

POTENSI ANTIOKSIDAN KULIT BATANG TUMBUHAN KETAPANG (*Terminalia catappa* Linn.)

Siti Fauziah dan Syahmani

Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Unlam Banjarmasin

Abstrak: Three phenolic compound, hidroxybenzoat acids (gallat acids), kamferol, and 3,7,4'-trihidroxyflavonol, had been isolated from ethanol extracts of tree bark of *Terminalia catappa* Linn with soxhletation method, TLC method use BAA, Phenol, BEA solvent. The structures of these compounds were are established base on spectroscopic UV spectra, as well as by comparation with those reported data. Antioxidan total effect (DNPH method) of the isolated compounds showed activities with IC_{50} 776,58 ppm, hydrogen peroxide scavenging scavenging (Ruch method) showed 387,6 ppm better than standart antioxidan (vitamin E, tocopherol).

Key words: *Terminalia catapa* Linn, phenolic compound, antioxidan

Pendahuluan

Jumlah radikal bebas dalam tubuh semakin meningkat seiring dengan perkembangan zaman. Pola hidup masyarakat modern sekarang ini yang lebih suka mengkonsumsi makanan cepat saji dengan pemanasan tinggi dan pembakaran dapat memicu terbentuknya senyawa radikal sehingga berdampak negatif bagi kesehatan (Poumorad *et al.*, 2006). Tubuh manusia secara terus menerus memproduksi radikal bebas sebagai hasil samping metabolisme tubuh (sumber internal). Selain itu, sumber eksternal seperti asap rokok, radiasi, dan polutan lainnya diketahui juga dapat menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas. Sumber radikal bebas lainnya adalah radiasi akibat dari penipisan ozon atau *global warming*. *Global warming* dapat menyebabkan radiasi sinar ultra violet semakin intensif menyerang manusia dan menginduksi terbentuknya suatu radikal (Langseth, 1995; Tuminah, 2000).

Radikal bebas dalam tubuh bersifat sangat reaktif dan dapat bereaksi dengan membran sel, lemak, protein, karbohidrat, DNA, dan RNA sehingga merusak komponen-komponen sel yang penting dan kemudian menyebabkan berbagai penyakit yang berbahaya (Kristanti *et al.*, 2009; Reynertson, 2007). Penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas diantaranya adalah penyakit jantung koroner, katarak, aterosklerosis, kanker, penyakit degeneratif atau kemerosotan fungsi tubuh seperti Alzheimer, pikun, penyakit kulit, serta pada kasus penuaan dini (Reynertson, 2007; Tuminah, 2000).

Tubuh manusia memerlukan radikal bebas dalam jumlah tertentu misalnya melalui sel darah putih untuk memerangi peradangan dan membunuh beberapa jenis bakteri serta fungi. Namun jika keberadaannya berlebih, maka kemampuan untuk menetralsirnya akan semakin berkurang sehingga dapat merugikan kesehatan (Langseth, 1995). Kerusakan oksidatif jaringan akibat dari radikal bebas dalam tubuh dapat ditangkal oleh antioksidan endogen seperti superoksida dismutase (SOD). Namun jika jumlah radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif yang melebihi daya proteksi antioksidan endogen serta kemampuan tubuh dalam memproduksi antioksidan endogen yang semakin berkurang seiring dengan bertambahnya usia menyebabkan tubuh tidak mampu lagi menangkap radikal yang ada di dalam tubuh sehingga tubuh membutuhkan antioksidan tambahan dari luar (antioksidan eksogen) untuk menetralkan radikal yang terbentuk (Reynertson, 2007).

Meningkatnya kebutuhan antioksidan tambahan bagi tubuh mendorong berkembangnya penelitian tentang senyawa antioksidan alami maupun sintetik. Antioksidan sintetik seperti butil hidroksi anisol (BHA) yang telah sering digunakan berdampak buruk bagi kesehatan karena penggunaan yang lama dapat menyebabkan kerusakan hati dan meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Poumorad *et al.*, 2006). Kekurangan dari antioksidan sintetik dapat ditutupi dengan menemukan senyawa antioksidan alami yang tidak berbahaya bagi tubuh.

Senyawa alami yang dapat berfungsi sebagai antioksidan adalah senyawa fenolik. Banyak penelitian yang menyatakan bahwa senyawa fenolik atau polifenolik yang berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional (seperti vitamin C) merupakan senyawa antioksidan (Rohman *et al.*, 2006; Vinson *et al.*, 1999). Beberapa senyawa fenolik

yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavanol, flavon, flavonol, isoflavon, kateksin, tanin, dan kalkon (Dykes *et al.*, 2005; Reynertson, 2007). Fenol terdapat dalam semua tumbuhan hijau sebagai metabolit sekunder yang berfungsi sebagai pengatur tumbuh, pengatur fotosintesis, melindungi tanaman dari mikroba, virus, dan serangga (Harbone, 1996; Robinson, 1995).

Salah satu bahan alam yang mengandung senyawa fenolik yang memiliki sifat antiradikal bebas adalah tumbuhan ketapang (*Terminalia catappa* Linn.). Ketapang mengandung beberapa macam senyawa kimia hasil metabolit sekunder seperti golongan flavon, flavonoid kuersetin, dan flavan (Malik *et al.*, 1993). Berbagai ekstrak dari ketapang digunakan sebagai antioksidan, antijamur, antikanker, hepatoprotektif, anti peradangan, antihepatitis, dan antidiabetes.

Penelitian mengenai aktivitas antioksidan dari buah dan daun ketapang telah banyak dipublikasikan, antara lain penelitian yang telah dilakukan oleh Naz (2005) yang menemukan bahwa fraksi petroleum eter dari daun dan buah ketapang memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi, dan pada penelitian Ko *et al.* (2002) diketahui daun ketapang memiliki aktivitas penangkapan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH) yang lebih tinggi dibandingkan dengan benihnya. Namun, penelitian mengenai aktivitas antioksidan dari kulit batang belum banyak dipublikasikan. Penelitian yang pernah dilakukan terhadap kulit batang ketapang berupa pengujian antioksidan dari komponen senyawa tanin oleh Lin *et al.* (2001), sehingga perlu dikaji potensi antioksidan dari kulit batang ketapang dengan metode 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), *chelating* logam, dan *scavenging* H₂O₂ melalui penelitian ini. Pemilihan ketiga metode antioksidan tersebut didasari atas kemudahan, reliabel, dan praktis untuk pengukuran rutin dari aktivitas antioksidan serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk analisisnya. Disamping itu, ketapang mudah tumbuh di berbagai daerah tropis sehingga tanaman ini sangat potensial untuk dijadikan sebagai bahan antioksidan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis senyawa fenolik yang terkandung di dalam kulit batang ketapang berdasarkan spektrum ultraviolet dan mengetahui potensi ekstrak etanol kulit batang ketapang sebagai antioksidan.

