

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN TELAAH FITOKIMIA *Sargassum crassifolium* J. G. Agardh. RUMPUT LAUT ALAM ASAL PANTAI BATU KARAS KECAMATAN CIJULANG KABUPATEN CIAMIS

Saeful Amin

Email : @saefulamin@stikes-bth.ac.id

Program Studi S1 Farmasi

STIKes Bakti Tunas Husada Tasikmalaya

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian yang bertujuan menguji aktivitas peredam radikal bebas dari rumput laut alam asal Pantai Batu Karas Kecamatan Cijulang Kabupaten Ciamis secara *in vitro* dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Rumput laut alam yang digunakan dalam penelitian ini adalah (1) *Sargassum polycystum* C. A. Agardh., (2) *Sargassum polycystum* C. A. Agardh (Oseng; daun runcing seperti jarum), (3) *Sargassum crassifolium* J. G. Agardh., (4) *Rhodomenia palmata* (Linnaeus) Greville., (5) *Grateloupia filicina* (Wulfen) C. Agardh (berambut), (6) *Grateloupia filicina* (Wulfen) C. Agardh (berbintil), (7) *Gelidium rigidum* (Vahl.) Grev., dan (8) *Laurencia splendens* Holl.

Pengujian aktivitas secara kualitatif dilakukan dengan kromatografi lapis tipis terhadap ekstrak metanol delapan spesies sampel dengan eluen CHCl_3 : MeOH (8:2) kemudian kromatogram disemprot dengan DPPH 0,2%. Sampel yang memiliki aktivitas peredaman tertinggi difraksinasi dengan n-heksana-air (1:1) dan etil asetat kemudian fraksi diuji secara kuantitatif secara spektrofotometri UV-Visibel pada panjang gelombang 517 nm.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa kedelapan sampel memiliki aktivitas peredaman terhadap radikal bebas DPPH yang ditandai dengan bercak berwarna kuning dengan latar belakang violet setelah disemprot dengan DPPH. *Sargassum crassifolium* J. G. Agardh memiliki aktivitas peredaman tertinggi dan diuji lanjut dengan variasi konsentrasi uji setiap fraksi, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air yaitu 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 500 ppm. Fraksi air memiliki aktivitas peredaman radikal bebas DPPH paling tinggi dengan nilai IC_{50} 13,38 ppm, sedangkan fraksi etil asetat memiliki aktivitas peredaman rendah dengan nilai IC_{50} 86,07 ppm dan fraksi n-heksan tidak menunjukkan memiliki aktivitas peredaman terhadap radikal bebas DPPH.

Kata kunci : Radikal bebas, Rumput laut, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

ABSTRACT

Research with aim to test radical scavenger from natural seaweed from Batu Karas Coast of Cijulang Ciamis by *in vitro* with method of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) have been conducted. Natural Seaweeds which used in this research are (1) *Sargassum polycystum* C. A. Agardh., (2) *Sargassum polycystum* C. A. Agardh (Oseng; sharp-pointed leaf like needle), (3) *Sargassum crassifolium* J. G. Agardh., (4) *Rhodomenia palmata* (Linnaeus) Greville., (5) *Grateloupia filicina* (Wulfen) C. Agardh (hairy), (6) *Grateloupia filicina* (Wulfen) C. Agardh have (nodule), (7) *Gelidium rigidum* (Vahl.) Grev., and (8) *Laurencia Holl splendens*.

Examination qualitative test of antioxidant activity with thin layer chromatografi to methanol extract eight species of sampel use eluen CHCl_3 : MeOH (8:2), then chromatogram sprayed with DPPH 0.2%. Sampel owning highest antioxidant activity fractioned with n-hexana-water (1:1) and ethyl acetate, then faction tested quantitatively by spektrofotometri UV-Visibel at wavelength 517 nm.

Result of examination indicate that eighly of sample have antioxidant activity, scavenge free radical DPPH, the spot on chromatogram yellow colored with violet backgoround. *Sargassum crassifoium* J. G. Agardh have highest antioxidant activity and tested with concentration variation of fraction are 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm and 500 ppm. Water fraction have highest antioxidant activity with IC_{50} value 13.38 ppm.

Keyword : Free radical, Seaweed, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

PENDAHULUAN

Dewasa ini, dunia kedokteran dan kesehatan banyak membahas tentang radikal bebas (*free radical*) dan antioksidan. Sebagian besar penyakit diawali oleh adanya reaksi oksidasi yang berlebihan di dalam tubuh. Reaksi oksidasi terjadi setiap saat. Reaksi ini mencetuskan terbentuknya radikal bebas yang sangat aktif, yang dapat merusak struktur dan fungsi sel. Reaktivitas radikal bebas itu dapat dihambat oleh sistem antioksidan yang melengkapi kekebalan tubuh (Winarsi, 2007).

