

Ulasan Ilmiah/Review

ANTI OKSIDAN ALAMI: SUMBER, KIMIA, DAN TEKNOLOGI EKSTRAKSI

Natural Antioxidant: Source, Chemistry, and Extraction Technology

Lukman Junaidi

Balai Besar Industri Agro
Jl. Ir. H. Juanda 11 Bogor. 16122

ABSTRACT

Antioxidants are substances that when present in food or in the body at low concentrations compared to that of an oxidizable substrate markedly delay or prevent the oxidation of that substrate. The mechanism by which antioxidants protect food from oxidation is by scavenging of free radicals via donation of an electron or a hydrogen atom, or by deactivation of metal ions and singlet oxygen. Naturally occurring inhibitors of oxidation in food generally originate from plant-based materials. Antioxidants can be classified into groups based on how they work and where they are found. There have been a number of assay methods developed to measure the capacity of antioxidants as pure compounds or in extracts. These methods focus on different mechanisms of the antioxidant such as scavenging of oxygen and hydroxyl radicals, reduction of lipid peroxy radicals, chelation of metal ions, or inhibition of lipid peroxidation. The very common methods used were: ORAC, OSI, DPPH, and TEAC. There are three principle techniques that may be used to extract naturally occurring antioxidant: extraction using solvent, solid-phase extraction, and supercritical CO₂ extraction.

Keywords: Natural antioxidant, source, chemistry, extraction technology, capacity assay

PENDAHULUAN

Antioksidan adalah molekul yang dapat memperlambat atau mencegah terjadinya proses oksidasi bahan kimia lainnya. Antioksidan secara nyata dapat memperlambat reaksi oksidasi, walaupun dengan konsentrasi yang lebih rendah sekalipun dibandingkan dengan substrat yang dapat dioksidasi. Reaksi oksidasi dapat menghasilkan radikal bebas yang membentuk rantai reaksi kimia yang membahayakan kesehatan. Antioksidan dapat menghentikan rantai reaksi tersebut dengan cara menghilangkan intermediat radikal. Antioksidan juga dapat menghambat reaksi oksidasi dengan cara membiarkan reaksi oksidasi terjadi pada antioksidan tersebut. Dalam hal ini antioksidan biasanya berbentuk bahan pereduksi seperti senyawa tiol atau fenol (Wikipedia, 2007).

Reaksi oksidasi sesungguhnya merupakan reaksi yang sangat penting dalam kehidupan, tetapi dalam kondisi tidak terkendali, reaksi oksidasi justru dapat membahayakan kesehatan. Untuk mengatasi masalah tersebut tumbuhan dan hewan

memelihara sistem yang kompleks dari berbagai jenis antioksidan. Apabila antioksidan tersebut kadarnya sangat rendah atau terjadi penghambatan terhadap enzim antioksidan, akan dapat mengakibatkan stress oksidatif (*oxidative stress*) yang dapat merusak atau mematikan sel-sel hidup (Wikipedia, 2007).

Antioksidan sangat beragam jenisnya. Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Antioksidan sintetik yang paling luas penggunaannya dalam bahan makanan adalah *BHA*, *BHT*, *TBHQ* dan propilgalat. Penggunaan antioksidan sintetik dalam bahan makanan saat ini mendapat sorotan berkaitan dengan keamanan pangan karena dianggap sebagai karsinogenik (Daniells, 2006). Oleh karena itu minat untuk menggantikan antioksidan sintetik dengan antioksidan alami telah meningkat.

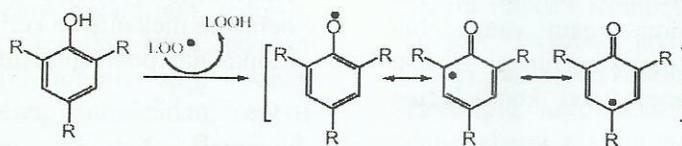
Antioksidan alami umumnya diperoleh dari tumbuhan. Komponen aktif, seperti fenol, polifenol, dan tokoferol, merupakan produk metabolit sekunder yang dihasilkan (diturunkan) pertama kali dari fenil-propanoid, dan dalam kasus tertentu pada beberapa tumbuhan diturunkan dari tirosin. Dengan demikian senyawa fenol dalam pangan alami

tersedia sebagai campuran berbagai senyawa yang merupakan gabungan berbagai komponen aktif dalam bentuk bebas, bentuk esterifikasi, bentuk glikosilasi, dan bentuk terikat (Shahidi and Nacz, 1995). Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, katekin, dan kalkon. Sementara turunan asam sinamat meliputi asam kafeat, asam ferulat dan asam klorogenat. Senyawa antioksidan alami polifenolik ini bersifat multifungsi dan dapat beraksi sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkelat logam, dan peredam (penghambat) terbentuknya oksigen tunggal (1O_2) (Pratt, 1992).

Dalam tulisan ini dibahas aspek yang berkaitan dengan definisi antioksidan, sumber antioksidan alami, teknologi ekstraksi dan isolasi antioksidan alami, dan beberapa metode yang umum digunakan untuk mengukur kapasitas (efektivitas) antioksidan alami. Tulisan ini dimaksudkan untuk memberikan gambaran berkaitan dengan antioksidan alami sehingga dapat menjadi bahan informasi untuk penelitian berkaitan dengan antioksidan alami.

TERMINOLOGI ANTIOKSIDAN ALAMI

Antioksidan adalah bahan (*substances*) yang apabila berada dalam konsentrasi rendah bersama dengan substrat yang dapat dioksidasi, secara nyata dapat menghambat (*retard*) oksidasi dari substrat tersebut (Halliwell, 1995). Secara umum klasifikasi antioksidan didasarkan pada perbedaan mekanisme kerja yaitu: antioksidan primer dan antioksidan sekunder (Dapkevicius, 2002). Antioksidan primer menghambat tahap inisiasi dan memecah tahap propagasi reaksi rantai radikal. Antioksidan bekerja melalui transfer atom hidrogen ke radikal peroksi. Radikal yang dihasilkan dari antioksidan teroksidasi distabilkan oleh resonansi dan menjadi relatif tidak reaktif, sehingga tidak mampu melakukan tahap inisiasi atau propagasi reaksi oksidatif. Mekanisme kerja antioksidan primer ditunjukkan pada Gambar 1. Antioksidan sekunder (antioksidan preventif) meliputi: agen pengkelat logam, peredam 1O_2 , dan penghancur peroksida (Larson, 1997).



Gambar 1. Mekanisme kerja antioksidan primer (sumber: Wong, 1989)

Klasifikasi antioksidan dapat juga didasarkan pada antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan sintetik yang paling banyak dikenal adalah: *BHA*, *BHT*, *TBHQ* dan propil-galat. Berbeda dengan antioksidan sintetik, keragaman antioksidan alami jauh lebih banyak. Di antara antioksidan alami, hanya sejumlah kecil yang sudah dianalisis secara menyeluruh dan hanya sebagian yang sudah benar-benar dapat digunakan, seperti tokoferol, karotenoid, asam askorbat dan turunannya, serta ekstrak dari rosemary dan saga yang telah diaplikasikan pada industri pangan (Dapkevicius, 2002).

Jenis-Jenis Antioksidan Alami

Jenis antioksidan alami sangat beragam, baik ditinjau dari sumber maupun mekanisme kerja. Diantara beragam antioksidan alami

tersebut, beberapa jenis antioksidan alami yang sudah banyak dimanfaatkan secara komersial antara lain sebagai berikut:

Tokoferol

Tokoferol merupakan antioksidan alami yang sangat penting dan digolongkan ke dalam dua kelompok yaitu: tokol dan tokotrienol. Sereal dan kacang-kacangan merupakan sumber tokol yang kaya (White and Xing, 1997). Minyak dan sayuran hijau juga merupakan sumber tokoferol (Aruoma, 1994). Mekanisme antioksidan tokoferol melibatkan reaksi dengan radikal bebas (utamanya radikal peroksil), menghasilkan pembentukan radikal fenoksi. Mekanisme yang lain dari tokoferol meliputi penangkapan dan peredaman oksigen tunggal (1O_2).

Karotenoid

Karotenoid merupakan pigmen berwarna kuning, orange atau merah, yang terdapat pada buah dan ubi tertentu dengan konsentrasi tinggi seperti pada wortel dan tomat (Larson, 1997). Karotenoid memiliki struktur poli-isoprena rantai panjang dengan 40 atom karbon. Kemampuan antioksidan karotenoid tergantung pada mekanisme delokalisasi dari elektron tidak berpasangan melalui konjugasi sistem poliena (Terao, 1989). Seperti halnya tokoferol, karotenoid juga merupakan peredam 1O_2 yang sangat efektif. Proses peredaman 1O_2 berkaitan dengan transfer energi dari 1O_2 ke karoten (Foote and Denny, 1968). Peredaman 1O_2 juga tergantung pada jumlah ikatan rangkap yang berkonjugasi dalam karoten.