METODE PENELITIAN

Peralatan yang digunakan adalah blender, neraca analitik ADAM PW 254, seperangkat alat gelas, thermolyn Cimarec 3, rak tabung reaksi, spatula, lumpang dan alu, statif dan klem, seperangkat alat soxhlet, seperangkat alat rotary evaporator England, oven Furnace Carbolite AAF 11/3 Person Lane England, KLT silika gel 60 F 254, spektrofotometer UV-Visible Shimadzu 1700, lampu UV Vilber Lourman (VL)-6LC, chamber kromatografi, pipa kapiler, mikro pipet, inkubator, vortex mixer VM-300, freezer, dan sentrifuge Centurion.

Bahan penelitian berupa kulit batang ketapang, etanol (Merck, p.a), FeCl₃ 1%, HCl pekat (Merck, p.a), bubuk Mg, metanol (Merck, p.a), NaOH 10%, kertas saring Whattman, akuades, etanol 96%, n-butanol, asam asetat (Merck, p.a), fenol (Merck, p.a), NaOH 2 M, buffer fosfat pH = 7,4, bovine serum albumin (BSA) 1%, CH₃COOH 20%, Fe-EDTA, H₂O₂ 10 mM, DNPH dalam HCl 2,5 M, TCA 20%, etanol-etil asetat, urea 9 M dalam NaOH 0,4 N, FeCl₂ 2 mM, o-fenantrolin, H₂O₂ 40 mM, dan aluminium foil.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen di laboratorium untuk mengekstrak dan mengidentifikasi senyawa fenolik yang terdapat dalam kulit batang ketapang (*Terminalia catappa* Linn.) serta menguji potensi ekstrak etanol kulit batang ketapang sebagai antioksidan.

Pengambilan sampel kulit batang ketapang pada penelitian ini menggunakan teknik purposive sampling, dimana sampel diambil di daerah Kota Banjarmasin. Sebelum melakukan kegiatan penelitian, menjemur kulit batang ketapang sampai kering lalu mencincang kulit batang ketapang. Selanjutnya menumbuk dengan menggunakan lumpang dan alu serta menghaluskan dengan blender sampai menjadi serbuk.

Mula-mula, melakukan uji pendahuluan yakni uji fenolik dan flavonoid dengan pereaksi Shinoda dan NaOH. Selanjutnya, ekstraksi senyawa fenolik dengan mengekstraksi sebanyak 50 g serbuk kulit batang ketapang dengan 300 mL etanol 96% secara soxhletasi. Melakukan ekstraksi sampai pelarut di dalam selongsong sampel tidak berwarna lagi. Mengevaporasi ekstrak yang telah didapat sehingga diperoleh ekstrak etanol kulit batang ketapang. Melakukan ekstraksi sebanyak 2 kali sehingga jumlah sampel serbuk kulit batang ketapang yang digunakan sebanyak 100 g dengan etanol sebesar 600 mL. Sebagian ekstrak

yang dihasilkan untuk pemisahan senyawa dengan metode KLT menggunakan pelarut BAA, PheOH, dan BEA lalu diidentifikasi dengan spektrofotometri UV-Vis menggunakan pereaksi geser NaOH. Sebagian yang lain digunakan untuk uji antioksidan dengan metode berikut:

Aktivitas Antioksidan Total (Metode DNPH) (Koracevic, 2001)

Membuat blanko (A_0) dan larutan uji (A_1). Blanko berupa akuades sedangkan larutan uji adalah ekstrak etanol kulit batang ketapang dan vitamin E dengan konsentrasi 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 ppm masing-masing sebanyak 0,01 mL. Menambahkan ke dalam kedua larutan tersebut dengan 0,49 mL buffer fosfat pH = 7,4; 0,5 mL BSA 1%; 1 mL asam asetat 20%; 0,2 mL Fe-EDTA dan 0,2 mL H_2O_2 10 mM. Menginkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Mengambil larutan sebanyak 0,5 mL dan menambahkan dengan DNPH dalam HCl 2,5 M. Menginkubasi kembali selama 45 menit pada suhu kamar dan dalam ruang yang terlindung cahaya serta memvortex setiap 15 menit. Menambahkan 2 mL TCA 20% ke dalam larutan dan menginkubasi lagi di dalam es selama 5 menit. Menambahkan 1 mL etanol-etil asetat dan mensentrifugasi selama 5 menit, lalu membuang supernatannya. Menambahkan 1 mL urea 9 M dalam NaOH 0,4 N ke dalam endapan yang tersisa. Kemudian menginkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit sambil mengocok. Lalu mensentrifuge selama 5 menit. Mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 405 nm dengan spektrofotometer. Menghitung aktivitas antioksidan dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

Aktivitas Chelating Logam (Metode Dinis) (Gulcin, 2004)

Membuat blanko (A_0) dengan cara mencampurkan akuades dengan 0,05 mL $FeCl_2$ 2 mM dan 0,2 mL o-fenantrolin hingga homogen. Membuat larutan uji (A_1) dengan cara yang sama seperti pada blanko tetapi sebelumnya mengganti akuades dengan ekstrak etanol kulit batang ketapang dan vitamin E masing-masing dengan konsentrasi 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 ppm sebanyak 0,01 mL. Membiarkan selama 10 menit, lalu mengukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 562 nm. Menghitung % penghambatan aktivitas *chelating* logam.

Scavenging Hidrogen Peroksida (Metode Ruch) (Gulcin, 2004)

Membuat blanko (A_0) yaitu menambahkan akuades dengan 0,6 mL H_2O_2 40 mM dalam buffer fosfat pH 7,4. Membuat larutan uji (A_1) seperti blanko tetapi sebelumnya mengganti akuades dengan ekstrak etanol kulit batang ketapang dan vitamin E masing-masing dengan konsentrasi 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 ppm sebanyak 0,01 mL. Setelah 10 menit ukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer λ 340 nm. Menghitung % penghambatan aktivitas *scavenging* hidrogen peroksida.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

Senyawa yang terkandung didalam ekstrak pekat kulit batang ketapang dipisahkan secara kromatografi lapis tipis dengan menggunakan 3 macam eluen. Hasil pemisahan KLT ekstrak kulit batang ketapang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

No.	Pelarut	Tinggi Pelarut	Jumlah Noda	Tinggi Noda	Warna Noda	Rf x 100	Catatan
1.	BAA	16	1	13,5	Merah muda	84,3	Senyawa 1
2.	PheOH	16,8	2	1,9 10	Coklat Kuning	11,3 59,5	Senyawa 2 Senyawa 3
3.	BEA	16,8	1	9	Kuning	53,6	Senyawa 4

