

PENETAPAN KANDUNGAN FENOLAT TOTAL DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN RADIKAL DPPH FRAKSI ETIL ASETAT SARI BUAH APEL BELUDRU (*Diospyros blancoi* A. DC.)

JOHANES BAPTISTA YUNIO RAHMAWAN, YOHANES DWIATMAKA

Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta

Abstract: Antioxidant plays a role in inhibiting oxidation by binding to free radicals. As a result, the cell damage that leads to degenerative diseases can be inhibited. This research was conducted to determine the antioxidant activity and total phenolic content of ethyl acetate fraction of velvet apple (*Diospyros blancoi* A.DC.) juice. Previously known that other plants from genus *Diospyros* contain phenolic compounds such as quercetin. Antioxidant activity test performed qualitatively and quantitatively using radical of 1,1-diphenyl-2 picrilhidrazil (DPPH) and expressed as the value Inhibition Concentration 50 (IC_{50}). Determination of total phenolic using Folin-Ciocalteu method expressed as equivalent mass of gallic acid. Phenolic compounds will be oxidized by the Folin-Ciocalteu under alkaline conditions, forming a blue solution. The results showed that the ethyl acetate fraction of velvet apple juice has very strong antioxidant activity with IC_{50} of (30.0 ± 0.09) mg / mL. Total phenolic content of (393.5 ± 0.35) mg gallic acid equivalents per gram of ethyl acetate fraction.

Keywords: antioxidant, velvet apple (*Diospyros blancoi* A. DC), ethyl acetate fraction, DPPH, total phenolic content.

1. Pendahuluan

Radikal bebas berupa atom atau molekul yang reaktif karena elektron pada orbital terluarnya tidak berpasangan (Clarkson and Thompson, 2000). Radikal bebas tidak stabil sehingga mencari pasangan elektron dari molekul disekitarnya untuk mencapai kestabilan (Prakash, 2001).

Reaktivitas radikal bebas dapat menyebabkan gangguan fungsi sel, kerusakan struktur sel, modifikasi molekul sehingga tidak dikenali sistem imun, dan bahkan menyebabkan mutasi. Target utama radikal bebas di dalam sel tubuh adalah protein, asam lemak tak jenuh, lipoprotein, dan unsur DNA (Winarsi, 2007).

Reaktivitas radikal bebas dapat dinetralkan oleh antioksidan, karena kemampuannya menyumbangkan elektron

(Prakash, 2001). Antioksidan dapat berasal dari bahan alam maupun sintetis. Senyawa antioksidan sintetis sering memiliki efek samping tidak baik, sehingga banyak dicari alternatif antioksidan dari bahan alami (Sunarni, 2005).

Senyawa-senyawa polifenol mampu menghambat autooksidasi melalui mekanisme *radikal scavenging* dengan menyumbangkan satu elektron yang tidak berpasangan pada radikal bebas (Pokorny, Yanishlieva, and Gordon, 2001). Penelitian yang dilakukan oleh Lee, Jiang, Juan, Lin, and Hou (2006) menunjukkan bahwa *Diospyros blancoi* A. DC. mengandung senyawa golongan fenolat lebih dari 30 mg ekuivalen asam galat per gram ekstrak tanaman. Menurut Duke (2001) kuersetin yang merupakan suatu senyawa golongan

flavonoid ditemukan pada tanaman *American persimmon* (*Diospyros virginiana* L.) yang masih satu genus dengan apel beludru (*Diospyros blancoi*).

Dari informasi tersebut dapat diperkirakan apel beludru juga memiliki kandungan flavonoid. Golongan flavonoid juga memiliki kerangka struktur fenolat, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan kandungan fenolat total dari buah apel beludru. Buah apel beludru dapat dikonsumsi dan sering dijumpai di pedagang buah.