Asam Askorbat

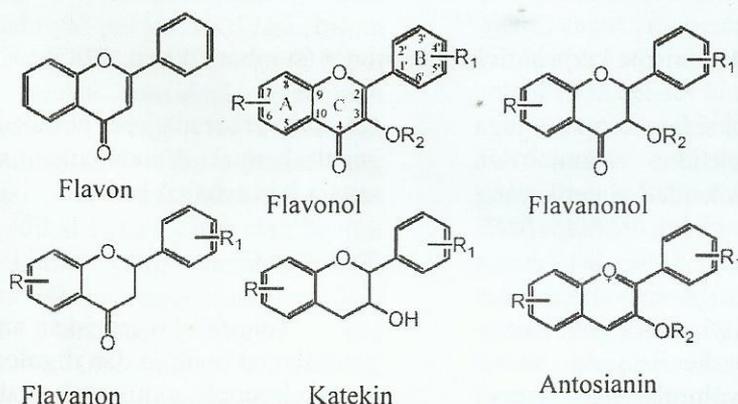
Asam askorbat ditemukan dalam konsentrasi yang cukup tinggi secara alami pada buah dan sayur. Asam askorbat bertindak sebagai antioksidan multifungsi dan sebagai sinergis untuk antioksidan primer. Jika terdapat konsentrasi ion logam yang lebih tinggi, asam askorbat dapat berfungsi sebagai pro-oksidan dengan mereduksi kembali ion

logam yang teroksidasi, sehingga proses inisiasi reaksi radikal bebas baru dapat terjadi (Halliwell, 1995).

Senyawa Fenolik (Flavonoid)

Flavonoid mewakili group yang sangat banyak dan beragam dari senyawa fenolik yang diperoleh dari tumbuhan tingkat tinggi. Senyawa aromatik ini dibentuk dalam tumbuhan dari asam amino aromatik (fenilalanin dan tirosin) dan unit asetat. Flavonoid dapat menunjukkan pola substitusi dan keadaan oksidasi yang sangat beragam, yang dikelompokkan menjadi: flavonol, flavanonol, flavon, flavanon, katekin dan antosianin (Harborne, 1988). Struktur kimia flavonoid ditunjukkan pada Gambar 2.

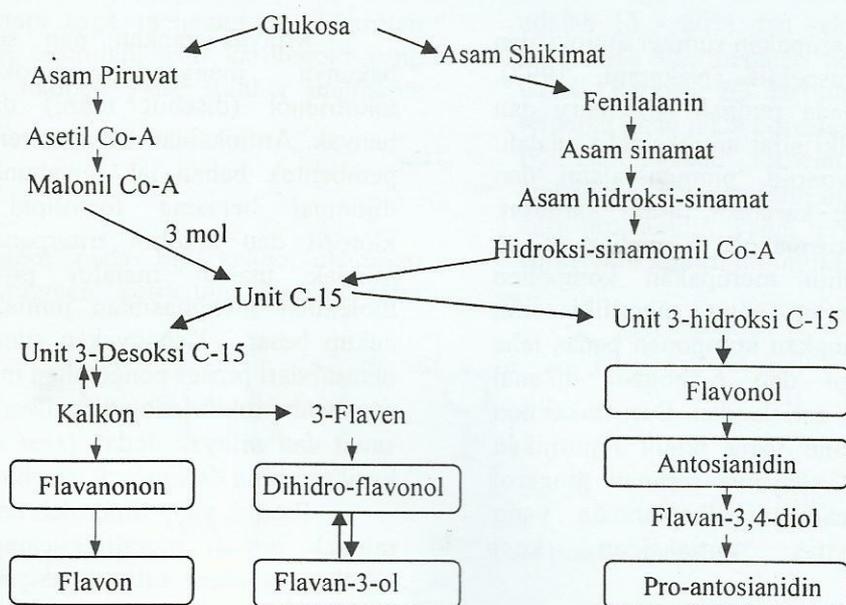
Flavonoid memiliki manfaat farmakologis dan biokemis berupa anti peradangan, anti alergi, anti mikroba, pelindung hati (*hepatoprotective*), anti virus, anti karsinogen. Manfaat farmakologis dan biokemis ditentukan oleh fungsi antioksidan dan mekanisme kerja modifikasi enzim yang dimiliki oleh flavonoid (Middleton and Kandaswami, 1993). Flavonoid memiliki beragam mekanisme kerja, meliputi pengikatan radikal dan pembentukan kompleks ion logam.



Gambar 2. Struktur kimia flavonoid (sumber: Harborne, 1988)

Banyak penelitian telah membuktikan bahwa flavonoid memiliki lebih banyak group hidroksil yang memiliki posisi *ortho* terhadap group lainnya, sehingga flavonoid memiliki efektivitas antioksidan yang lebih baik. Cincin B flavonoid berisi lebih banyak elektron dari pada cincin A dan C. Hal ini mengakibatkan cincin B lebih mudah diserang oleh radikal. Cincin A terbentuk dari hasil biosintesis

melalui kondensasi dari 3 mol malonil-CoA yang diturunkan dari metabolisme glukosa. Cincin C dan B juga diturunkan dari mekanisme glukosa dengan cara jalur shikimat dan jalur fenilpropanoid, masing-masing akan menghasilkan asam dengan rantai karbon C-9 misalnya: sinamat, hidroksi-sinamat, dan kumarat (Rhodes, 1998). Ringkasan biosintesis flavonoid ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Skema dasar biosintesis dan interkoneksi flavonoid (sumber: Rhodes, 1998)

SUMBER ANTIOKSIDAN ALAMI

Bahan pangan yang potensial dijadikan sumber antioksidan alami antara lain: rempah, dedaunan, teh, kakao, sereal, buah, sayuran dan tumbuhan laut (*Gelidiopsis* sp.). Bahan pangan ini mengandung antioksidan, seperti asam amino, asam askorbat, flavonoid, tokoferol, karotenoid, tanin, peptida, melanoidin, produk reduksi, dan asam organik lain (Pratt, 1992).

Buah, sayuran, sereal, kacang-kacangan, minyak (utamanya zaitun), biji-bijian penghasil minyak, dan teh telah diteliti secara luas. Komponen antioksidan pada sumber tersebut adalah senyawa polifenol (asam fenol, flavonoid), antosianidin, tokol, fosfolipid, karotenoid, asam askorbat, kalkon dan beberapa asam amino (Hakkinen *et al*, 1999). Berbagai tumbuhan yang merupakan sumber komersial antioksidan alami ditunjukkan pada Tabel 1.

Table 1. Antioksidan Alami dalam berbagai sumber tumbuhan komersil^{*)}

| No | Sumber bahan | Contoh | Jenis Antioksidan |
|----|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| 1 | Minyak sayur | Minyak kedelai | Tokoferol |
| 2 | Minyak goreng | Minyak Sawit | Tokotrienol, Karotenoid |
| 3 | Tanaman obat dan rempah | Rosemary dan Saga | Fenol kompleks |
| 4 | Sereal | Gandum | Flavonoid |
| 5 | Kacang-kacangan | Kedelai | Isoflavon |
| 6 | Minyak biji-bijian | Minyak biji bunga matahari | Asam Fenolik dan Fenil-propanoid |
| 7 | The | Teh hijau | Katekin dan Polifenol |
| 8 | Kulit buah dan biji-bijian | Kulit buah dan biji anggur | Polifenol dan Tanin |

^{*)}Sumber: Ho *et al*, 1994 dan Shahidi, 1997

Rempah

Rempah merupakan sumber antioksidan yang sangat prospektif (Nakatani, 1997). Senyawa aktif pada rempah (rosemary dan saga) yang memiliki sifat antioksidatif adalah: asam fenol, flavonoid, pigmen alami dan terpen (rosmanol, karnosol, asam karnosat, epirosmanol, isorosmanol) (Cuvelier *et al*, 1994). Kurkumin merupakan komponen utama pada kunyit yang memiliki sifat antioksidan. Sedangkan komponen pedas jahe seperti 6-gingerol dan 6-shogaol dikenal memiliki aktivitas antioksidan. Dari fraksi non volatil ekstrak jahe yang telah dimurnikan ditemukan empat senyawa turunan gingerol dan empat macam diarilheptanoida yang memiliki aktivitas antioksidan kuat (Nakatani, 1992)

Serealia

Sumber antioksidan dari serealia antara lain adalah kedelai (*Glycine max L.*) yang memiliki kandungan senyawa fenolik. Senyawa fenol utama pada kedelai adalah flavonoid dari jenis isoflavon. Disamping kandungan isoflavon, kedelai dan produk-produk kedelai juga mengandung senyawa antioksidan yang merupakan golongan dari turunan asam sinamat, fosfolipida, tokoferol, asam amino dan peptida (Shahidi and Nacz, 1995).

Kacang tanah (*Arachis hypogea*) merupakan sumber antioksidan alami jenis taksifolin. Kandungan antioksidan paling tinggi ditemukan pada bagian daun dan akar. Dalam proses ekstraksinya ditemukan bahwa aktivitas antioksidan produk ekstrak meningkat dengan peningkatan polaritas pelarut yang digunakan, kecuali untuk pelarut metanol (Green, 2004).