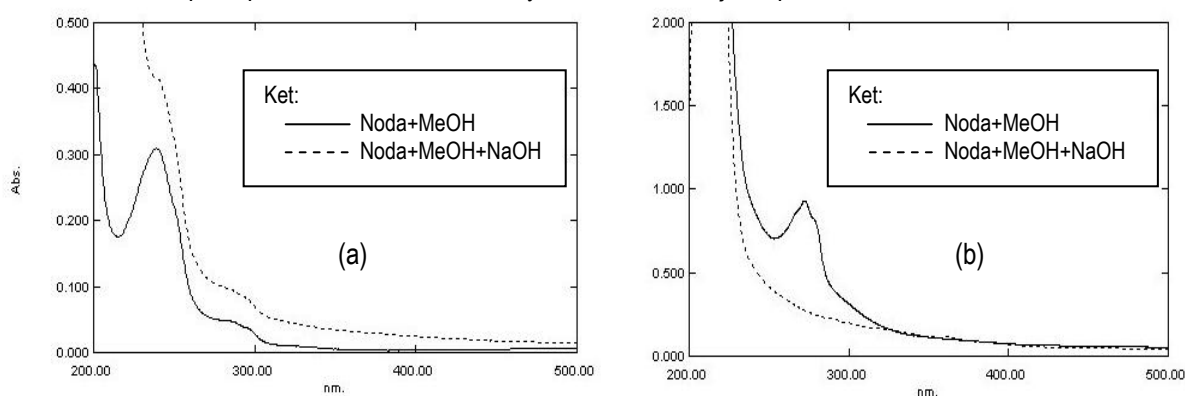
Noda yang dihasilkan dari KLT selanjutnya dikerok dan dilarutkan dengan menggunakan pelarut metanol. Senyawa yang terkandung didalam larutan tersebut dideteksi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil uji spektrofotometri dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data Panjang Gelombang dan Absorbansi Spektrofotometri UV-Vis

No	Pelarut/ Eluen	Tanpa Reaksi Geser		Dengan Reaksi Geser		Selisih λ (nm)	Ket.
		λ (nm)	Absorbansi (A°)	λ (nm)	Absorbansi (A°)		
1.	BAA	239,00 366,50	0,309 0,005	209,00	3,325	-30	Senyawa 1
2.	PheOH	272,20	0,931	-	-	-	Senyawa 2
		272,00	0,395	288,00	0,447	+16	Senyawa 3
		368,50	0,267	353,50 368,00	0,254 0,272	-0,5	
3.	BEA	258,50	0,331	290,50	0,469	+18	Senyawa 4
		272,50	0,324	355,00	0,483		
		370,50	0,489	370,50	0,530		

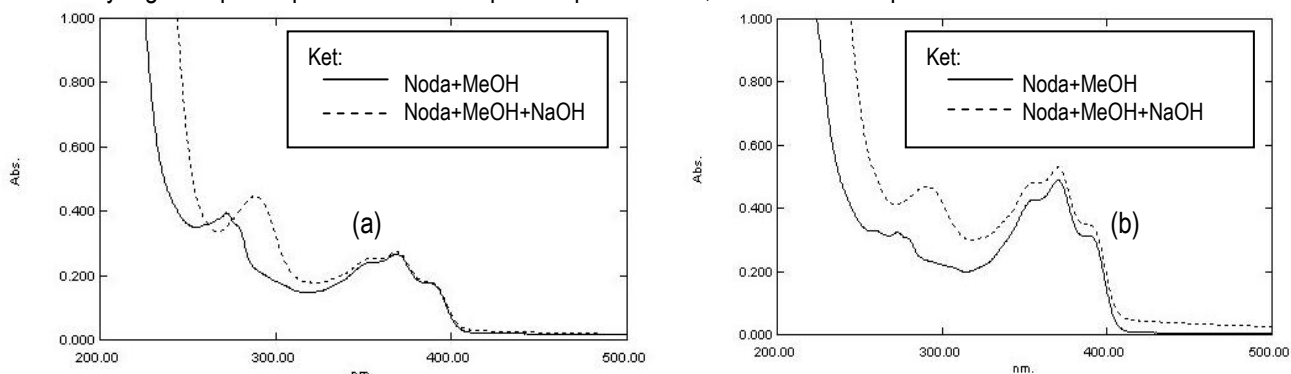
Keterangan : Pereaksi geser yang digunakan : NaOH 2 M
Rentang panjang gelombang yang digunakan antara 200-500 nm

Adapun spektrum UV-Vis untuk senyawa 1 dan 2 disajikan pada Gambar 1 berikut :



Gambar 1. Hasil UV-Vis (a) Senyawa 1 pada eluen BAA dan (b) Senyawa 2 pada eluen PheOH

Pada Gambar 1a di atas, terdapat puncak dengan λ 239 nm yang merupakan pita II dan sebuah puncak pada λ 366,50 nm termasuk pada pita I. Sedangkan pada Gambar 1b terdapat puncak dengan λ sebesar 272,20 nm. Sedangkan, spektrum UV-Vis untuk senyawa 3 dan 4 disajikan pada Gambar 2. Pada Gambar 2a di atas, diketahui ada puncak dengan λ 272 nm yang merupakan pita II dan sebuah puncak pada λ 368,50 nm yang termasuk pita I. Sedangkan pada Gambar 2b di atas, ada puncak dengan λ 272,50 nm yang merupakan pita II dan sebuah puncak pada λ 370,50 nm termasuk pita I.



Gambar 2. Hasil UV-Vis (a) Senyawa 3 dengan eluen PheOH dan (b) Senyawa 4 dengan eluen BEA

Hasil uji aktivitas antioksidan kulit ketapang dengan metode DNPH dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Data Aktivitas Antioksidan Total Kulit Batang Ketapang

Konsentrasi	62,5 ppm		125 ppm		250 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	Ao	A1	Ao	A1	Ao	A1	Ao	A1	Ao	A1
Ketapang	0.331	0.234	0.181	0.267	0.226	0.189	0.244	0.375	0.170	0.265
	0.196	0.247	0.236	0.204	0.319	0.176	0.133	0.155	0.141	0.225
Rerata	0.264	0.241	0.209	0.236	0.273	0.183	0.189	0.265	0.156	0.245
Antioksidan (%)	8.729		12.950		33.028		40.584		57.556	
Vitamin E	0.216	0.392	0.187	0.242	0.177	0.275	0.145	0.251	0.457	0.182
	0.457	0.216	0.263	0.295	0.237	0.198	0.133	0.123	0.183	0.169
Rerata	0.337	0.304	0.225	0.269	0.207	0.237	0.139	0.187	0.320	0.176
Antioksidan (%)	9.658		12.167		14.251		34.532		45.156	

Hasil uji aktivitas *chelating* logam kulit batang ketapang dengan metode Dinis dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Data Aktivitas *Chelating* Logam Kulit Batang Ketapang