Penentuan aktivitas antioksidan dalam penelitian ini menggunakan metode DPPH. Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dapat direduksi atau distabilisasi oleh antioksidan. Larutan DPPH memiliki panjang gelombang serapan maksimum pada 517 nm. Penurunan absorbansi DPPH dalam larutan campuran dengan antioksidan menjadi dasar pengujian antioksidan pada metode DPPH ini (Duh, Tu, and Yen, 1999). Besarnya aktivitas antioksidan dinyatakan dalam nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi senyawa antioksidan yang menyebabkan penurunan 50% dari konsentrasi DPPH awal (Sunarni, 2005). Sedangkan penetapan kadar fenolat total dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu menurut Aqil, Ahmad, dan Mehmood (2006). Kadar fenolat total dinyatakan dalam kesetaraan dengan massa ekuivalen asam galat.

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini ingin mengetahui kandungan fenolat total yang dinyatakan dengan massa

ekuivalen asam galat dan nilai aktivitas antioksidan fraksi etil asetat sari buah apel beludru yang dinyatakan dengan IC_{50} .

2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental murni dengan rancangan acak lengkap pola searah. Beberapa bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah: buah apel beludru, methanol (Merck), kuersetin (Sigma), DPPH (Sigma), reagen Folin-Ciocalteu (Sigma), asam galat (Sigma). Peralatan yang digunakan antara lain: spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu), mikropipet 10-1000 μ L; 1-10 mL (Acura 825, Socorex), neraca analitik (Scaltec SBC 22, BP 160P), *vacuum rotary evaporator* (Junke & Kunkel).

2.1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman apel beludru dilakukan di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia, Fakultas farmasi Universitas Sanata Dharma menurut Morton (1987) dan United States of Department Agriculture NRCS.

2.2. Pengumpulan bahan

Buah apel beludru diperoleh dari kawasan Kampus III Universitas Sanata Dharma Paingan, Sleman, Yogyakarta. Pemanenan buah masak yang tidak berbiji, pada pagi hari dilakukan akhir bulan Januari.

2.3. Preparasi buah apel beludru

Buah apel beludru masak yang segar

dikupas dan dibersihkan dengan air mengalir kemudian dipotong sekecil dan setipis mungkin. Diambil 350 gram daging buah segar yang telah dipotong kemudian ditambahkan akuades hingga terendam selanjutnya dihaluskan dengan blender. Sari buah merupakan filtrat yang diperoleh melalui penyaringan berulang dengan bantuan pompa vakum. Sari buah yang didapat diekstraksi cair-cair menggunakan *wash benzine* dengan perbandingan (1:1 v/v), kemudian didiamkan sampai terpisah sempurna. Langkah ini dilakukan sebanyak 3 kali. Fraksi *wash benzine* disingkirkan, selanjutnya sari buah diekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat dengan perbandingan 1:1 (v/v) sehingga didapatkan sari buah dan fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* hingga pelarut etil asetat tidak mengalir, lalu dikeringkan dalam oven pada 50 °C sampai bobot tetap, selanjutnya disebut fraksi etil asetat buah apel beludru.

2.4. Uji kandungan fenolat

2.4.1. Pembuatan larutan baku asam galat

Asam galat dilarutkan dalam campuran akuades:metanol (1:1) dan dibuat seri pengenceran sehingga diperoleh konsentrasi larutan baku asam galat sebesar 50; 75; 100; 125; dan 150 µg/mL.

2.4.2. Pembuatan larutan uji untuk penentuan kandungan fenolat total

Dibuat larutan uji fraksi etil asetat sari buah apel beludru dalam metanol, dengan konsentrasi 300 µg/mL.

2.4.3. Uji pendahuluan keberadaan senyawa fenolat

Sejumlah 0,5 mL larutan uji 300,0 µg/mL dan larutan pembanding asam galat 150,0 µg/mL masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah 2,5 mL pereaksi fenol Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan akuades (1:10 v/v). Larutan didiamkan selama 10 menit, lalu ditambahkan 2 mL larutan natrium karbonat 1 M, kemudian dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Perubahan warna larutan menjadi biru menunjukkan keberadaan golongan senyawa fenolat.

2.4.4. Penetapan kandungan fenolat total

1) Pembuatan kurva baku asam galat

Sebanyak 0,5 mL larutan asam galat 50, 75, 100, 125, dan 150 µg/mL ditambah dengan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan air (1:10 v/v). Larutan selanjutnya ditambah dengan 4,0 mL natrium karbonat 1M. Setelah *OT*, absorbansinya dibaca pada λ_{maks} yaitu 751 nm terhadap blanko yang terdiri atas akuades : metanol *p.a* (1:1), reagen Folin-Ciocalteu dan larutan natrium karbonat 1M. Pengerjaan dilakukan 3 kali.