Biji kapas juga merupakan sumber antioksidan alami berupa flavonoid, yaitu jenis aglikon-flavonol (quersetin, kaemferol, gosipetin dan herasetin) dan flavonol-glikosida (quersetin dan isoquersetin) (Pratt, 1992). Pada wijen (*Sesamum indicum*) terdapat antioksidan sesamin, sesamol dan sesamol. Sementara dari biji bunga matahari diperoleh antioksidan alami turunan asam sinamat, yaitu asam klorogenat dan asam kafeat (Shahidi and Nacz, 1995).

Minyak Makan

Minyak makan dan sumber bahan bakunya mengandung tokoferol dan tokotrienol (disebut tokol) dalam jumlah banyak. Antioksidan tersebut terdapat sebagai pembentuk bahan tak tersabunkan dan bisa dijumpai bersama fosfolipid, karotenoid, klorofil dan alkohol triterpen. Deodorisasi minyak makan melalui proses distilasi molekular menghasilkan jumlah tokol yang cukup besar. Kebanyakan sumber tokoferol berasal dari proses pengolahan minyak kedelai, sementara tokotrienol dihasilkan dari minyak sawit dan minyak dedak (*rice bran oil*) atau hasil samping dari proses tersebut.

Produk yang diperoleh dari pengolahan minyak makan memiliki campuran isomer tokol yang dapat diformulasi sebagai bentuk kering atau *dispersible* 100% dan dapat disuspensikan dalam air sebelum ditambahkan pada bahan makanan. Tokoferol, walaupun terdapat dalam jumlah yang lebih rendah dalam minyak, merupakan komponen utama tokol dari minyak sawit dan minyak biji-bijian. Di sisi lain, tokotrienol memiliki aktivitas vitamin yang lebih rendah, tetapi memiliki daya antioksidan yang lebih baik daripada tokoferol secara *in-vitro*.

Teh

Berbagai penelitian telah membuktikan komponen aktif biologis pada ekstrak teh (epikatekin, epikatekin galat, epigalokatekin, epigalokatekin galat) memiliki kemampuan yang kuat menangkap radikal bebas secara *in vivo* (Yang *et al*, 2000). Teh hijau tanpa fermentasi mengandung minimum 25% katekin, yang didominasi oleh epigalokatekin galat (48-55%), epigalokatekin dan epikatekin galat (masing-masing 9-12%), epikatekin (5-7%), galokatekin (3.5%), katekin (0.3-0.6%) dan asam galat (0.3-0.5%). Aktivitas antioksidan dari ekstrak teh hijau biasanya lebih besar dari aktivitas antioksidan tokoferol.

Sayuran

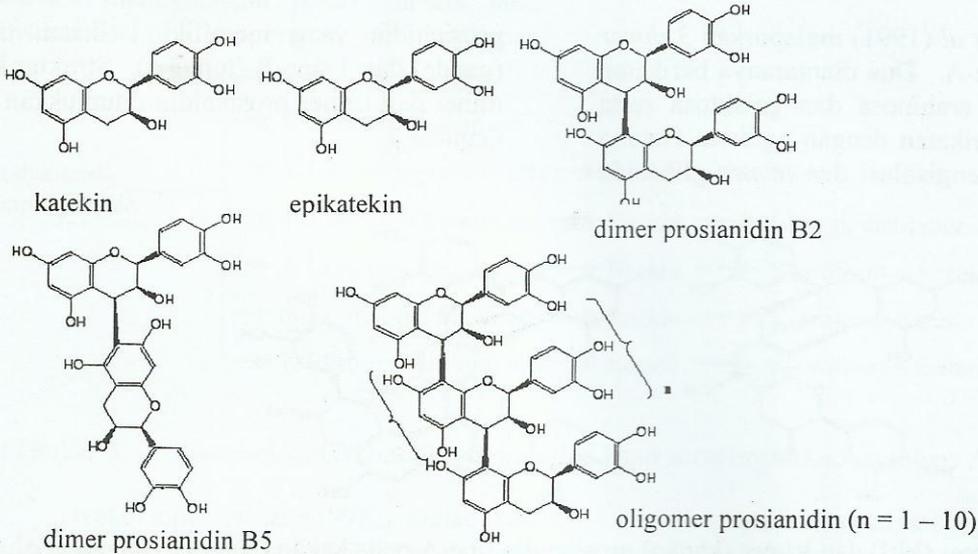
Karotenoid, utamanya β -karoten, dapat diproduksi secara komersial dari wortel dan yam. Karotenoid merupakan *scavenger* yang sangat kuat terhadap 1O_2 . Oleh karena itu β -karoten sering digunakan dalam makanan yang terekspose terhadap cahaya, seperti minyak

sayur dalam kemasan transparan. Minyak sawit merah didominasi oleh α -karoten (0.25%), tetapi juga mengandung β -karoten (0.04%) dan sejumlah kecil karotenoid yang lain seperti likopen yang sumber utamanya adalah tomat.

Kakao

Polifenol pada biji kakao disimpan dalam sel pigmen kotiledon. Jumlah total

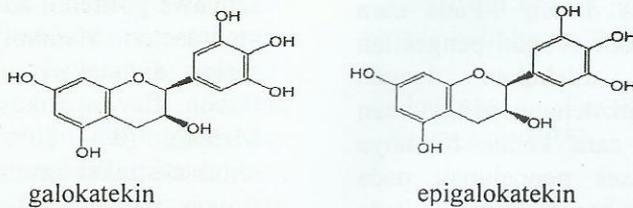
polifenol terlarut yang ditemukan dalam biji kakao segar bebas lemak jenis Foretero adalah 15 - 20% dan sekitar 5% dalam biji yang telah difermentasi. Sedangkan pada jenis Criollo berkisar 2/3 dari jumlah polifenol yang terdapat pada jenis Foretero (Wollgast, 2004). Polifenol kakao terbentuk utamanya dari epikatekin, katekin serta oligomer dan polimer dari prosianidin yang tersusun oleh subunit epikatekin seperti ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Polifenol utama yang terdapat pada *Theobroma cacao* (sumber:Forsyth, 1955)

Porter *et al* (1991) mengidentifikasi oligomer prosianidin tersusun utamanya oleh sub unit epikatekin. Hammerstone *et al* (1999) menguraikan prosianidin ke dalam 12 subunit dalam biji kakao yang tidak difermentasi.

Keberadaan sejumlah kecil galokatekin dan epigalokatekin yang umumnya ditemukan pada teh (Zeeb *et al*, 2000), juga dilaporkan terdapat pada biji kakao seperti ditunjukkan pada Gambar 5.



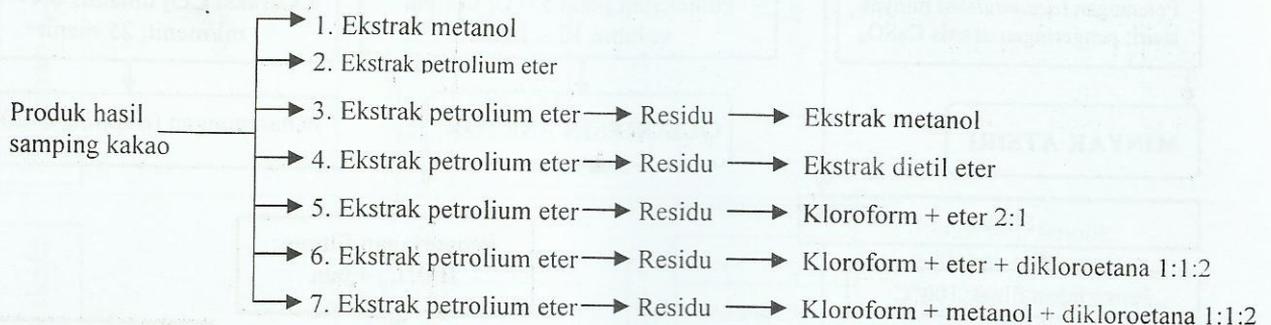
Gambar 5. Katekin yang terdapat dalam jumlah kecil pada biji kakao (sumber:Forsyth, 1955)

Hasil-hasil penelitian juga membuktikan adanya sejumlah kecil glikosida flavonoid dalam bentuk turunan quersetin dan asam hidroksi-sinamat (khususnya asam klorogenat) di dalam biji kotiledon, seperti ditunjukkan pada Gambar 6. Sanchez *et al* (2003) melaporkan adanya flavonoid tambahan pada bubuk kakao meliputi: naringenin, luteolin, apigenin dan sebagian glukosida dari

senyawa tersebut. Berbeda dengan hal tersebut, Sanbongi *et al* (1998) mengisolasi tambahan turunan asam hidroksi-sinamat dengan jumlah yang sebanding dengan glikosida quersetin. Turunan asam rosmarinat yang diisolasi dari *cocoa liquor* menunjukkan juga aktivitas antioksidan *in vitro* seperti katekin atau quersetin.

memiliki keuntungan: (1) lebih efisien dibandingkan dengan teknik ekstraksi dengan pelarut organik, karena penggunaan pelarut organik lebih sedikit, (2) dapat meningkatkan kemurnian ekstrak antioksidan. Sedangkan kelemahannya adalah: (1) kemungkinan terjadinya kerusakan membran yang dapat menggagalkan proses (2) waktu proses lama karena proses separasi harus dilakukan berulang-ulang.