Konsentrasi	62,5 ppm		125 ppm		250 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	Ao	A1	Ao	A1	Ao	A1	Ao	A1	Ao	A1
Ketapang	0.026	0.035	0.075	0.085	0.046	0.052	0.046	0.056	0.046	0.013
	0.023	0.020	0.053	0.073	0.043	0.057	0.023	0.033	0.023	0.02
Rerata	0.025	0.028	0.064	0.079	0.045	0.055	0.035	0.045	0.035	0.017
Antioksidan (%)	12.245		23.438		22.472		28.986		52.174	
Vitamin E	0.046	0.003	0.046	0.007	0.046	0.007	0.046	0.009	0.046	0.003
	0.013	0.009	0.023	0.005	0.023	0.004	0.023	0.001	0.023	0.006
Rerata	0.030	0.006	0.035	0.006	0.035	0.006	0.035	0.005	0.035	0.005
Antioksidan (%)	79.661		82.609		84.058		85.507		86.957	

Hasil uji *scavenging* H₂O₂ kulit batang ketapang dengan metode Ruch dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Data *Scavenging* Hidrogen Peroksida Kulit Batang Ketapang

Konsentrasi	62,5 ppm		125 ppm		250 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	Ao	A1	Ao	A1	Ao	A1	Ao	A1	Ao	A1
Ketapang	0.01	0.012	0.01	0.013	0.01	0.006	0.01	0.018	0.01	0.019
	0.01	0.012	0.01	0.012	0.01	0.006	0.01	0.016	0.01	0.02
Rerata	0.010	0.012	0.010	0.013	0.010	0.006	0.010	0.017	0.010	0.020
Antioksidan (%)	20.000		25.000		40.000		70.000		95.000	
Vitamin E	0.01	0.012	0.01	0.006	0.01	0.004	0.01	0.003	0.01	0.003
	0.01	0.012	0.01	0.005	0.01	0.009	0.01	0.003	0.01	0.002
Rerata	0.010	0.012	0.010	0.006	0.010	0.007	0.010	0.003	0.010	0.003
Antioksidan (%)	20.000		45.000		35.000		70.000		75.000	

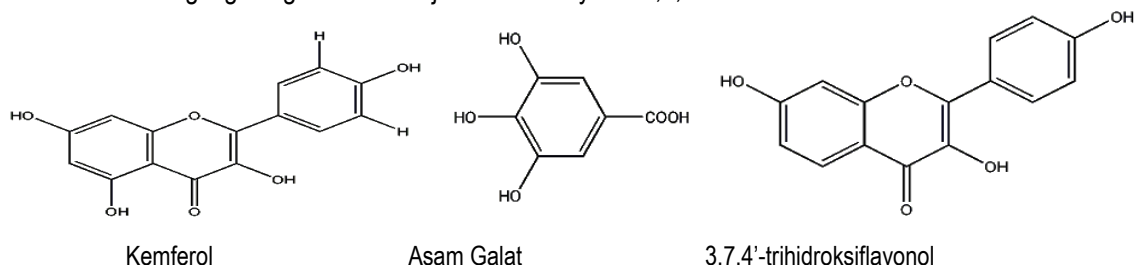
PEMBAHASAN

Pada pemisahan senyawa fenol dengan pelarut BAA diperoleh satu buah noda dengan harga $R_f=84,3$ yang berwarna merah muda ketika disinari dengan lampu UV (senyawa 1). Dari data spektrum, senyawa 1 memiliki λ maks pada pita II sebesar 239 nm dan λ maks pada pita I=366,50 nm sebelum ditambahkan pereaksi geser. Setelah penambahan pereaksi geser terjadi pergeseran hipsokrom pada pita II dari 239,00 nm menjadi 209,00 nm sebesar 30 nm yang menunjukkan kekuatan yang terus menurun (Markham, 1988). Berdasarkan data tersebut, tidak ditemukannya rujukan yang sesuai sehingga tidak dapat ditentukan jenis flavonoid dari senyawa 1. Namun, adanya serapan pada panjang gelombang 366,50 nm dengan intensitas rendah yaitu 0,005 merupakan hasil transisi $n \rightarrow \pi^*$ dari gugus keton. Jadi, berdasarkan pola spektrumnya, uji pendahuluan, dan adanya gugus keton dapat diduga senyawa ini merupakan golongan flavonoid.

Pemisahan komponen senyawa kulit batang ketapang dengan menggunakan eluen fenol diperoleh dua buah bercak noda dengan masing-masing harga R_f =11,3 (senyawa 2) dan 59,5 (senyawa 3). Setelah diukur panjang gelombang senyawa 2, diperoleh λ maks adalah 272,20 nm, sedangkan ketika ditambahkan pereaksi geser, tidak terbentuk panjang gelombang dengan serapan yang berarti. Hal ini menunjukkan ketika ditambahkan basa, maka senyawa 2 terurai. Senyawa 2 dengan karakteristik tersebut teridentifikasi sebagai golongan asam hidroksibenzoat yakni asam galat. Selain itu, senyawa 2 memiliki harga R_f kecil (11,3) yang menunjukkan senyawa ini memiliki kepolaran yang rendah seperti halnya asam galat (Harborne, 1996). Hal ini diperkuat dengan adanya serapan pada panjang gelombang 272,20 nm yang merupakan hasil transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dari konjugasi benzen yang tersubstitusi dengan gugus COOH.

Senyawa 3 memiliki λ maks pita I=368,50 nm, sedangkan λ maks pita II=272 nm. Menurut Markham (1988), senyawa dengan λ maks pada pita I antara 350-395 nm dan pita II dengan rentang panjang gelombang 200-280 nm menunjukkan golongan flavonoid jenis flavonol (3-OH bebas). Setelah penambahan pereaksi geser, terjadi pergeseran batokrom sebesar 16 nm pada pita II dari 272 nm ke 288 nm, sedangkan pita I tidak mengalami pergeseran. Terjadinya kenaikan panjang gelombang dari serapan maksimum serta intensitas dari serapan pita II menunjukkan adanya gugus hidroksil pada cincin A (Achmad, 1986). Adanya penambahan pita baru dengan panjang gelombang 353,50 nm memberikan petunjuk bahwa senyawa 3 tergolong jenis flavonol dengan 7-OH (Markham, 1988). Selain itu juga, senyawa 3 memiliki harga R_f sebesar 59,5 mendekati senyawa kemferol golongan flavonol (R_f =58) serta berwarna kuning ketika terpapar sinar UV (Harborne, 1996). Hal ini diperkuat dengan adanya serapan pada panjang gelombang 368,50 nm dengan intensitas rendah yakni 0,267 yang menunjukkan terjadinya transisi $n \rightarrow \pi^*$ dari gugus keton. Jadi, berdasarkan hal tersebut bahwa senyawa 3 teridentifikasi sebagai golongan flavonoid jenis flavonol dengan 3-OH bebas dan 7-OH yaitu senyawa kemferol.