2) Estimasi kandungan fenolat total larutan uji

Diambil 0,5 mL larutan uji 300 µg/mL, lalu dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 mL dan dilanjutkan sebagaimana perlakuan pada pembuatan kurva baku asam galat. Kandungan fenolat total dinyatakan sebagai miligram ekuivalen asam galat per gram fraksi etil asetat, dilakukan 3 kali replikasi.

2.5. Uji aktivitas antioksidan

2.5.1. Pembuatan larutan pembanding kuersetin

Kuersetin dilarutkan dalam metanol dan dibuat seri pengenceran sehingga diperoleh konsentrasi larutan kuersetin sebesar 5; 7,5; 10; 12,5; dan 15 µg/mL.

2.5.2. Larutan uji untuk aktivitas antioksidan

Dibuat seri larutan uji fraksi etil asetat dalam metanol, dengan konsentrasi 15, 20, 25, 30, dan 35 µg/mL.

2.5.3. Pembuatan larutan DPPH

DPPH sebanyak 15,7 mg dilarutkan menggunakan metanol dalam labu ukur 100,0 mL sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM. Larutan ditutup dengan aluminium foil dan harus selalu dibuat baru.

2.5.4. Uji pendahuluan aktivitas antioksidan

Ke dalam tiga buah tabung reaksi masing-masing dimasukkan sebanyak 1 mL larutan DPPH. Selanjutnya masing-masing ditambah dengan 1 mL metanol, larutan pembanding kuersetin 37,5 µg/mL, dan larutan uji 200 µg/mL. Selanjutnya larutan ditambah dengan 3 mL metanol. Kemudian larutan dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Perubahan warna larutan menjadi kekuningan menunjukkan adanya aktivitas antioksidan.

2.5.5. Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan ditentukan dengan menggunakan metode spektrofotometri sesuai dengan penelitian Nusarini (2007).

1) Pengukuran absorbansi larutan DPPH (kontrol)

Pada labu ukur 10 mL, dimasukkan sebanyak 2 mL larutan DPPH. Ditambahkan larutan tersebut dengan metanol hingga tanda batas. Kemudian larutan dibaca absorbansinya pada saat *OT* (35 menit) dan panjang gelombang serapan maksimum yaitu 516 nm. Pengerjaan dilakukan sebanyak 3 kali.

2) Pengukuran absorbansi larutan pembanding dan larutan uji

Sebanyak 2 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambah dengan 2 mL larutan pembanding dan uji pada berbagai seri konsentrasi yang telah dibuat. Selanjutnya larutan tersebut ditambah dengan metanol hingga tanda batas. Larutan tersebut kemudian dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik dan diamkan selama *OT* (30 menit). Larutan dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang serapan maksimum hasil optimasi, yaitu 516 nm. Pengujian dilakukan dengan 3 kali replikasi.

3) Estimasi aktivitas antioksidan

Data hasil pengukuran absorbansi larutan uji (fraksi etil asetat sari buah apel beludru dan senyawa pembanding larutan rutin) digunakan untuk menghitung nilai %IC dan IC₅₀.

Aktivitas penangkapan radikal DPPH (%IC) dihitung dengan rumus :

$$\%IC = \frac{\text{absorbansi larutan kontrol DPPH} - \text{absorbansi larutan uji}}{\text{absorbansi larutan kontrol DPPH}} \times 100\%$$

Nilai aktivitas antioksidan yang dinyatakan dengan IC₅₀ ditentukan dengan persamaan garis regresi linear antara

konsentrasi larutan uji (sumbu x) dengan % IC (sumbu Y).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Penyiapan bahan penelitian

Determinasi menjadi langkah awal penelitian untuk mendapatkan kepastian mengenai kebenaran tanaman yang hendak digunakan. Determinasi tanaman dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma menurut Morton (1987) dan United States of Department Agriculture NRCS. Berdasarkan hasil determinasi tersebut diketahui bahwa tanaman yang digunakan adalah *Diospyros blancoi* A. DC yang umum dikenal dengan nama apel beludru.