Faktor yang mempengaruhi efisiensi ekstraksi menggunakan pelarut antara lain: jenis pelarut, pH, temperatur, jumlah tahapan



Gambar 8. Skema ekstraksi antioksidan produk hasil samping kakao (sumber: Azízah *et al*, 1999)

Dapkevicius *et al* (1998), melakukan penelitian ekstraksi antioksidan yang bersumber dari tumbuhan herbal aromatik, untuk memperoleh sumber antioksidan potensial dan melakukan isolasi serta *screening* terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Diagram alir proses ekstraksi, isolasi dan *screening*, ditunjukkan pada Gambar 9.

Shi *et al* (2003) meneliti optimalisasi ekstraksi polifenol dari biji anggur. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa rendemen ekstraksi fenol dipengaruhi oleh konsentrasi etanol dalam air, perbandingan larutan etanol/air terhadap biji anggur kering, suhu dan waktu ekstraksi. Penambahan konsentrasi etanol meningkatkan efisiensi ekstraksi dan mencapai maksimum pada konsentrasi 50%. Pada suhu konstan, ekstraksi lebih dari 1.5 jam dapat mengurangi rendemen ekstraksi. Rendemen ekstraksi dapat berkurang jika perbandingan larutan etanol/air terhadap biji anggur kering lebih besar dari 7,5:1, utamanya pada suhu lebih tinggi. Kondisi optimum ekstraksi yang direkomendasikan pada skala laboratorium adalah: (1) ekstraksi dilakukan 2 tahap pada suhu 65°C (2) nisbah etanol 50% terhadap biji anggur 7,5:1 dan (3) lama waktu ekstraksi setiap tahap 1.5 jam.

ekstraksi dan volume pelarut, serta ukuran dan bentuk partikel sampel. Sripad *et al* (1982) melakukan penelitian ekstraksi polifenol dari biji bunga matahari. Hasil penelitian menunjukkan adanya pengaruh yang cukup signifikan dari pH, suhu ekstraksi, dan jenis pelarut, terhadap hasil ekstraksi polifenol. Penelitian ekstraksi antioksidan menggunakan pelarut dilakukan oleh Azizah *et al* (1999), dengan skema proses ekstraksi ditunjukkan pada Gambar 8.

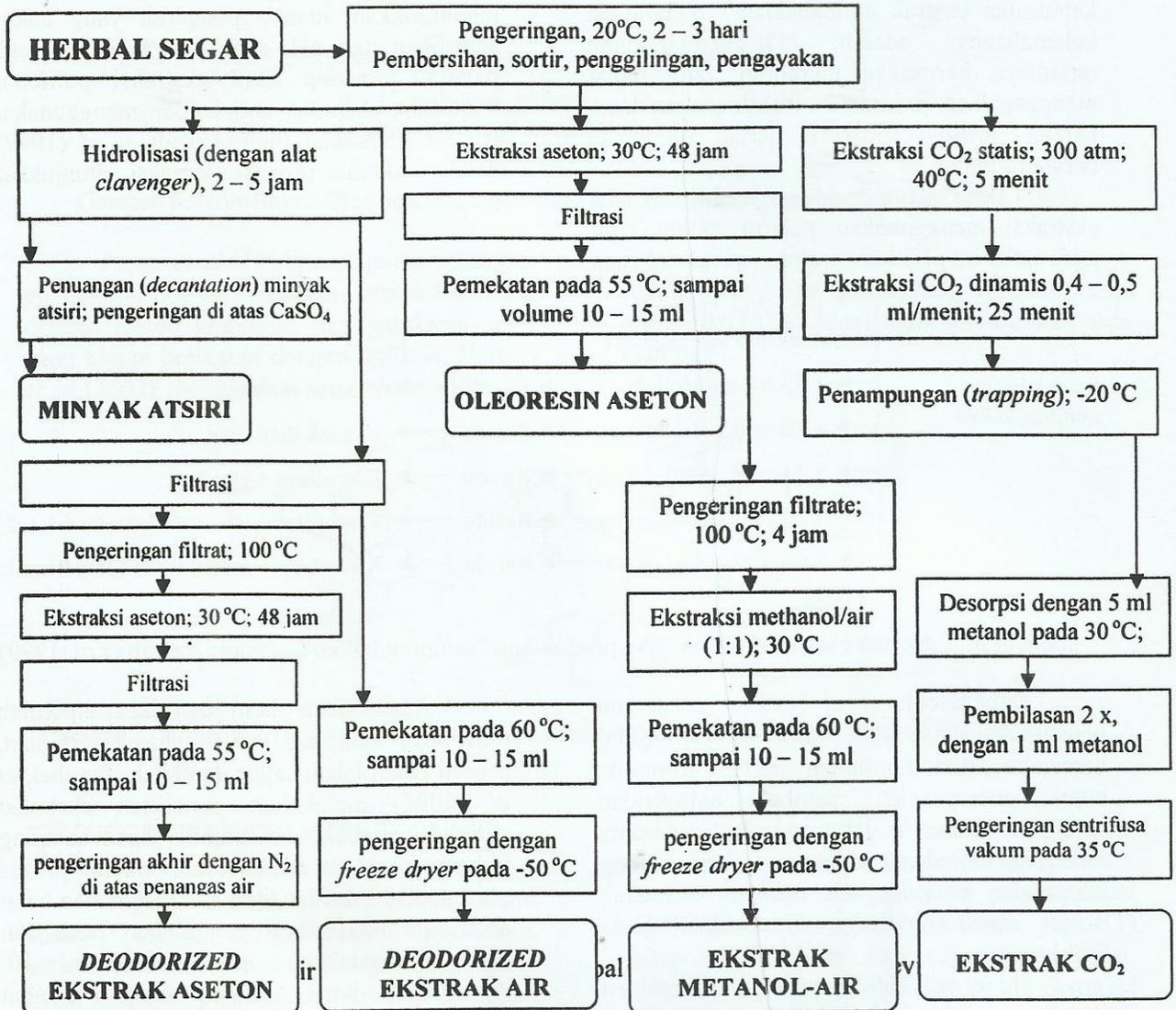
Antioksidan alami juga dapat diperoleh dari hasil samping industri hasil pertanian, seperti pengolahan sayur dan buah. Peschel, *et al* (2006) melakukan penelitian ekstraksi antioksidan alami dari sumber hasil samping industri jus buah dan sayuran. Skema proses ekstraksi antioksidan alami dengan bahan baku hasil samping industri pengolahan buah dan sayur ditunjukkan pada Gambar 10. Penggunaan hasil samping didukung oleh kenyataan bahwa polifenol utamanya terdapat pada kulit buah (Wolfe, Wu, & Liu, 2003).

Ekstraksi Fase-Padatan (*Solid-Phase Extraction/SPE*)

Metode ekstraksi SPE merupakan metode yang lebih cepat, mudah, dan ekonomis dibandingkan dengan metode ekstraksi menggunakan pelarut, disebabkan dengan metode SPE kebutuhan pelarut akan berkurang. Metode SPE biasanya digunakan untuk mengekstrak bahan yang terdapat dalam jaringan berbentuk cairan (*matrix liquid*). Metode SPE juga dapat digunakan untuk melengkapi proses ekstraksi menggunakan pelarut. Apabila produk akhir ekstraksi menggunakan pelarut berbentuk cairan (*matrix liquid*), maka Metode SPE dapat digunakan

untuk melanjutkan proses ekstraksi sehingga rendemen yang diperoleh lebih tinggi dan

produk menjadi lebih murni.