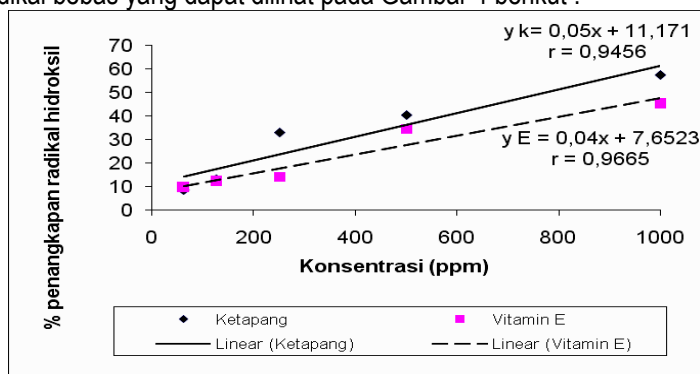
Pada pengelusan dengan BEA, diperoleh satu buah bercak dengan harga R_f =53,6 (senyawa 4) yang berwarna kuning ketika terkena sinar UV. Dari data spektra, setelah diukur panjang gelombangnya diperoleh puncak dengan panjang gelombang 272,50 nm yang merupakan pita II dan sebuah puncak pada 370,50 nm yang termasuk pita I, data tersebut diperoleh sebelum penambahan pereaksi geser. Berdasarkan kriteria Markham (1988), diketahui serapan pada panjang gelombang 272,50 nm termasuk dalam rentang panjang gelombang 250-289 nm (pita II) dan serapan pada panjang gelombang 370,50 nm termasuk dalam rentang 350-385 nm (pita I) yang menunjukkan jenis flavonol (3-OH bebas). Sedangkan setelah penambahan pereaksi geser NaOH 2 M terjadi pergeseran pada pita II dari 272,50 nm ke 290,50 nm sebesar 18 nm, sedangkan pita I tidak mengalami pergeseran. Terjadinya kenaikan panjang gelombang dari serapan maksimum serta intensitas dari serapan pita II menunjukkan adanya gugus hidroksil pada cincin A (Achmad, 1986). Adanya penambahan pita baru dengan panjang gelombang 355 nm memberikan petunjuk bahwa senyawa 4 tergolong jenis flavonol dengan 7-OH (Markham, 1988). Hal ini diperkuat dengan adanya serapan pada panjang gelombang 370,50 nm dengan intensitas 0,489 yang menunjukkan terjadinya transisi $n \rightarrow \pi^*$ dari gugus keton serta serapan pada panjang gelombang 258,50 nm yang merupakan serapan gugus OH pada cincin B. Jadi, hal ini menunjukkan bahwa senyawa 4 teridentifikasi sebagai golongan flavonoid jenis flavonol yakni 3,7,4'-trihidroksiflavonol.



Gambar 3. Beberapa struktur senyawa hasil isolasi

Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan total dari kulit batang ketapang yang diukur melalui metode DNPH menunjukkan bahwa semua konsentrasi ekstrak efektif sebagai antioksidan (Tabel 3).

Kemudian dibuat grafik hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak etanol kulit batang ketapang dengan aktivitas anti radikal bebas yang dapat dilihat pada Gambar 4 berikut :

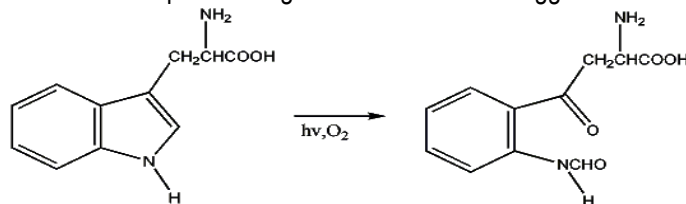


Gambar 4. Hubungan aktivitas antioksidan dengan perubahan konsentrasi

Kekuatan hubungan antara konsentrasi dan aktivitas antioksidan dapat dihitung secara kuantitas dari koefisien korelasi (r). Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh koefisien korelasi antara konsentrasi ekstrak etanol kulit batang ketapang dengan aktivitas antioksidan total yaitu +0,9456. Nilai korelasi positif ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat dimana peningkatan konsentrasi ekstrak akan diikuti dengan peningkatan aktivitas antioksidan.

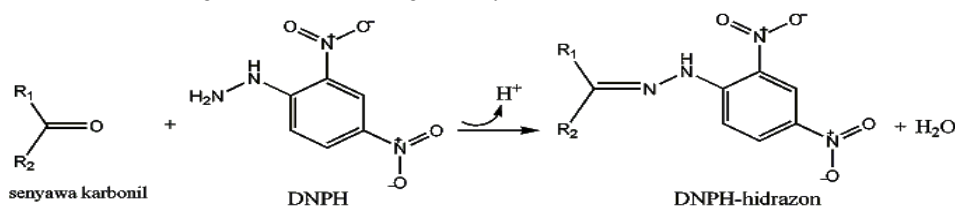
Aktivitas anti radikal bebas dalam menghambat 50% oksidasi oleh radikal bebas dapat dihitung melalui *inhibitor concentration 50%* (IC_{50}). Melalui data aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit batang ketapang diperoleh persamaan regresi linier yaitu $IC = 0,05C + 11,171$. Berdasarkan persamaan tersebut, dengan memasukkan nilai $IC = 50$, maka diperoleh $C = 776,58$ ppm. Hal ini berarti untuk menghambat aktivitas radikal bebas sebesar 50% maka diperlukan konsentrasi ekstrak etanol kulit batang ketapang sebesar 776,58 ppm. Konsentrasi ini lebih kecil bila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan vitamin E sebesar 1058,69 ppm.

Pada penelitian ini, protein yang berupa BSA (bovine serum albumin) dirusak oleh radikal bebas yang terbentuk karena adanya hidrogen peroksida dan ion besi(II). Kerusakan protein tersebut menimbulkan senyawa karbonil. Gambar 5 merupakan contoh reaksi kerusakan protein akibat radikal bebas yakni reaksi asam amino triptofan dengan radikal bebas sehingga membentuk senyawa karbonil.



Gambar 5. Reaksi Pembentukan Senyawa Karbonil (Suhartono *et al.*, 2007)

Semakin banyak jumlah senyawa karbonil yang terbentuk maka semakin besar kerusakan protein dan sebaliknya. Senyawa karbonil yang terbentuk tersebut selanjutnya akan bereaksi dengan 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) membentuk 2,4-dinitrofenilhidrazon. Jumlah 2,4-dinitrofenilhidrazon yang terbentuk dapat diukur secara spektrofotometris dengan karakteristik penyerapan maksimal pada 405 nm. Berikut ini Gambar 6 tentang reaksi DNPH dengan senyawa karbonil membentuk 2,4 dinitrofenilhidrazon.