Antioksidan merupakan senyawa penting dalam menjaga kesehatan tubuh karena berfungsi sebagai penangkap radikal bebas yang banyak terbentuk dalam tubuh (Hernani dan Mono, 2006). Keseimbangan oksidan dan antioksidan sangat penting karena berkaitan dengan berfungsinya sistem imunitas tubuh. Dalam pengertian kimia, senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donors*). Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh (Winarsi, 2007).

Antioksidan dapat berbentuk gizi seperti vitamin E dan C, non-gizi (pigmen karoten, likopen, flavonoid, dan klorofil), dan enzim (*glutation peroksidase*, koenzim Q10 atau *ubiquinon*). Antioksidan dapat dibagi menjadi 3 golongan, yaitu antioksidan preventif (enzim *superoksidadismutase*, *katalase*, dan *glutation peroksidase*), antioksidan primer (vitamin A, fenolat, flavonoid, katekin, kuersetin), dan antioksidan komplementer (vitamin C, β -karoten, retinoid) (Tamat, S., dkk., 2007).

Menurut Ardiansyah (2007), sumber-sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami). Bahan-bahan dari laut seperti makro alga merupakan salah satu sumber antioksidan alami. Rumput laut mengandung komponen bioaktif seperti karotenoid, serat, protein, asam lemak esensial, vitamin dan mineral (Patra, *et al.*, 2008).

Sebagai salah satu upaya untuk mengoptimalkan pemanfaatan bahan alam laut Indonesia, dilakukan penelitian mengenai aktivitas antioksidan rumput laut alam asal Pantai Batu Karas Cijulang Ciamis. Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antioksidan beberapa spesies rumput laut alam yang berada di Pantai Batu Karas Kecamatan Cijulang Kabupaten Ciamis dengan menggunakan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) sebagai model radikal bebas.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan Tumbuhan : Bahan uji yang digunakan adalah (1) *Sargassum polycystum* C. A. Agardh., (2) *Sargassum polycystum* C. A. Agardh (Oseng; daun runcing seperti jarum), (3) *Sargassum crassifolium* J. G. Agardh., (4) *Rhodomenia palmata* (Linnaeus) Greville., (5) *Grateloupia filicina* (Wulfen) C. Agardh (berambut), (6) *Grateloupia filicina* (Wulfen) C. Agardh (berbintil), (7) *Gelidium rigidum* (Vahl.) Grev., dan (8) *Laurencia splendens* Holl.

Bahan Kimia : DPPH (Sigma), vitamin C, metanol (Merck), n-heksan (Merck), etil asetat (Merck), etanol (Merck), asam klorida, amoniak, kloroform (Merck), pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, serbuk magnesium, amil alkohol, besi (III) klorida, gelatin, natrium asetat, natrium hidroksida, eter, pereaksi Liebermann-Burchard, asam sulfat dan pereaksi Molisch.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, erlenmeyer, rak tabung, plat KLT fase diam silika gel GF₂₄₅, neraca analitik, pipet volum, kuvet dan spektrofotometer UV-Visibel (UV-1601, Shimadzu).

Pembuatan Ekstrak : Ekstraksi sampel dilakukan dengan cara maserasi. Timbang 500 g serbuk simplisia kemudian dimaserasi dengan 500 ml metanol selama 24 jam. Ekstrak disaring ampas dimaserasi ulang sebanyak dua kali (Tamat, dkk., 2007). Ekstrak yang diperoleh disatukan

kemudian dipekatkan dengan penguap vakum.

Pengujian Antioksidan

Uji kualitatif Antioksidan

Uji kualitatif antioksidan dilakukan dengan cara kromatografi lapis tipis. Ekstrak ditotolkan pada pelat KLT, kemudian dikembangkan dengan n-heksana : etil asetat (2:8). Bercak yang diperoleh disemprot dengan DPPH. Sampel yang memiliki aktivitas antioksidan akan memberikan warna kuning dengan latar belakang ungu dari DPPH.