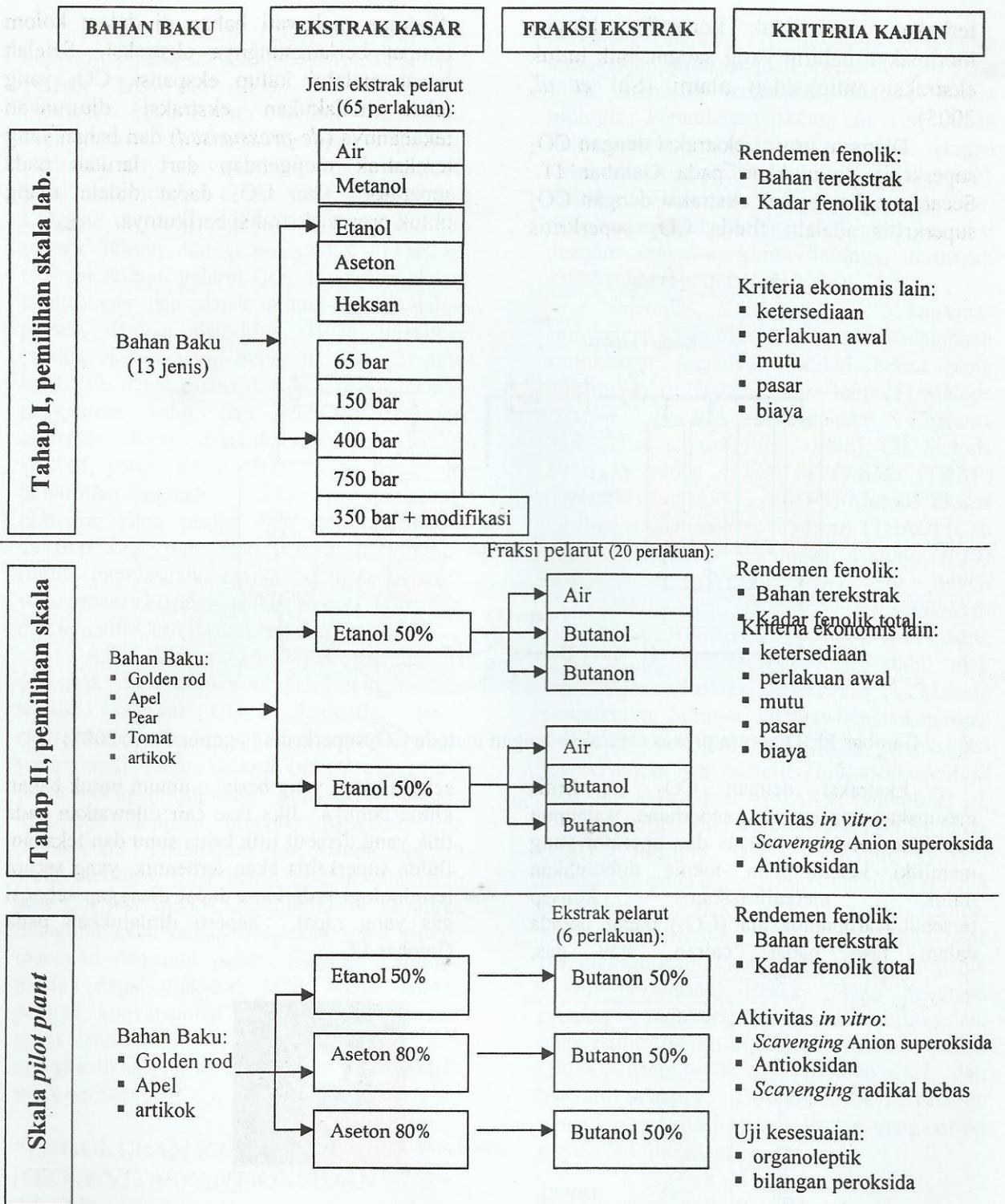


Metode SPE juga dapat digunakan untuk tujuan pemurnian/fraksinasi dan untuk proses pemekatan awal (*pre-concentration*) antioksidan alami.

Metode SPE kurang efektif untuk mengekstrak senyawa yang berada dalam jaringan padatan suatu suspensi (*matrix solid*). Misalnya Metode SPE kurang efektif untuk mengekstrak jus yang mengandung flavonoid, dimana sebagian besar flavonoid berada pada padatan yang tersuspensi di dalam jus (Bailon and Buelga, 2005). Dalam hal ini metode ekstraksi menggunakan pelarut menjadi pilihan yang lebih tepat.

Metode SPE menggunakan *cartridge* dengan atom C-18 telah banyak digunakan untuk proses ekstraksi selektif asam fenolik

dan flavonoid dari sumber bahan baku jus jeruk, anggur, apel, dan *cranberry*. Terdapat dua faktor yang perlu diperhatikan dalam penggunaan *cartridge* C-18, yaitu: daya muat karbon (*carbon loading*) dan ukuran pori. Ukuran pori yang lebih besar dapat meningkatkan kapasitas retensi (*retention capacity*) dikarenakan terdapat interaksi yang lebih kuat antara permukaan non-polar dengan asam fenolik. Demikian juga, peningkatan daya muat karbon akan meningkatkan kapasitas *cartridge* sehingga menghasilkan daya retensi yang lebih besar terhadap asam fenolik terionisasi (*ionized*) (Bailon and Buelga, 2005).



Gambar 10. Skema ekstraksi antioksidan dari hasil samping pengolahan buah/sayur (sumber: Peschel *et al*, 2006)

Ekstraksi dengan CO₂ Superkritis

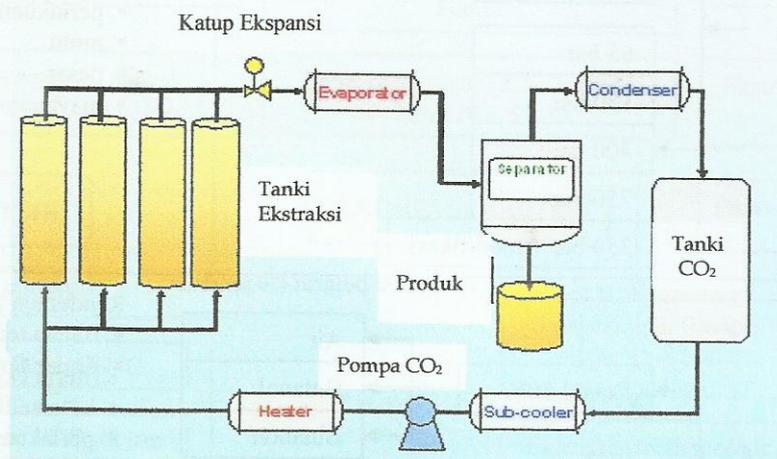
Ekstraksi dengan CO₂ superkritis memiliki kelebihan antara lain: CO₂ merupakan bahan kimia yang tidak mudah bereaksi, memiliki sifat toksitas yang sangat rendah, tidak menimbulkan masalah polusi,

dan memiliki waktu konsentrasi yang rendah (Ford, 2007). Dibandingkan dengan teknik ekstraksi lain (ekstraksi menggunakan pelarut, fase padatan, dan UF), teknik ekstraksi dengan fluida superkritis memiliki kelebihan dalam hal: CO₂ lebih murah, tidak beracun, tidak mudah

terbakar, dan tidak korosif, sehingga merupakan pelarut yang sangat baik untuk ekstraksi antioksidan alami (Shi *et al*, 2005).

Diagram proses ekstraksi dengan CO₂ superkritis ditunjukkan pada Gambar 11. Secara ringkas proses ekstraksi dengan CO₂ superkritis adalah: fluida CO₂ superkritis

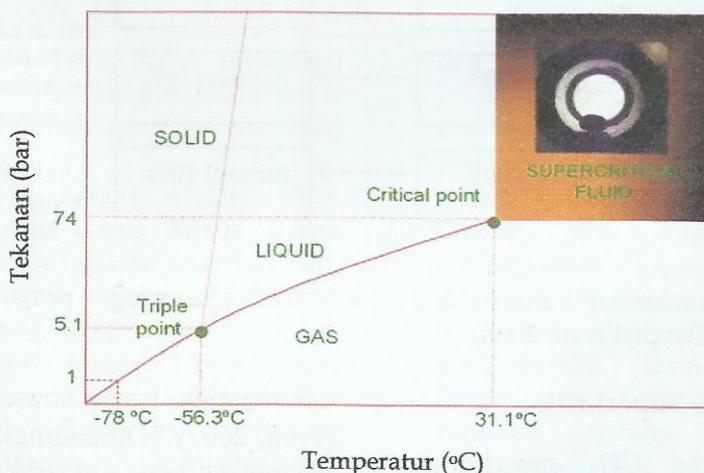
dipompa melewati bahan di dalam kolom tempat berlangsungnya ekstraksi. Setelah lewat melalui katup ekspansi, CO₂ yang telah melakukan ekstraksi diturunkan tekanannya (*de-pressurised*) dan bahan yang terekstrak mengendap dari larutan pada separator. Gas CO₂ dapat didaur ulang untuk proses ekstraksi berikutnya.



Gambar 11. Diagram proses ekstraksi dengan metode CO₂ superkritis (sumber:Ford, 2007)

Ekstraksi dengan CO₂ superkritis merupakan konsep yang sederhana, walaupun demikian peralatan khusus dan operator yang memiliki keterampilan teknis dibutuhkan untuk merealisasikan konsep tersebut. Karbondioksida (CO₂) dapat berada dalam fase padat, cairan, atau gas,

sebagaimana yang berlaku umum untuk bahan kimia lainnya. Jika fase cair dilewatkan pada titik yang disebut titik kritis suhu dan tekanan, fluida superkritis akan terbentuk, yang secara terminologi sederhana dapat dianggap sebagai gas yang rapat, seperti ditunjukkan pada Gambar 12.