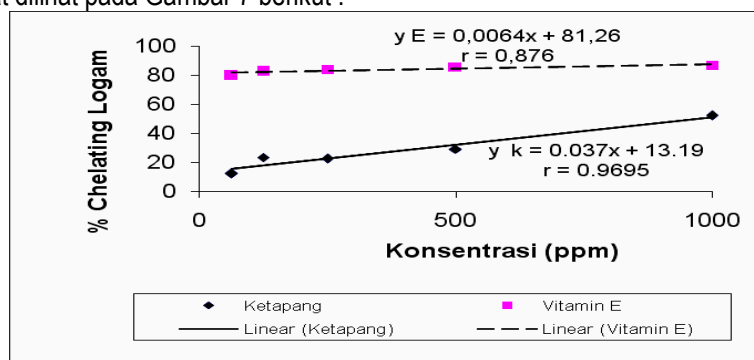
Gambar 6. Reaksi antara Senyawa Karbonil Protein dan DNPH (Nollet & Toldra, 2009)

Penambahan ekstrak kulit batang ketapang sebagai antioksidan menangkap senyawa radikal yang terbentuk sebelum senyawa tersebut merusak protein lebih lanjut. Karena adanya senyawa fenolat dari ekstrak, sehingga radikal bebas yang terbentuk akan bereaksi dengan senyawa fenolat tersebut membentuk produk yang stabil dan radikal fenolat yang tak reaktif karena terstabilkan oleh resonansi. Akibatnya reaksi radikal terhadap BSA akan semakin berkurang yang menyebabkan sedikit saja terbentuk senyawa karbonil yang selanjutnya akan bereaksi dengan sedikit DNPH pula maka produk dinitrofenilhidrazon yang dihasilkan juga sedikit sehingga absorbansinya rendah. Menurut Suhartono *et al.* (2007), mekanisme antioksidan pada metode uji ini adalah melalui *scavenging* radikal bebas OH yang terbentuk dan pemutusan rantai H_2O_2 serta *chelating* ion logam.

Berdasarkan hasil identifikasi senyawa dari kulit batang ketapang, diketahui senyawa fenolik yang terkandung dalam kulit batang ketapang adalah asam galat dan senyawa flavonoid jenis flavonol (kemferol) yang merupakan senyawa yang dalam molekulnya memiliki fenol, sedangkan fenol adalah senyawa dengan inti benzena yang mempunyai gugus $-OH$. Mekanisme antioksidan senyawa ini yakni melalui pemutusan rantai radikal peroksil dan *scavenger*. Kemferol yang termasuk golongan flavonoid adalah senyawa organik bahan alam dan merupakan senyawa polifenol (senyawa fenolik yang mempunyai lebih dari satu gugus hidroksil).

Struktur senyawa fenolik mempengaruhi aktivitas antioksidan. Untuk golongan flavonoid, perbedaan tersebut bergantung pada struktur dan substituen pada cincin heterosiklik (cincin C) dan cincin B. Struktur dan variasi gugus OH dari senyawa flavonoid yakni kemferol yang menentukan potensi antioksidan dan perendaman radikal bebas adalah (a) gugus o-hidroksi ($4'-OH$) pada cincin B yang mempunyai sifat donor elektron, (b) ikatan rangkap C2-C3 yang berkonjugasi dengan gugus 4-okso pada cincin heterosiklik (cincin C), dan (c) tambahan gugus 3-OH dicincin C dan 5-OH dicincin A untuk memaksimalkan potensi *scavenging* radikal bebas senyawa kemferol. Hal ini senada dengan yang diungkapkan oleh Middleton *et al.* (2000). Sedangkan asam galat berpotensi sebagai antioksidan, karena senyawa ini memiliki tiga gugus hidroksil serta adanya gugus OH yang berposisi para dengan gugus karboksilat sehingga meningkatkan aksi penangkapan radikal bebas, dimana hal ini juga dinyatakan oleh Kim (2007). Berdasarkan hasil penelitian Cos *et al.* (1998), senyawa kemferol memiliki kemampuan sebagai antioksidan dengan IC_{50} sebesar $0,84 \times 10^{-3}$ mM. Sedangkan, IC_{50} dari asam galat sebagai antioksidan adalah $3,59 \times 10^{-3}$ mM (Kim, 2007). Menurut Vaijanathappa *et al.* (2008), harga IC_{50} dari flavonol yang terkandung dalam *Enicostemma axillare* sebagai antioksidan adalah sebesar 60,86 mM. Berdasarkan harga IC_{50} tersebut, dapat dikatakan bahwa urutan kekuatan antioksidan dari senyawa tersebut adalah kemferol > asam galat > flavonol.

Pada pengujian aktivitas *chelating* logam, semua konsentrasi ekstrak etanol kulit batang efektif sebagai *chelator* walaupun lebih rendah dari antioksidan pembanding yaitu vitamin E. Adapun grafik hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak etanol kulit batang ketapang dengan aktivitas *chelator* logam yang dapat dilihat pada Gambar 7 berikut :



Gambar 7. Hubungan aktivitas *chelating* logam dengan perubahan konsentrasi

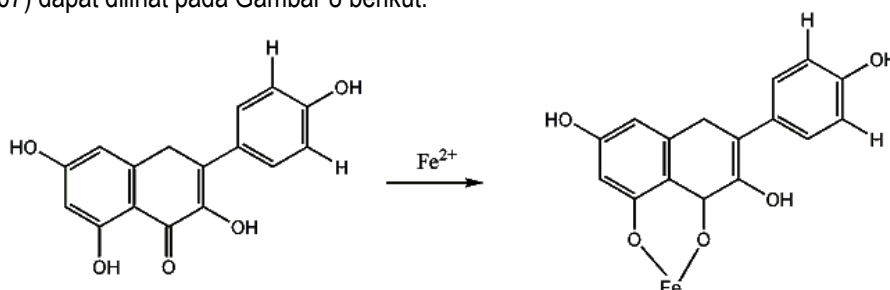
Berdasarkan hasil perhitungan, terdapat hubungan yang kuat antara peningkatan konsentrasi ekstrak dengan aktivitas *chelating* logam yang ditunjukkan oleh nilai korelasi positif yaitu sebesar +0,9695. Dengan persamaan regresi linier aktivitas *chelating* logam kulit batang ketapang yaitu $IC = 0,037C + 13,19$, dapat dihitung IC_{90} -nya yakni sebesar 2075,9 ppm. Harga IC_{90} tersebut menunjukkan bahwa untuk

mengikat ion besi(II) sebesar 90% diperlukan konsentrasi ekstrak etanol kulit batang ketapang sebesar 2075,9 ppm. Konsentrasi ini lebih besar bila dibandingkan dengan antioksidan standar (vitamin E) yakni dengan nilai $IC_{90}=1365,6$ ppm.

Pada penelitian ini, ion besi(II) yang dicampurkan dengan senyawa o-fenantrolin akan membentuk suatu kompleks berwarna merah jingga yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 562 nm. Berikut ini reaksi pembentukan kation kompleks o-fenantrolin-besi(II) yang digambarkan oleh Vogel (1990) : $Fe^{2+} + 3C_{18}H_8N_2 \rightarrow [Fe(C_{18}H_8N_2)_3]^{2+}$.

Penambahan ekstrak etanol kulit batang ketapang dapat menyebabkan senyawa kompleks o-fenantrolin-besi(II) terurai sehingga warna merah jingganya akan memudar. Hal ini ditunjukkan dengan absorbansinya yang semakin berkurang. Jadi, dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol kulit batang ketapang dapat berperan sebagai chelator logam yang mampu menangkap ion besi(II) sehingga tidak terbentuk kompleks berwarna o-fenantrolin dengan Fe^{2+} .