Uji Kuantitatif Antioksidan

Uji kuantitatif antioksidan dilakukan secara spektrofotometri dengan metode DPPH. Pada tahap ini dilakukan beberapa langkah kerja sebagai berikut :

Pembuatan larutan uji dan larutan senyawa pembanding

Dibuat larutan senyawa uji dalam berbagai konsentrasi. Tiap fraksi dibuat orientasi konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 500 ppm. Senyawa pembanding antioksidan yang digunakan adalah vitamin C. Vitamin C dibuat variasi konsentrasi 0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,3 ppm, 0,4 ppm dan 0,5 ppm.

Pembuatan larutan DPPH

DPPH sebanyak 4,0 mg dilarutkan dalam metanol sampai 100,0 ml sehingga didapat larutan 0,004% (40,0 ppm). Larutan dijaga pada suhu rendah, terlindung dari cahaya untuk segera digunakan (Windono, dkk., 2004).

Pengukuran λ maksimum DPPH

Larutan DPPH sebanyak 3,0 ml ditambahkan metanol 1,5 ml, dihomogenkan, dan diamati absorbansinya pada rentang λ 400-600 nm (Windono, dkk., 2004).

Pengukuran absorbansi peredaman radikal bebas senyawa uji

Larutan uji sebanyak 1,5 ml dalam berbagai konsentrasi ditambah 3,0 ml larutan DPPH, dihomogenkan, diinkubasi selama 30 menit kemudian diukur absorbansinya pada λ maksimum (Windono, dkk., 2004).

Pengukuran absorbansi peredaman radikal bebas senyawa pembanding

Larutan senyawa pembanding sebanyak 1,5 ml dalam berbagai konsentrasi ditambah 3,0 ml larutan DPPH 40,0 ppm, dihomogenkan, diinkubasi selama 30 menit

kemudian diukur absorbansinya pada λ maksimum (Windono, dkk., 2004).

Analisis data

Berdasarkan data absorbansi yang diperoleh, dihitung % peredaman radikal bebas menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Peredaman} = \left[1 - \frac{A_{\text{sampel}}}{A_{\text{DPPH}}} \right] \times 100\%$$

Dari data % peredaman yang diperoleh dihitung persamaan regresinya terhadap konsentrasi larutan uji, mengikuti persamaan $Y = bx + a$ Dimana : $Y = \% \text{ peredaman}$,

$$x = \text{Log konsentrasi larutan uji.}$$

(Herliani, dkk., 2006; Windono, dkk., 2004).

Dari semua data hasil percobaan kemudian ditentukan IC_{50} , yaitu konsentrasi inhibisi larutan uji yang mampu meredam 50% radikal bebas DPPH. Suatu sampel dikatakan aktif sebagai antioksidan jika memiliki nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$, aktif lemah jika memiliki nilai $IC_{50} 100 - 200 \mu\text{g/ml}$ dan tidak aktif jika memiliki nilai $IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$ (Hanani, dkk., 2005; Herliani, dkk., 2006; Windono, dkk., 2004).

Pemurnian

Fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} paling kecil dimurnikan dengan kromatografi kolom dengan elusi gradien dari nonpolar ke polar. Hasil kolom dipreparatif dengan KLT menggunakan eluen butanol-asam asetat-air (BAA) lapisan bawah : aseton (1:4). Pemurnian juga dilakukan dengan ekstraksi cair-cair fraksi air dengan n-butanol. Fraksi yang paling aktif dipreparatif menggunakan eluen BAA-Aseton 9:2,5.

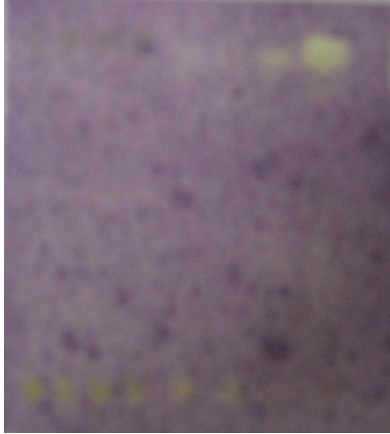
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Ujian Kualitatif Antioksidan

Kromatografi lapis tipis sampel no. 1 sampai 8 menggunakan eluen kloroform : metanol (8 : 2) menunjukkan semua sampel potensif, memiliki aktivitas antioksidan setelah disemprot dengan DPPH. Hal ini ditunjukkan dengan berubahnya warna bercak menjadi

berwarna kuning dengan latar belakang violet setelah disemprot dengan DPPH dan disimpan ditempat gelap selama 15 menit. Hasil kromatografi dapat dilihat pada gambar 1.