Gambar12. Diagram fase CO₂ murni (padat, cair, gas dan fluida superkritis) (sumber:Ford, 2007)

Karbon dioksida (CO₂) cair dan CO₂ superkritik sama-sama dapat bertindak sebagai pelarut. CO₂ cair sangat baik melarutkan molekul kecil yang relatif non-polar, sedangkan CO₂ superkritik memungkinkan ekstraksi senyawa yang lebih besar dan lebih polar. Ada dua hal utama yang membedakan CO₂ cair dan CO₂ superkritik dari pelarut lain seperti heksan dan etanol, yaitu: (1) setelah ekstraksi selesai, pelarut CO₂ dilepaskan dalam bentuk gas dan dapat didaur ulang dalam proses, dengan demikian dapat dihasilkan produk ekstrak yang bebas pelarut, (2) daya larut CO₂ dapat diatur dengan mudah melalui pengaturan suhu dan tekanan, sehingga ekstraksi dapat dilakukan dengan sangat selektif, yang sangat mengurangi kebutuhan pemurnian lanjutan. Faktor optimasi proses ekstraksi yang perlu diperhatikan meliputi: densitas CO₂, jenis dan persentase *modifier* (untuk menyesuaikan nilai polaritas pelarut), suhu proses ekstraksi, waktu ekstraksi dinamis, dan laju alir CO₂ (Bailon and Buelga, 2005).

Asam karnosat dapat dengan mudah diekstrak dari rempah-rempah menggunakan teknik ekstraksi CO₂ superkritik. Hasil ekstraksi mengandung kadar asam karnosat yang tinggi dalam pelarut bebas resin, yang dapat dengan mudah dideodorisasi dan dicampur dengan minyak pengikat jika dibutuhkan. Disamping itu, bahan rempah yang diekstrak juga bebas pelarut dan telah dideodorisasi oleh CO₂ superkritik sehingga menghilangkan bahan beraroma yang mudah menguap dan non polar. Dengan demikian produk dapat diekstrak lebih lanjut dengan pelarut konvensional untuk menghilangkan asam rosmarinat yang lebih polar, dan menghasilkan produk antioksidan yang hampir tidak berbau.

PENGUKURAN KAPASITAS (EFEKTIVITAS) ANTIOKSIDAN ALAMI

Berbagai metode pengukuran kapasitas antioksidan telah dikembangkan, baik terhadap senyawa murni antioksidan maupun dalam bentuk ekstrak. Metode pengukuran didasarkan pada mekanisme kerja antioksidan, antara lain: mekanisme kerja pengikatan (*scavenging*) oksigen dan radikal hidroksil, reduksi radikal peroksil lemak, pengkelatan (*chelating*) ion logam, maupun penghambatan peroksidasi lemak. Perlu diperhatikan bahwa penelitian

berkaitan dengan pengukuran kapasitas antioksidan, dilaksanakan secara *in vitro* yang tidak memiliki kesamaan dengan sistem biologis. Pengukuran secara *in vitro* tidak memberikan data berkaitan dengan ketersediaan biologis (*bioavailability*), distribusi dan penyimpanan (*retention*) antioksidan oleh jaringan sel atau interaksi dengan senyawa kimia lainnya, termasuk antioksidan (Huang *et al*, 2005).

Metode pengukuran kapasitas antioksidan yang didasarkan pada kemampuan antioksidan mengikat radikal bebas yang dibentuk oleh sistem, antara lain: (1) Metode *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) (Cao and Prior, 1998), (2) Metode *Total Reducing Ability of Plasma* (TRAP) (Ghiselli *et al*, 1995), dan (3) Metode *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) (Cao and Prior, 1998). Sedangkan Metode *DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan *ABTS* (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) didasarkan pada mekanisme kerja pengikatan radikal bebas stabil oleh antioksidan (Re *et al*, 1999). Metode pengukuran lainnya mengevaluasi kapasitas antioksidan dengan menghitung peroksidasi lemak, antara lain: Metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) (Plumb *et al*, 1996) dan Metode *Oxidative Stability Index* (OSI) (Firestone, 1992). Metode TBARS didasarkan pada pengukuran kuantitatif produk peroksidasi lemak seperti malenaldehid, sedangkan Metode OSI didasarkan pada pengukuran produk dekomposisi asam organik volatil (Firestone, 1992). Dari beberapa metode pengukuran kapasitas antioksidan, yang paling umum digunakan adalah: Metode ORAC, Metode TEAC, Metode OSI, dan Metode DPPH (Green, 2004). Metode pengukuran kapasitas antioksidan yang sering digunakan diuraikan berikut ini:

Metode *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC)

Pengukuran kapasitas antioksidan dengan metode ORAC, memberikan kemudahan untuk memperoleh jumlah total seluruh komponen dalam sampel yang memberikan kontribusi terhadap pengukuran kapasitas antioksidan. Kebanyakan metode uji terhadap *inhibitor* melibatkan pro-oksidan atau spesies reaktif dan substrat yang dapat dioksidasi. Pro-oksidan atau spesies reaktif,

mengakibatkan kerusakan oksidatif terhadap substrat. Kerusakan ini dapat dihambat dengan memasukkan antioksidan ke dalam sistem reaksi. Penghambatan oleh antioksidan ini diukur dan dinyatakan sebagai kapasitas antioksidan (Niki, 2002). Metode ORAC mengukur penghambatan oleh antioksidan terhadap propagasi radikal peroksil ($\text{ROO}\bullet$) sebagai pro-oksidan, yang dihasilkan dari AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propan) dihidroklorida), yang merupakan indikasi dari transfer atom hidrogen (Ghiselli *et al*, 1995).

Pada pengukuran dengan metode ORAC, radikal peroksil bereaksi dengan *probe* yang memiliki kemampuan fluoresensi untuk menghasilkan produk yang tidak berfluoresensi. Proses reaksi ini dapat dengan mudah diukur berdasarkan tingkat fluoresensi. Kapasitas antioksidan ditetapkan dengan mengukur penurunan laju dan jumlah produk fluoresen yang dibentuk selama reaksi. Mekanisme reaksi oksidasi fluoresen ditunjukkan pada Gambar 13. Dibandingkan dengan metode pengukuran kapasitas antioksidan lainnya yang hanya dapat mengevaluasi aktivitas antioksidan pada *lag phase* saja, metode ORAC menunjukkan area di bawah kurva, yang menunjukkan masing-masing nilai laju awal reaksi, *lag time* dan total penghambatan. Nilai ORAC tersebut biasanya dinyatakan sebagai *Trolox equivalent*.

Walaupun prinsip kimia yang melatarbelakangi metode ORAC tidak berubah, berbagai modifikasi dan penyempurnaan telah dibuat. *Probe* protein fluoresen awal yaitu β -phyco erythrin (β -PE), digantikan dengan fluoresen 6-karboksifluoresein (diklorofluoresein) (Huang *et al*, 2002). Hal ini disebabkan β -PE menunjukkan variabilitas dari satu sampel ke sampel lainnya, terjadi *photobleached* apabila diekspose terhadap cahaya yang dapat mengakibatkan eksitasi, dan berikatan secara tidak spesifik dengan beberapa polifenol. Dengan demikian penggunaan β -PE dapat mengarah kepada hasil yang tidak akurat. Fluoresein berbeda dengan β -PE, tidak berinteraksi dengan antioksidan, memiliki sifat *photostable* dan dapat mengurangi biaya pengujian.

Metode ORAC pada awalnya dirancang untuk mengukur kapasitas antioksidan pemecah rantai hidrofilik (larut dalam air dan relatif polar) dalam menghambat radikal peroksil. Modifikasi dan validasi metode

ORAC awal telah dilakukan untuk mengukur nilai ORAC dari antioksidan lipofilik (larut dalam lemak dan relatif non-polar) seperti β -karoten. Modifikasi yang dilakukan berupa penambahan *methylated* β -siklodekstrin untuk memperkaya kelarutan antioksidan lipofilik (Huang *et al*, 2002). Modifikasi lanjutan metode ORAC mengarah pada pengembangan cara pengukuran tambahan untuk menetapkan aktivitas pengikatan terhadap pro-oksidan lain, seperti peroksinitrit (ONOO^-), hidroksil (OH^-) dan superoksida (O_2^-). Ketiga pengembangan metode tersebut dikenal sebagai metode NORAC (untuk peroksinitrit), HORAC (untuk hidroksil), dan SORAC (untuk superoksida) (Ou *et al*, 2002).

