC₅₀ Infusa Daun Sirsak

Nilai IC₅₀ infusa daun sirsak didapat dari hasil perhitungan persamaan regresi linier, dimana persamaan regresi dari infusa daun sirsak yang didapat adalah $y = 0,492x + 17,486$ dan $r^2 = 0,982$. Koefisien y pada persamaan ini adalah sebagai IC₅₀, sedangkan koefisien x pada persamaan ini adalah konsentrasi yang akan dicari nilainya, dimana nilai dari x yang didapat merupakan besarnya konsentrasi yang diperlukan untuk dapat meredam 50% aktivitas radikal DPPH.

Berdasarkan kurva pada Gambar 1, menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi berbanding lurus dengan % peredaman. Hal ini sesuai dengan Hukum

Lambert-Beer yang menyatakan bahwa konsentrasi suatu sampel berbanding terbalik dengan absorbansi sehingga semakin tinggi konsentrasi maka absorbansi akan semakin kecil dan persen aktivitas antioksidan semakin besar. Setelah dimasukkan dalam persamaan linear diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 66,08 ppm yang masuk dalam kategori kuat. Nilai IC₅₀ merupakan angka yang menunjukkan konsentrasi infusa daun sirsak (ppm) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan

yang sangat kuat bila $IC_{50} < 50$ ppm, kuat bila IC_{50} bernilai 50-100 ppm, sedang bila IC_{50} bernilai 101-250, dan lemah bila IC_{50} 251-500 ppm.

Rokok digunakan dalam penelitian ini sebagai sumber dari radikal bebas. Hewan coba dipaparkan pada pagi dan sore hari masing-masing 3 batang rokok. Pemaparan asap rokok digunakan untuk menyelidiki efek spesifik dari asap rokok pada stress oksidatif karena mudah dan sensitif. Paparan asap rokok dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang diikuti dengan peningkatan produk peroksidasi lipid.

Berdasarkan data yang diperoleh (Tabel 3) terlihat bahwa sebelum adanya perlakuan ada hewan coba, telah terbentuk MDA didalam tubuh. Dalam keadaan normal tubuh akan tetap memproduksi radikal bebas dalam jumlah tertentu sebagai hasil samping dari reaksi pernafasan, metabolisme dan berbagai mekanisme endogen tubuh lainnya. Senyawa radikal tersebut diproduksi di dalam sel oleh mitokondria, membran plasma, lisosom, peroksisom, reticulum endoplasma dan inti sel. Keberadaan radikal-radikal ini tetap akan bereaksi dengan lipid membran tubuh, karena lipid merupakan komponen utama penyusun

sel yang kaya akan ikatan rangkap, sehingga lipid merupakan target utama senyawa radikal bebas, namun masih dapat dinetralisir oleh antioksidan endogen tubuh. Sehingga kadar MDA tetap terbentuk, namun masih di dalam rentang yang wajar^[6].

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini yaitu pada hari ke 7 setelah paparan asap rokok pada setiap kelompok sesuai perlakuan menunjukkan peningkatan kadar MDA. Kadar MDA pada kelompok paparan 14 hari yang tinggi karena paparan radikal bebas yang terus-menerus tanpa asupan antioksidan. Radikal bebas dari asap rokok menyebabkan terjadinya peroksidasi asam lemak tak jenuh membran sel yang memperkuat stres oksidatif^[7]. Sehingga akan terjadi peningkatan kadar MDA akibat adanya paparan asap rokok^[14].

Kadar MDA dianalisis secara statistik menggunakan uji-t. Uji-t digunakan untuk melihat perbedaan kadar MDA antara kelompok kontrol, kelompok paparan 7 hari, kelompok paparan 14 hari dan kelompok paparan 7 hari lalu pemberian infusa daun sirsak 7 hari. Hasil pengukuran kadar MDA dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Kadar MDA

Kelompok Perlakuan	Pengukuran Kadar MDA (nmol/mL) Hari Ke-			<i>p value</i>
	0	7	14	
Kontrol	0,713	0,583	0,600	0,03
Paparan 7 Hari	0,678	0,895	0,817	
Paparan 14 Hari	0,791	1,085	1,389	
Paparan 7 Hari dan Pemberian Infusa Daun Sirsak	0,470	0,652	0,470	

Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok paparan 7 hari dan kelompok paparan 14 hari dengan kelompok paparan 7 hari lalu pemberian infusa daun sirsak 7 hari

($p < 0,05$). Berdasarkan hasil perbandingan tersebut maka dapat disimpulkan pemberian infusa daun sirsak dapat menurunkan kadar MDA tikus secara signifikan. Dalam keadaan normal

radikal bebas dapat diredam oleh aktivitas pertahanan dari senyawa antioksidan endogen, seperti enzim *katalase*, *superoksida dismutase* (SOD), *glutathion peroksidase* (GPx), protein glutathion tereduksi (GSH) sehingga menyebabkan penurunan kadar MDA. Selain itu radikal bebas juga dapat diredam dari antioksidan dari luar (antioksidan eksogen) seperti vitamin E, vitamin A, vitamin C dan senyawa-senyawa flavonoid [13].