1 2 3 4 5 6 7 8

Gambar 1. Hasil kromatografi lapis tipis sampel 1-8 setelah disemprot dengan DPPH

Dilihat dari intensitas warna kuning dalam kromatogram yang telah disemprot dengan DPPH tampak bahwa intensitas warna kuning sampel no. 8 lebih besar dari sampel yang lain. Pengujian antioksidan secara kuantitatif terhadap ekstrak metanol sampel 1-8 dilakukan untuk melengkapi data sampel yang mana yang diuji lebih lanjut secara kuantitatif dengan metode DPPH.

Tabel 1. Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Sampel 1-8

Sampel No.	Absorban	% Peredaman
1	0,2986	74,41
2	0,2626	75,78
3	0,2476	78,78
4	0,4416	62,16
5	0,3840	67,09
6	0,3766	67,73
7	0,5223	55,25
8	0,3123	73,27

Berdasarkan hasil pengujian tersebut, diketahui bahwa sampel no. 3 memiliki nilai persen peredaman paling tinggi diantara sampel 1-8, sehingga yang diuji lebih lanjut mengenai aktivitas antioksidannya adalah sampel no. 3 yaitu *Sargassum crassifolium* J. G. Agardh (alga coklat). Menurut penelitian Shanab (2007) menyebutkan bahwa aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dari alga coklat spesies *Sargassum sp.* lebih tinggi daripada alga merah.

Uji Kuantitatif Antioksidan

Metode DPPH merupakan metode yang sederhana untuk pengujian aktivitas

antioksidan. Sampel setelah direaksikan dengan DPPH sebagai model radikal bebas dan diinkubasi selama 30 menit kemudian diukur absorbannya pada panjang gelombang 517 nm. Inkubasi selama 30 menit pada tempat gelap merupakan waktu yang dibutuhkan oleh sampel yang mengandung zat antioksidan untuk meredam radikal bebas DPPH. Hasil pengujian aktivitas antioksidan terhadap fraksi n-heksana, etil asetat dan air dapat ditunjukkan pada tabel 2, konsentrasi yang digunakan adalah 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 500 ppm. Persen peredaman sampel terhadap radikal bebas DPPH dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 2. Nilai Absorbansi Fraksi sampel no. 3

Konsentrasi (ppm)	Absorban Fraksi		
	n-heksana	Etil asetat	Air
1	0,5812	0,5859	0,5946
10	0,6129	0,5659	0,4923

100	0,5787	0,4722	0,3436
500	0,6371	0,2981	0,1315

Tabel 3. Nilai % Peredaman Radikal Bebas DPPH Fraksi sampel no. 3

Konsentrasi (ppm)	% Peredaman		
	n-heksana	Etil asetat	Air
1	33,95	33,42	32,43
10	30,35	35,69	44,06
100	34,24	46,34	60,95
500	27,60	66,13	85,06
Nilai IC ₅₀ (ppm)	2,51 x 10⁻¹¹	86,07	13,38

Dari tabel nilai absorbansi dapat dilihat kemampuan sampel dalam meredam radikal bebas DPPH. Absorban menurun berbanding lurus dengan konsentrasi sampel uji. Fraksi air konsentrasi 500 ppm memiliki nilai persen peredaman paling tinggi, yaitu mencapai 85,06%. Nilai persen peredaman fraksi etil asetat paling tinggi adalah 66, 13%, lebih kecil dari aktivitas peredaman fraksi air. Fraksi n-hexan memiliki nilai persen peredaman yang naik turun, hal ini diperkirakan dalam fraksi n-heksan terdapat lipid yang dapat menambah radikal saat pengujian.

Metode DPPH merupakan metode pengujian aktivitas antioksidan yang sederhana dan pengerjaannya relatif mudah. Adanya delokalisasi elektron diseluruh bagian molekul DPPH memberikan warna ungu tua (dalam metanol), yang ditandai dengan adanya pita absorpsi di sekitar panjang gelombang 520 nm (Molyneux (2004) dalam Amrun dan Umiyah, 2005). Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal bebas DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning yang diukur pada panjang gelombang 517 nm (Blois (1958) dalam Hanani, dkk., 2005).

Kekuatan aktivitas antioksidan suatu zat dilihat dari nilai IC₅₀-nya, yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam 50 persen radikal bebas. Berdasarkan data regresi linier antara log konsentrasi dan persen peredaman setiap fraksi, maka fraksi air memiliki nilai IC₅₀ paling kecil, yaitu 13,38 ppm, yang menunjukkan bahwa fraksi air memiliki aktivitas peredaman tertinggi diantara ketiga fraksi. Fraksi air merupakan fraksi polar. Berdasarkan penelitian Shanab (2007), dalam fraksi polar *Sargassum dentifolium* mengandung klorofil, karotenoid dan total polifenol yang bertanggungjawab terhadap aktivitas antioksidan. Jumlah senyawa tersebut dalam fraksi etil asetat (semi polar) diperkirakan lebih rendah atau jumlahnya sangat kecil dibandingkan dengan fraksi polar, sehingga nilai IC₅₀ fraksi etil asetat jauh diatas fraksi air, yaitu 86,07 ppm.