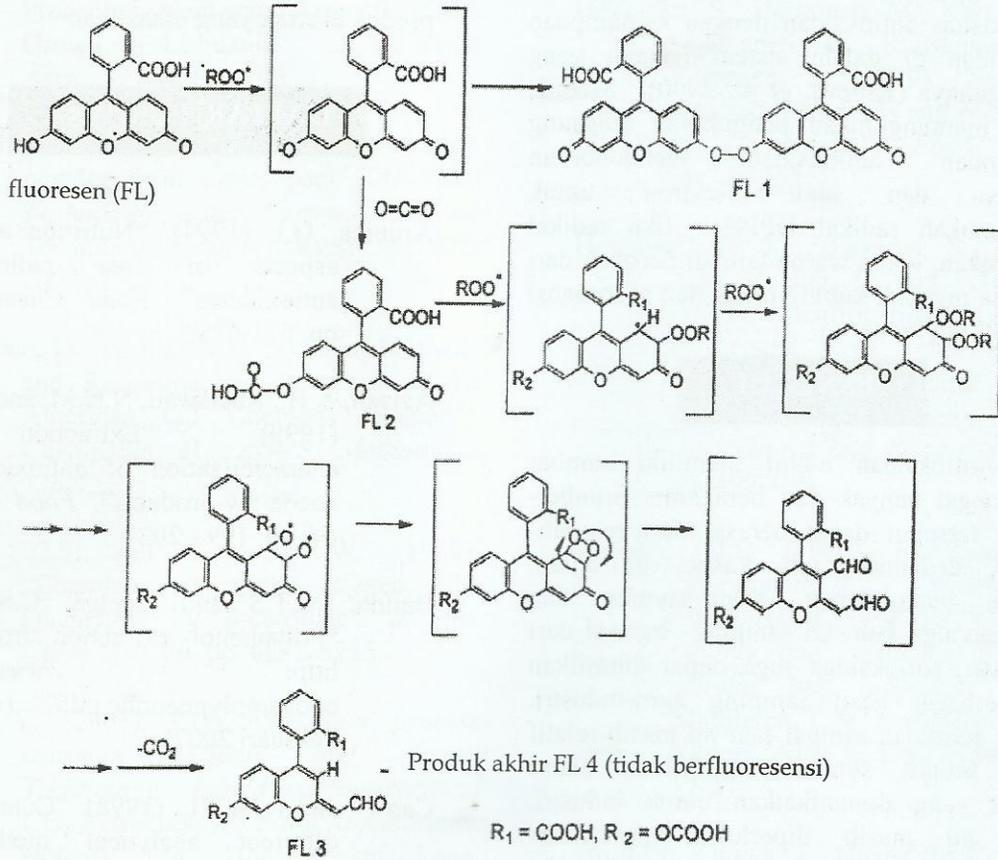
Metode ORAC memiliki keuntungan: (1) memberikan sumber radikal yang dapat dikendalikan yang secara akurat menggambarkan model sistem pangan dan fisiologis; (2) dapat dengan mudah diadaptasi untuk mendeteksi antioksidan hidrofilik dan lipofilik dengan merubah sumber radikal dan pelarut; (3) mudah diotomasi dan dapat diadaptasi untuk analisis dengan kapasitas tinggi. Disamping memiliki keuntungan, metode ORAC memiliki kelemahan yaitu: (1) variabilitas suhu, (2) kebutuhan peralatan khusus (fluorometer) dan (3) waktu analisis yang lama.

Metode *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC)

Sama halnya dengan Metode ORAC, Metode TEAC didasarkan pada nilai penghambatan radikal bebas. Secara ringkas proses pengukuran kapasitas antioksidan dilakukan dengan menambahkan sampel pada sistem yang memiliki radikal bebas, kemudian nilai penghambatan proses reaksi radikal bebas diukur sebagai nilai kapasitas antioksidan. Metode TEAC dikembangkan berdasarkan adanya penekanan (*suppression*) absorbansi dari kation radikal 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin 6-sulfonat) (ABTS) oleh antioksidan dalam sample uji. Penekanan absorbansi ini terjadi apabila ABTS diinkubasi dengan peroksidase (*metmyoglobin*) dan H_2O_2 . Jika waktu inkubasi tercapai, maka antioksidan yang ditambahkan pada sistem dapat menghambat radikal ABTS (Cao and Prior, 1998). Lebih lanjut disebutkan, pada proses pengukuran kapasitas antioksidan, campuran

pereaksi yang terdiri dari 20 μL H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$), 100 μL *metmyoglobin* (6.1 $\mu\text{mol/L}$), ABTS (610 $\mu\text{mol/L}$), dan 4 μL Trolox, diinkubasikan pada sistem dan dilakukan pengamatan dengan spektrofotometer pada 37 $^\circ\text{C}$. Pembentukan radikal ABTS meningkat seiring dengan lama waktu inkubasi sampai

tercapai titik puncak (30 menit). Untuk menghambat radikal ABTS dilakukan penambahan Trolox. Lebih besar konsentrasi Trolox yang ditambahkan pada campuran pereaksi akan meningkatkan penekanan terhadap absorbansi radikal ABTS.



Gambar 13. Jalur oksidasi fluoresen dengan keberadaan AAPH (sumber: Ou *et al*, 2002)

Metode Oxidative Stability Index (OSI)

Metode OSI (Firestone, 1992) dikembangkan untuk mengukur stabilitas alami minyak dan lemak. Metode ini menggunakan sistem minyak yang distandardisasi untuk mengukur aktivitas antioksidan. Penggunaan 10% metil-linoleat dalam campuran silikon dan minyak (w/w) menghasilkan substrat minyak yang distandardisasi (Nakatani, 2001). Minyak alami mengandung berbagai asam lemak tidak jenuh dan antioksidan alami dalam berbagai kadar mengakibatkan terjadinya keragaman diantara berbagai hasil pengukuran aktivitas antioksidan. Untuk mengatasi hal tersebut maka perlu digunakan substrat asam lemak

yang distandardisasi. Kenaikan nilai OSI, menandakan kadar antioksidan yang lebih tinggi atau senyawa antioksidan yang lebih efisien.

Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Metode yang relatif baru untuk mengukur kemampuan mendeteksi pengikat radikal, telah dikembangkan menggunakan spesies radikal bebas stabil seperti radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). DPPH dapat menerima elektron atau radikal hidrogen dari antioksidan dan oleh karenanya kehilangan absorbansi cahaya pada 515 nm (Brand *et al*, 1995). Model uji radikal seperti

uji pengikatan DPPH merupakan uji sederhana, cepat, dan *reproducible*, serta mekanisme kerjanya diketahui dengan jelas. Hal tersebut menyebabkan uji dengan Metode DPPH merupakan uji yang disukai, misalnya untuk *screening* pendahuluan terhadap contoh uji yang banyak. Kelemahan Metode DPPH adalah kurangnya keterkaitan langsung hasil uji kapasitas antioksidan dengan kemampuan antioksidan di dalam sistem pangan yang sesungguhnya (Koleva, *et al*, 2000). Metode DPPH memungkinkan pengukuran langsung kemampuan antioksidan mendonorkan hidrogen dan atau elektron untuk memadamkan radikal DPPH. Jika radikal dipadamkan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning muda dan absorbansi pada 515 nm menurun.

PENUTUP

Antioksidan alami memiliki sumber yang sangat banyak dan beragam. Sumber-sumber tersebut dapat berasal dari rempah-rempah, dedaunan, teh, kakao, biji-bijian, sereal, buah-buahan, sayur-sayuran dan tumbuhan/alga laut. Di samping berasal dari tumbuhan, antioksidan juga dapat dihasilkan dari berbagai hasil samping agro-industri. Namun demikian sampai saat ini masih relatif sangat sedikit sumber antioksidan alami tersebut yang dimanfaatkan untuk industri. Untuk itu masih diperlukan penelitian-penelitian berkaitan dengan sifat-sifat antioksidan alami, teknologi ekstraksi/isolasi, dan penggunaannya secara komersial pada dunia industri. Penelitian berkaitan dengan sumber antioksidan alami kebanyakan merupakan penelitian dari luar negeri. Dengan demikian tumbuhan yang dijadikan objek penelitian sebagian besar merupakan tumbuhan yang ada di luar negeri. Untuk itu masih perlu dilakukan penelitian yang berkaitan dengan upaya pencarian sumber antioksidan potensial berbasis tumbuhan asli Indonesia. Pemanfaatan hasil samping industri pengolahan pangan sebagai sumber antioksidan perlu diteliti lebih jauh. Hal ini dapat memberikan keuntungan ganda dalam hal biaya bahan baku yang relatif lebih murah dan sekaligus membantu mengurangi pencemaran lingkungan yang diakibatkan hasil samping industri.