Buah dari tanaman apel beludru untuk penelitian ini diperoleh dari lingkungan Kampus III Universitas Sanata Dharma Paingan, Sleman, Yogyakarta. Pemanenan buah yang sudah masak dilakukan akhir bulan Januari 2013 dengan kriteria warna merah kusam, tidak berbiji, utuh, segar. Buah sesegera mungkin dikupas dan daging buahnya dihaluskan. Menurut Evans and Hedger (2001) enzim polifenol oksidase cepat mendegradasi senyawa-senyawa polifenol. Untuk meminimalkan kerusakan, maka sari buah yang didapatkan segera diekstraksi cair-cair dengan *wash benzine* kemudian fraksi air diekstraksi dengan etil asetat.

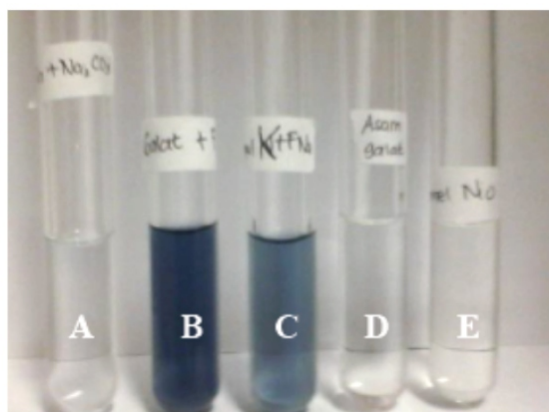
Ekstraksi menggunakan *wash benzine* digunakan untuk menarik senyawa non polar seperti klorofil, vitamin, minyak dan lemak

(Snyder 1997). Kelompok senyawa-senyawa tersebut kurang dikenal aktivitas antioksidannya, sehingga perlu disingkirkan. Fase air yang didapat dari proses ekstraksi dengan *wash benzine* kemudian diekstraksi menggunakan etil asetat. Ekstraksi dengan etil asetat ditujukan untuk menarik senyawa aglikon termasuk dari golongan polifenol. Hasil ekstraksi cair-cair ini akan menghasilkan fraksi etilasetat yang banyak mengandung golongan fenolat, sehingga aktivitas antioksidannya diharapkan cukup tinggi. Fraksi etil asetat yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya dengan *vacuum rotary evaporator* supaya tidak merusak kestabilan senyawa fenolat. Setelah dikeringkan dalam oven sampai bobot tetap, rendemen fraksi etil asetat yang didapat sebesar 0,046%.

3.2. Uji senyawa fenolat

Langkah awal adalah uji kualitatif senyawa fenolat pada fraksi etil asetat. Uji ini menggunakan prinsip reaksi oksidasi-reduksi pada suasana basa. Dalam suasana basa, senyawa fenolat akan berubah menjadi ion fenolat. Menurut Singleton dan Rossi (1965) ion fenolat bersifat lebih reaktif terhadap adanya pereaksi fenol Folin-Ciocalteu. Asam fosfomolibdat fosfotungstat dalam pereaksi fenol Folin-Ciocalteu akan tereduksi oleh ion fenolat tersebut sehingga akan terbentuk larutan dengan warna biru. Pengujian (Gambar 1) menunjukkan hasil positif bahwa fraksi etil asetat sari buah apel beludru mengandung senyawa fenolat.

Kandungan fenolat total dinyatakan



Gambar 1. Hasil uji pendahuluan keberadaan senyawa fenolat (A = kontrol negatif [Folin Ciocalteu dan Na₂CO₃], B = kontrol positif [asam galat + Folin Ciocalteu dan Na₂CO₃], C = larutan uji [fraksietil asetat sari buah apel beludru + Folin Ciocalteu dan Na₂CO₃], D =asam galat, E =fraksi etilasetat sari buah apel beludru)

Tabel I. Hasil perhitungan kandungan fenolat total

Replikasi	Fenolik total (mg ekuivalen)	Rata-rata ± sd	CV (%)
I	393,12	393,52 ± 0,35	0,0877
II	393,75		
III	393,68		

sebagai ekuivalen asam galat. Berdasarkan persamaan kurva baku asam galat yang diperoleh ($y = 5,3782 \cdot 10^{-3} x - 0,0564$ dan $R = 0,9997$) maka kandungan fenolat total dalam fraksi etil asetat sari buah apel beludru dapat ditentukan (Tabel I).