Mekanisme *chelating* logam dari ekstrak etanol kulit batang ketapang adalah dengan cara pengelatan ion logam yakni ion logam Fe^{2+} . Adapun mekanisme pengikatan logam oleh senyawa flavonoid yakni senyawa kemferol golongan flavonol berdasarkan pola mekanisme yang disarankan oleh Suhartono *et al.* (2007) dapat dilihat pada Gambar 8 berikut:

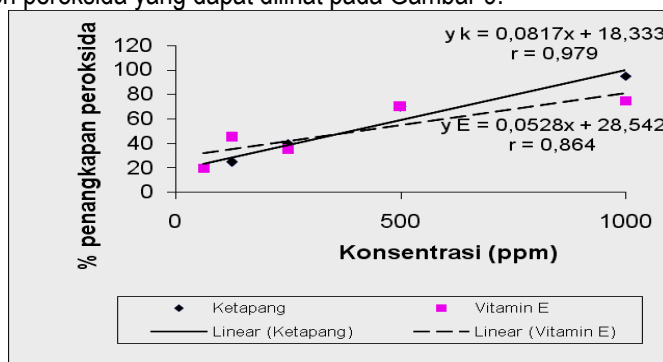


Gambar 8. Mekanisme Pengikatan Logam oleh Flavonoid (Suhartono *et al.*, 2007)

Radikal $OH^\bullet$ merupakan oksidan yang sangat kuat dan dapat bereaksi dengan hampir semua substrat biologi sehingga dapat menyebabkan berbagai kerusakan sel (Suhartono *et al.*, 2007). Radikal hidroksil ($OH^\bullet$) didalam tubuh diproduksi melalui reaksi Fenton yakni reaksi antara ion besi(II) dengan H_2O_2 (Yunanto *et al.*, 2009). Reaksinya : $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^\bullet + OH^-$. Pembentukan radikal $OH^\bullet$ ini dapat dibatasi dengan cara mengurangi katalis reaksi oksidasi yakni ion logam Fe^{2+} .

Berdasarkan hasil penelitian ini, ekstrak etanol kulit batang ketapang dapat berfungsi sebagai antioksidan *chelator* yaitu antioksidan yang bekerja dengan cara mengikat logam yang berperan sebagai katalis reaksi oksidasi untuk mengurangi jumlah ion logam Fe^{2+} sehingga dapat membatasi pembentukan radikal hidroksil dari reaksi logam dengan hidrogen peroksida.

Hasil uji aktivitas *scavenging* H_2O_2 dari kulit batang ketapang yang diukur melalui metode Ruch menunjukkan bahwa semua konsentrasi ekstrak efektif sebagai antioksidan (Tabel 10). Kemudian dibuat grafik hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak etanol kulit batang ketapang dengan aktivitas penangkapan hidrogen peroksida yang dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Hubungan aktivitas *scavenging* H_2O_2 kulit ketapang dengan perubahan konsentrasi

Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh koefisien korelasi antara konsentrasi ekstrak etanol kulit batang ketapang dengan aktivitas *scavenging* H_2O_2 yaitu +0,979. Nilai korelasi positif ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat dimana peningkatan konsentrasi ekstrak akan diikuti dengan peningkatan aktivitas antioksidan.

Berdasarkan persamaan regresi linier yaitu $IC=0,0817C+18,333$ dapat dihitung besarnya konsentrasi yang diperlukan kulit batang ketapang untuk menangkap 50% radikal H_2O_2 yakni sebesar 387,6 ppm. Konsentrasi ini lebih kecil sedikit dibandingkan dengan antioksidan standar vitamin E yaitu 406,4 ppm. Jadi, IC_{50} dari ekstrak etanol kulit batang ketapang sebagai *scavenging* hidrogen peroksida adalah sebesar 387,6 ppm.

Pada penelitian ini, terjadi penangkapan hidrogen peroksida oleh senyawa antioksidan dari ekstrak etanol kulit batang ketapang. Pengikatan H_2O_2 oleh antioksidan dari ekstrak ditandai dengan penurunan kadar H_2O_2 yang diukur serapannya pada panjang gelombang 340 nm.

Mekanisme dari kerja antioksidan kulit batang ketapang adalah melalui pemutusan rantai propagasi dari radikal bebas, yakni dengan berperan sebagai donor/akseptor atom hidrogen, sehingga terjadi *scavenging* terhadap hidrogen peroksida. Jadi, dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol kulit batang ketapang merupakan suatu antioksidan H_2O_2 *scavenger* karena dapat mengikat hidrogen peroksida sehingga tidak mendukung terjadinya reaksi oksidasi lebih lanjut. Adapun mekanisme pengikatan radikal bebas oleh senyawa flavonoid yang digambarkan oleh Michalak (2006), dapat dilihat pada reaksi berikut:

$$2\text{FlavOH} + H_2O_2 \rightarrow 2\text{FlavO}\cdot + 2H_2O$$

Hidrogen peroksida adalah senyawa turunan oksigen yang bersifat oksidan kuat, tetapi bereaksi lambat dengan substrat organik. Namun, bila dalam kadar tinggi dan terakumulasi dengan logam, maka senyawa ini dapat berbahaya karena dapat memicu terbentuknya radikal hidroksil yang berbahaya bagi tubuh. Oleh karena itu, untuk mengurangi kadar H_2O_2 diperlukan suatu antioksidan hidrogen peroksida *scavenger*. Suatu antioksidan H_2O_2 *scavenger* merupakan senyawa yang dapat mengikat hidrogen peroksida sehingga tidak mendukung terjadinya reaksi oksidasi oleh radikal bebas (Suhartono *et al.*, 2007).

Aktivitas *scavenging* H_2O_2 ditunjukkan oleh senyawa fenolik yang terkandung di dalam ekstrak kulit batang ketapang yang dapat mendonorkan elektronnya ke hidrogen peroksida. Menurut Gulcin *et al.* (2004), kemampuan *scavenging* H_2O_2 dari suatu ekstrak ditunjukkan oleh bentuk struktur dari komponen aktif yang dapat mendonorkan elektron. Berdasarkan hasil identifikasi senyawa dari kulit batang ketapang, bentuk struktur dari komponen aktif yang dapat mendonorkan elektron tersebut adalah dari senyawa golongan flavonoid jenis flavonol dan asam galat yang memiliki gugus hidroksil.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa komponen senyawa fenolik yang teridentifikasi dari kulit batang ketapang (*Terminalia catappa* Linn.) adalah golongan asam hidroksibenzoat (asam galat), golongan flavonoid jenis flavonol (kemferol), dan 3,7,4'-trihidroksiflavonol serta ekstrak etanol kulit batang ketapang berpotensi sebagai antioksidan dengan harga IC_{50} untuk aktivitas antioksidan total yaitu 776,58 ppm dan *scavenging* hidrogen peroksida yakni 387,6 ppm, dimana harga ini lebih baik dibandingkan dengan vitamin E, sedangkan aktivitas *chelating* logam kulit batang ketapang tidak lebih baik dibandingkan dengan vitamin E dengan harga IC_{90} adalah 2075,9 ppm. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengekstrak komponen senyawa dari kulit batang ketapang dengan menggunakan pelarut ekstraksi yang berbeda misalnya metanol, mengidentifikasi komponen senyawa yang terdapat di dalam kulit batang ketapang dengan metode pemisahan yang berbeda seperti menggunakan HPLC, melakukan pengujian aktivitas antioksidan dari kulit batang ketapang dengan metode yang berbeda seperti metode DPPH, dan mengisolasi tiap komponen senyawa yang terdapat dalam kulit batang ketapang dan menguji daya aktivitas antioksidan tiap senyawa tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J., dan Berghe, D.V. 1998. *Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers*. Journal of Natural Products 61: 71-76.