Kemampuan dalam menurunkan kadar MDA diduga kandungan alkaloid, flavonoid dan saponin yang ada didalam infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.). Flavonoid merupakan antioksidan eksogen yang telah dibuktikan bermanfaat dalam mencegah kerusakan sel akibat stres oksidatif, terdapat dua mekanisme flavonoid sebagai antioksidan yaitu mendonorkan ion hidrogen sehingga menetralkan efek toksik dari radikal bebas serta meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui aktivasi *nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (Nrf2) sehingga terjadi peningkatan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen [7]. Kekuatan aktivitas antioksidan dari flavonoid bergantung pada jumlah dan posisi dari gugus -OH yang terdapat pada molekul. Kekuatan aktivitas antioksidan dari flavonoid bergantung pada jumlah dan posisi dari gugus -OH yang terdapat pada molekul. Semakin banyak gugus -OH pada flavonoid, maka aktivitas antiradikalnya semakin tinggi [2].

Senyawa alkaloid dapat bertindak sebagai penangkap radikal bebas dan dapat mencegah terjadinya peroksidasi lipid pada hepatik mikrosomal. Senyawa alkaloid, terutama indol, memiliki kemampuan untuk menghentikan reaksi rantai radikal bebas secara efisien. Senyawa radikal turunan dari senyawa amina ini memiliki tahap terminasi yang sangat lama [5]. Senyawa saponin dapat bertindak sebagai antioksidan dan memiliki kemampuan dalam menangkap

radikal bebas. Sedangkan senyawa saponin dapat menurunkan stress oksidatif pada tikus yang diinduksi aloksan [1].

KESIMPULAN

Pemberian infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) berpengaruh dan dapat menurunkan kadar MDA tikus putih yang terpapar asap rokok.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Alii Smith, Y. R. 2014. *In Vitro* and *In Vivo* Antioxidant Activity of Saponin Extracted from The Root of *Garcinia Kola* (Bitter Kola) on Alloxan Induced Diabetes Rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (7), 8-26.
- [2] Amic, D. 2002. Structure Radical Scavenging Activity Relationship of Flavonoids. *Croatia Chemica Acta*, 6(1), 55-61.
- [3] Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS)*. Jakarta.
- [4] Desmiaty, Yesi. 2015. Preparation of Standardized Aqueous Extract of *Annona Muricata* Linn. Leaf and Its Potency as Antioxidant. *Presented in POKJANAS TOI International Seminar. Faculty Pharmacy Pancasila University*.
- [5] Dinara, J. M. 2007. Antioxidant Properties of β -Carboline Alkaloids are Related to Their Antimutagenic and Antigenotoxic Activities. *Mutagenesis*, 22(4), 293-302.
- [6] Febrina, Lizma. 2016. Profil Kadar Malondialdehid, Glukosa dan Kolesterol Pada Tikus Putih yang Terpapar Asap Rokok. *J. Trop. Pharm. Chem* Vol 3 No. 4.
- [7] I Wayan, S., I Made, J. 2012. Ekstrak Air Daun Ubi Jalar Ungu Memperbaiki Profil Lipid dan Meningkatkan Kadar SOD Darah

- Tikus yang Diberi Makanan Tinggi Kolesterol. *Medicina*, 43 (2), 67-70.
- [8] Kevin, C. K., Hannah, J. Z. 2006. An Integrated View of Oxidative Stress in Aging: Basic Mechanism, Functional Effects, and Pathological Considerations. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative Comparative Physiology*, 292 (1), 18-36.
- [9] Kusuma, Anggia Shinta Wijaya. 2015. The Effect of Ethanol Extract of Soursop Leaves (*Annona muricata* L.) to Decrease Levels of Malondialdehyde. *Journal Majority*. Vol 4. No 3.
- [10] Minarno, Eko Budi. 2015. Skrining Fitokimia dan Kandungan Total Flavonoid Pada Buah *Carica pubescens* Lenne & K. Koch di Kawasan Bromo, Cangar dan Dataran Tinggi Dieng. *El-Hayah* 5(2), 73-82.
- [11] Naspiah, Nisa. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil). *JAS* 3(2): 62-65.
- [12] Omar, F. A., Wasan, T.A. 2013. Effect of Cigarette Smoking on Lipid Peroxidation And Antioxidant Status in Iraqi Men ar Baghdad City. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(1), 47-50.
- [13] Simanjuntak, K. 2007. Radikal Bebas dari Senyawa Toksik Karbon Tetraklorida (CCl₄). *Bina Widya* Vol. 18 No. 01: 25-31.
- [14] Sirait, Reynold Christian. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Kadar MDA Serum Tikus *Sprague Dawley* Setelah Diberikan Paparan Asap Rokok. *JKD* Vol. 5 No. 4.
- [15] Somwanshi, D. S. 2013. Effect of Cigarette Smoking on Lipid Peroxidation In Semen. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, 3(2), 289-294.
- [16] Valko, M. 2006. Free Radical: Metal and Antioxidant in Oxidative Stress Induced Cancer. *J Chem. Biol. Rusia edisi* 160. p.1-40.
- [17] Yagi, K. 1994. *Free Radical in Diagnostic Medicine*. New York: Plenum Pr.