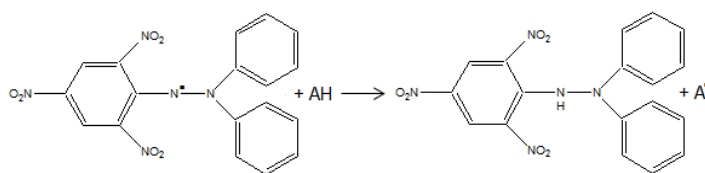
Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan hasil kandungan fenolat total rata-rata pada sampel sebesar $393,52 \pm 0,35$ mg ekuivalen asam galat per gram fraksi etil asetat sari buah apel beludru. Kandungan fenolat total

ini berhubungan dengan daya antioksidannya. Namun demikian tidak selalu kenaikan kandungan fenolik total diikuti naiknya aktivitas antioksidan. Jenis senyawa fenolat yang ada juga sangat menentukan aktivitasnya. Oleh karena itu masih diperlukan tahap penelitian lanjutan yaitu menentukan senyawa yang paling berperan dalam aktivitas antioksidan dalam fraksi etil asetat sari buah apel beludru ini.

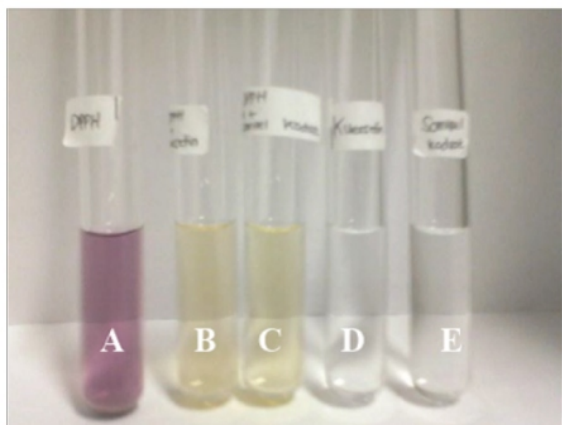
3.3. Uji aktivitas antioksidan

Senyawa DPPH banyak digunakan untuk uji aktivitas antioksidan. Senyawa radikal DPPH cukup stabil pada suhu ruangan dan berwarna ungu dalam metanol. Antioksidan akan mudah merusak rantai yang bertanggung jawab sebagai warna ungu dan menjadi warna kuning (Badarinath *et al.*, 2010).

Senyawa DPPH memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga bersifat radikal. Ketika elektronnya menjadi berpasangan karena bereaksi dengan suatu antioksidan (penangkap radikal bebas), maka absorbansinya menurun secara stoikiometri sesuai jumlah elektron yang diambil (Gambar 2). Keberadaan senyawa antioksidan dapat mengubah warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning (Dehpour, Ebrahimzadeh, Nabavi, and Nabavi, 2009). Sifat inilah yang



Gambar 2. Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan (Nisizawa, 2005)



Gambar 3. Hasil uji pendahuluan aktivitas antioksidan (A= kontrol negatif [blanko DPPH], B=kontrol positif [kuersetin + DPPH], C= larutan uji [fraksi etil asetat sari buah + DPPH], D=kuersetin, E=fraksi etil asetat sari buah apel beludru)

digunakan sebagai dasar penggunaan radikal DPPH sebagai bahan uji aktivitas antioksidan.

Penelitian ini menunjukkan hasil positif dengan larutan uji berwarna kuning seperti kontrol positif (larutan kuersetin). Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat sari buah apel beludru memiliki aktivitas antioksidan (Gambar 3).

Parameter aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal DPPH ini adalah nilai IC_{50} yakni konsentrasi senyawa uji yang dibutuhkan untuk mengurangi jumlah radikal DPPH sebesar 50%. Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi senyawa uji dengan persen aktivitas antioksidan. Semakin kecil nilai IC_{50} senyawa uji, maka semakin poten senyawa uji tersebut sebagai antioksidan.