- Dykes, L., Rooney, L.W., Waniska, R.D., dan Rooney, W.L. 2005. *Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Sorghum Grains of Varying Genotypes*. Journal of Agricultural & Food Chemistry 53: 6813-6818. <http://soilcrop.tamu.edu/research/cereal/publications> Diakses tanggal 5 Desember 2009.
- Gülçin, I., Küfrevioğlu Ö.I., Oktay, M., Büyükkökuroğlu, M.E. 2004. *Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (Urtica dioica L.)*. Journal of Ethnopharmacology 90: 205–215. http://esa.ipb.pt/pdf/RefPlants_20.pdf. Diakses tanggal 5 Desember 2009.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia*. Penerjemah Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: ITB.
- Kim, Y.J. 2007. *Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid*. Biological and Pharmaceutical Bulletin 30 (6): 1052-1055. http://bpb.pharm.or.jp/bpb/200706/b06_1052.pdf. Diakses tanggal 5 Januari 2010.
- Ko, T.F., Weng, Y.M., dan Chiou, R.Y.Y. 2002. *Squalene Content and Antioxidant Activity of Terminalia catappa Leaves and Seeds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(19): 5343-5348. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0203500>. Diakses tanggal 28 Januari 2010.
- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S., dan Cosic, V. 2001. *Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids*. Journal Clin Pathol 54: 356–361. <http://jcp.bmj.com/cgi/reprint/54/5/356.pdf>. Diakses tanggal 5 Desember 2009.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M. dan Kurniadi, B. 2008. *Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Langseth, L. 1995. *Oxidant, Antioxidant, and Disease Prevention*. Belgium: International Life Science Institute Press. <http://74.125.155.132/scholar?> Diakses tanggal 22 Mei 2009.
- Lin, C.C., Hsu, Y.F., dan Lin, T.C. 2001. *Antioxidant and Free Radical Scavenging Effects of The Tannin of Terminalia catappa L.* Anticancer Res 21(1A): 237-243. <http://grande.nal.usda.gov/ibids/index.php?> Diakses tanggal 5 Januari 2010.
- Malik, A., Soediro, I., Padmawinata, K. dan Sukandar, E.Y. 1993. *Pemeriksaan Kandungan Kimia dan Aktivitas Daun Terminalia catappa Linn dan Daun Pluchea indica Less.* <http://bahan-alam/fa.itb.ac.id/detail.php?id=139>. Diakses tanggal 22 Mei 2009.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Penerjemah Kosasih z
- Michalak, A. 2006. *Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress*. Journal of Environment Study 15 (4): 523-530. www.pjoes.com/pdf/15.4/523-530.pdf. Diakses tanggal 8 Januari 2010.
- Middleton, E.JR., Kandaswami, C., dan Theoharides, T.C. 2000. *The Effects of Plant Flavonoid on Mammalian Cells: Implication for Inflammation, Heart Disease, and Cancer*. Pharmacol Rev 52: 673-751. http://www.algonot.com/pdf/Flavonoids_PharmRev%202000.pdf. Diakses tanggal 9 Januari 2010.
- Naz, S. 2005. *Structure and Functionality of The Pigments Isolated from Onosma hispidum (Ratanjot), Terminalia catappa (Jangli Badam), and Other Tropical Plants*. Tesis. Universitas Karachi. <http://pr.hec.gov.pk/Chapters/1025-0.pdf>. Diakses tanggal 5 Januari 2010.
- Nollet, L.M.L. dan Toldra, F. 2009. *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis*. USA: CRC Press. <http://books.google.co.id>. Diakses tanggal 10 Januari 2009.
- Poumorad, F., Hosseini-mehr, S.J. dan Shahabimajd, N. 2006. *Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Selected Iranian Medicinal Plants*. African Journal Of Biotechnology Vol 11: 1142-1145. <http://www.bioline.org.br/pdf?jb06211>. Diakses tanggal 22 Mei 2009.
- Reynertson, K.A. 2007. *Phytochemical Analysis of Bioactive Constituents from Edible Myrtaceae Fruit*. New York: The City University of New York.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Penerjemah Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rohman, A., Riyanto, S. dan Utari, D. 2006. *Aktivitas Antioksidan, Kandungan Fenolik Total Dan Kandungan Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Buah Mengkudu Serta Fraksi-Fraksinya*. Majalah Farmasi Indonesia Vol 17 (3): 136-142. <http://mfi.farmasi.ugm.ac.id/cetak.php?id=114>. Diakses tanggal 22 Mei 2009.

- Suhartono, E., Fachir, H., dan Setiawan, B. 2007. *Kapita Selekta Biokimia Stres Oksidatif: Dasar & Penyakit*. Banjarmasin: Pustaka Banua.
- Tuminah, S. 2000. *Radikal Bebas Dan Antioksidan: Kaitannya Dengan Nutrisi Dan Penyakit Kronis*. Cermín Dunia Kedokteran No. 128 2000: 49-51. <http://www.kalbe.co.id> Diakses tanggal 30 Agustus 2009.
- Vinson, J., Jang, J., Yang, J., Dabbagh, Y., Liang, X., Serry, M., Proch, J., dan Cai, S. 1999. *Vitamins and Especially Flavonoids in Common Beverages are Powerful in Vitro Antioxidants Which Enrich Low Density Lipoproteins and Increase Their Oxidative Resistance After ex Vivo Spiking in Human Plasma*. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 47: 2502–2504. <http://webs.uvigo.es/servicios/biblioteca/sumarios/8561477.HTM>. Diakses tanggal 28 Mei 2009.
- Vogel. 1990. *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro*. Terjemahan Setiono dan Hadyana Pudjaatmaka. Jakarta: Kalman Media Pusaka.
- Yunanto, A., Setiawan, B. dan Suhartono, E. 2009. *Kapita Selekta Biokimia: Peran Radikal Bebas pada Intoksikasi & Patobiologi Penyakit*. Banjarmasin: Pustaka Banua.