Hasil kajian terhadap berbagai literatur dapat disebutkan bahwa ekstraksi dengan

teknik fluida superkritis merupakan teknik ekstraksi yang lebih baik, yang perlu diteliti dan dikembangkan agar dapat digunakan secara efisien dalam proses ekstraksi antioksidan alami. Perlu dilakukan penelitian pemanfaatan teknologi ekstraksi CO₂ superkritis, sehingga diperoleh kondisi proses yang efisien, baik dari segi biaya maupun mutu produk ekstrak yang dihasilkan

DAFTAR PUSTAKA

- Aruoma, O.I. (1994). "Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants". *Food Chem.Toxic.*32: pp. 671-683.
- Azizah, A.H., Ruslawati, N.N.M, and Tee, T.S. (1999). "Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products". *Food Chemistry* 64, pp. 199 - 202
- Bailon, M.T.S and Buelga, C.S. (2005). "Polyphenol extraction from food". <http://www.rsc.org/books/polyphenolic.pdf/>. (akses 12 Pebruari 2007)
- Cao G. and Prior RL. (1998). "Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum". *Clin Chem*; 44, pp.1309-1315
- Coppen, P.P. (1983). "The use of antioxidant". Di dalam: J.C. Allen and R.J Hamilton, editor. *Rancidity in Foods*. Applied Science Publishers, London.
- Chipault, J.R., Mizuno, G.R., and Lundberg, W.O. (1956). "The antioxidant properties of spices in Foods". *Food Technol.* 10: pp. 209-210
- Cuvelier, M.E., Berset, C., and Richard, H. (1994). "Separation of major antioxidants in sage by high performance liquid chromatography". *Sci. Aliment.* 14: pp. 811-815.
- Dapkevicius, A. (2002). *Isolation, identification and evaluation of*

- natural antioxidants from aromatic herbs cultivated in Lithuania*. Thesis: Wageningen University. p.154.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T.A, and Linssen, J.P.H. (1998). "Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from some Aromatic Herbs Grown in Lithuania". *J Sci Food Agric*, 77, pp. 140-146
- Daniells, S. (2006). "Functional anti-oxidant powder from citrus peel". *AP-Food Technology*. [http://www. AP-Food Technology.com/](http://www.AP-FoodTechnology.com/). (akses: 4 Mei 2007)
- Firestone, D. (ed.). (1992). "Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society". Champaign, IL: *AOCS. Method Cd 12b-92*
- Foote, C.S. and Denny, R.W. (1968). "Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by β -carotene". *J. Am. Chem. Soc.* 90: pp. 6233-6235.
- Ford, Y. (2007). *CO₂ Extraction process overview; Clean and Green Technology – Liquid and Supercritical CO₂ Extraction for Food Applications*. Botanix Ltd, Hop Pocket Lane, Paddock Wood, Kent, United Kingdom. <http://www.botanix.co.uk/>. (akses 12 Maret 2007)
- Forsyth, W.G.C. (1955): "Cacao polyphenolic substances. III. Separation and estimation on paper chromatograms". *Biochemical Journal* 60, pp. 108-111.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., and Ferro L.A. (1995). "A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability". *Free Radical Biology & Medicine*. 18, pp. 29-36.
- Green, R.J. (2004). *Antioxidant Activity of Peanut Plant Tissues*, A thesis submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science Department of Food Science, Raleigh
- Halliwell, B., (1995) "Antioxidant characterization; Methodology and mechanism". *Biochem. Pharmacol.* 49: pp.1341-1348.
- Hakkinen, S., Heinonen, M., Karenlampi, S., Mykkanen, H., Ruuskanen, J., and Torronen, R. (1999). "Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries". *Food Res.Int.*32: pp.345-353.
- Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E., Rucker, R. and Schmitz, H.H. (1999). "Identification of procyanidins in cocoa and chocolate using highperformance liquid chromatography/mass spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, pp. 490-496.
- Harborne, J.B. (1988). *Flavonoids in the environment: structure-activity relationships, in Plant flavonoids in biology and medicine; Biochemical, cellular and medicinal properties*. Middleton, C.V. and Harborne, E.J.B. Editors. Alan R. Liss: New York. pp. 17-27.
- Ho, C.T., Osawa, T., Huang, M.T. and Rosen, R.T. (1994). "Food Phytochemicals and Cancer Prevention. II. Teas, Spices and Herbs". ACS Symposium Series 547, American Chemical Society, Washington, DC.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch, W.M., Flanagan, J.A. and Deemer, E.K. (2002). "Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer". *J Agric Food Chem* 50, pp. 1815-1821
- Huang, D., Ou, B., Hampsch, W.M., Flanagan, J.A., and Deemer, E.K. (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assay". *J Agric FoodChem* 53, pp. 1841-1856

- Koleva, I.I., Beek, T.A., Linssen, J.P.H., Groot, A. and Evstatieva, L.N. (2000). "Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods". *Phytochem. Anal* 13: pp. 8-17.
- Larson, R.A. (1997). *Naturally Occurring Antioxidants*. CRC Press LLC, Boca Raton.
- Middleton, E.J. and Kandaswami, C. (1992). "Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions". *Biochem. Pharmacol.*, 43: p. 1167-1179.
- Middleton, E.J. and Kandaswami, C. (1993). "The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer", in *Flavonoids: advances in research since 1986*, J.B. Harborne, Ed. Chapman and Hall. London. p. 619-652.
- Nakatani, N. (1992). "Natural Antioxidants From Spices". Di dalam: M.T. Huang, C.T. Ho, and C.Y. Lee, eds. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health*. American Soc., Washington DC
- Nakatani, N., (1997). "Antioxidants from spices and herbs", in *Natural antioxidants. Chemistry, health effects, and applications*. F. Shahidi, Ed. AOCS Press: Champaign. p. 64-75.
- Nakatani, N., Tachibana, Y. and Kikuzaki, H. (2001). "Establishment of a model substrate oil for antioxidant activity assessment by Oil Stability Index Method". *Journal of AOCS*, 78, 19-23.
- Niki, E. (2002). "Antioxidant activity: are we measuring it correctly?". *Nutrition* 18, 524-5.
- Ou, B., Hampsch, W.M., and Prior, R.L. (2002). "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, pp. 4610-4626.
- Peschel, W., Rabaneda, F.S., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jiménez, D., Ravento. R.L., Buxaderas, S. and Codina, C. (2006). "An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes". *Food Chemistry* 97, pp. 137-150
- Plumb, G.W., Lambert, N., Chambers, S.J., Wanigatunga, S., Heaney, R.K., Plumb, J.A., Aruoma, O.I., Halliwell, B., & Williamson, G. (1996). "Are extracts of purified glucosinolates from cruciferous vegetables antioxidants"? *Free Radical Research*. 25, pp. 75-86.
- Porter, L.J., Ma, Z. and Chan, B.G. (1991). "Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites". *Phytochemistry* 30, pp. 1657-1663.
- Pratt, D.E. 1992. "Natural Antioxidants from Plant Material". Di dalam: M.T. Huang, C.T. Ho, and C.Y. Lee, eds. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health*. American Soc., Washington DC.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice, E.C. (1999). "Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay". *Free Radical Biology and Medicine*. 26, pp. 1231-1237.
- Rhodes, M.J.C. (1998). "Physiological roles of phenolic compounds in plants and their interactions with microorganisms and humans". In: INRA (Ed.), *Polyphenols* 96 pp.13-30. INRA, France.
- Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S. and Osawa, T. (1998). "Antioxidative Polyphenols Isolated from Theobroma cacao". *J Agric. and Food Chem.* 46, pp.454-457.

- Sanchez, R.F., Jauregui O., Casals I., Andres, L.C., Izquierdo, P.M. and Lamuela, R.R.M. (2003). "Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of *Theobroma cacao*". *Journal of Mass Spectrometry* 38, pp. 35-42.
- Shahidi, F. and Naczek, M. (1995). *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Technomic Publishing Company, Lancaster, PA
- Shahidi, F. (1997). "Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications". *American Oil Chemists' Society*, Champaign, IL.
- Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J., Mittal, G., Kakuda, Y. and Jiang, Y. (2005). "Extraction of Polyphenolics from Plant Material for Functional Foods-Engineering and Technology". *Food Reviews International, Volume 21*, pp. 139 - 166
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J.C., Bryan, M., and Wu, Y. (2003). "Optimization of the extraction of poly phenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution". *Food Agriculture & Env. Vol.1(2)*: 42-47
- Sripad, G. Prakash, V. and Narasinga, R.M.S. (1982). "Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents". *J. Biosci., Vol. 4, Number 2*, pp. 145-152.
- Tebayashi, S.I., Ishihara, A., Tsuda, M. and Iwamura, H. (2000). "Induction of clovamide by jasmonic acid in red clover". *Phytochemistry* 54, pp. 387-392.
- Terao, J. (1989). "Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution". *Lipids*. 24: pp.659-661.
- Yang, C.S., Chung, J.Y., Yang, G.Y., Chhabra, S.K. and Lee, M.L. (2000). "Tea and tea polyphenols in cancer prevention 1, 2". *J. Nutr.* 130: p. 472S-478S.
- White, P.J. and Xing, Y., (1997) *Antioxidants from cereals and legumes, in Natural antioxidants. Chemistry, health effects, and applications*, F. Shahidi, Ed. AOCS Press: Champaign. p.25-63.
- Wikipedia (2007). *Antioxidant*. <http://www.en.wikipedia.com/>. (akses: 4 Mei 2007)
- Wollgast, J. (2004) *The contents and effects of polyphenols in chocolate. Qualitative and quantitative analyses of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potential implications of chocolate consumption in human health*. Dissertation for obtaining the degree of doctor at the faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Home Economics and Environmental Management, the University of Gießen, Germany
- Wolfe, K. L., Wu, X. and Liu, R. H. (2003). "Antioxidant activity of apple peels". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51. pp. 609-614.
- Wong, D.W.S. (1989). *Mechanism and Theory in Food Chemistry*. Van Nostrand Reinhold, NY
- Zeeb, D.J., Nelson, B.C., Albert, K. and Dalluge, J.J. (2000). "Separation and Identification of Twelve Catechins in Tea Using Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass spectrometry". *Analytical Chemistry* 72, pp. 5020-5026.