Dari hasil penelitian ini diperoleh bahwa bahan uji fraksi etil asetat sari buah

apel beludru memiliki daya antioksidan yang sangat kuat ($IC_{50} = 29,920,09 \mu\text{g/mL}$), walaupun tidak sekuat kuersetin ($IC_{50} = 10,800,31 \mu\text{g/mL}$). Hal ini disebabkan karena fraksi etil asetat buah apel beludru masih merupakan campuran berbagai senyawa fenolat yang tidak semuanya memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, sementara kuersetin merupakan senyawa murni. Berdasarkan nilai IC_{50} yang cukup rendah (aktivitas sangat kuat) ini, maka fraksi etil asetat cukup potensial digunakan sebagai salah satu alternatif sumber senyawa antioksidan.

4. Kesimpulan dan Saran

4.1. Kesimpulan

1. Kandungan fenolat total fraksi etil asetat sari buah apel beludru sebesar $393,5 \pm 0,35$ mg ekuivalen asam galat per gram fraksi.
2. Fraksi etil asetat sari buah apel beludru memiliki daya antioksidan sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar $30,0 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$.

4.2. Saran

Perlu dilakukan identifikasi senyawa yang paling potensial sebagai antioksidan dalam fraksi etil asetat sari buah apel beludru.

Daftar Pustaka

- Aqil, F., Ahmad, I., and Mehmood, Z., 2006, Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Twelve Traditionally Used Indian Medical Plants, *Turk J Biol*, 30, 177-183
- Badarinath, A.V., Mallikarjuna, K., Chetty, C., Sudhana, M., Ramkanth, S., Rajan, T.V.S, and Gnanaprakash, K., 2010, A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations

- and Considerations, *Int. J. Pharm. Tech. Research*, Vol.2, No.2, pp. 1276-1285.
- Clarkson, P.M., and Thomson, H.S. 2000. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health, *Am. J. Clin. Nutr.* 729 (Suppl): 637.
- Dehpour AA, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, and Nabavi SM (2009), Antioxidant activity of methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition, *Grasas Aceites*, 60(4): 405-412.
- Duh, P., Tu, Y. and Yen, G., 1999, Antioxidant activity of water extract of Harnng Iyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat), *Lebensm Wiss U Technol* 32: 269-277.
- Duke, J.A., 2001, *Handbook of Phytochemical Constituents of Grass Herbs and Other Economic Plants*, CRC Press, Washington D.C., pp.235
- Evans, C.S., and Hedger, J.N., 2001, Degradation of Plant Cell Wall Polymers, in Gadd, G.M., (Ed.), *Fungi in Bioremediation*, Cambridge University Press, United Kingdom, 18.
- Lee, M.H., Jiang, C.B., Juan, S.h., Lin, R.D. and Hou, W.C. 2006. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity, *Life Science*, 73: 167-179.
- Morton, J., 1987, *Fruit of Warm Climate*, Mabolo, Miami, FL, pp. 418-419.
- Nusarini, N.M.R., 2007, Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Ekstrak metanolik Herba Ketul (*Bidens pilosa* L.), *Skripsi*, 15-20, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M., 2001, *Antioxidant in Food, Practical Application*, Wood publishing Limite, Cambridge, England, pp. 22-123.
- Prakash, A., 2001, "Antioxidant Activity" Medallion Laboratories : Analithycal Progress Vol 19 No : 2. 1-4.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A., 1965, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-phosphotungstic Acid Reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-58.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L., 1997, *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 67-68, 6.
- Sunarni, T., 2005, Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa kecambah Dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae, 53-61, *Jurnal Farmasi Indonesia* 2 (2), Jakarta.
- United States of Department Agriculture (USDA) NRSC, *Plant database: Diospyros blancoi* A. DC., <http://plants.usda.gov/java/nameSearch>, diakses tanggal 31 Mei 2013.
- Winarsi, H., 2007, *Antioksidan Alami Dan Radikal*, edisi I, Kanisius, Yogyakarta, p.17.
- World Health Organization, 2003, *WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants*, Government of the Grand Duchy of Luxembourg, pp. 11-15.