Pembandingan yang digunakan adalah vitamin C. Hasil pengujian aktivitas peredaman vitamin C terhadap radikal bebas DPPH diperoleh nilai IC₅₀ vitamin C sebesar 0,19 ppm. Vitamin C memiliki aktivitas antioksidan jauh lebih tinggi daripada sampel. Sebagai antioksidan, vitamin C bekerja sebagai donor elektron (Winarsi, 2007).

Tabel 4. Nilai Absorban dan % Peredaman Vitamin C

Konsentrasi (ppm)	Absorban	% Peredaman	IC ₅₀
0,1	0,3672	41,99	0,19 ppm
0,2	0,3273	48,29	
0,3	0,2878	54,53	
0,4	0,2452	61,26	
0,5	0,2100	66,82	

Pemurnian

Fraksi air memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi. Pemurnian fraksi air untuk mengisolasi senyawa peredam radikal bebas dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan elusi gradien, eluen BAA (n-butanol:asam asetat:air 4:1:5) lapisan atas kemudian dilanjutkan dengan BAA lapisan bawah-aseton berbagai perbandingan.

Setelah plat KLT hasil pemantauan dikembangkan kemudian disemprot dengan DPPH, fraksi no. 7 dan 9 menunjukkan warna kuning dan pola kromatogram sama. Terhadap fraksi no. 9 dilakukan KLT preparatif dengan eluen BAA lapisan bawah-aseton 1:4. Setelah hasil preparatif dipantau, masih terdapat pengotor yang tidak aktif sebagai antioksidan serta bercak berada di bawah batas pengembangan.



1 3 5 7 9 11 13 15

Gambar 2. KLT pemantauan fraksi hasil kromatografi kolom Fraksi air setelah disemprot DPPH

Menurut Wright (1998), pemurnian garam dari fraksi polar ekstrak tumbuhan laut digunakan ekstraksi cair-cair (ECC) dengan n-butanol. Namun, setelah dilakukan ekstraksi dengan n-butanol kemudian fraksi dipekatkan, dalam fraksi masih terdapat garam yang membentuk kristal. Berdasarkan hasil pemantauan lapisan atas (lapisan n-butanol) dan lapisan bawah (lapisan air) hasil ECC dengan n-butanol, diketahui bahwa lapisan bawah yaitu lapisan air memiliki aktivitas lebih kuat daripada lapisan n-butanol. Hal ini ditunjukkan

dengan intensitas warna kuning pada bercak hasil pemantauan kedua lapisan setelah bercak disemprot dengan DPPH. Lapisan bawah (lapisan air) kemudian di-KLT preparatif menggunakan eluen BAA-Aseton 9:2,5. Setelah hasil preparatif dipantau, tetap masih terdapat 3 senyawa dan masih terdapat pengotor.



Gambar 3. KLT preparatif lapisan bawah hasil ECC fraksi air dengan n-butanol

SIMPULAN

Hasil pengujian kualitatif antioksidan menunjukkan semua sampel yaitu *Sargassum polycystum* C. A. Agardh., *Sargassum polycystum* C. A. Agardh. (Oseng; daun runcing seperti jarum), *Sargassum crassifolium* J. G. Agardh., *Rhodymenia palmata* (Linnaeus) Greville., *Grateloupia filicina* (Wulfen) C. Agardh (berambut), *Grateloupia filicina* (Wulfen) C. Agardh (berbintil), *Gelidium rigidum* (Vahl.) Grev., dan *Laurencia splendens* Holl. memiliki aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan bercak berwarna kuning berlatarbelakang violet setelah disemprot dengan DPPH.

Fraksi n-heksana, etil asetat dan air setelah dilakukan penapisan fitokimia mengandung steroid/triterpenoid, namun dalam fraksi air terdeteksi juga polifenol dan saponin. Dari hasil pengujian kuantitatif aktivitas antioksidan secara spektrofotometri dengan DPPH sebagai model radikal bebas dapat disimpulkan bahwa fraksi polar, fraksi air dari ekstrak *Sargassum crassifolium* J. G. Agardh memiliki aktivitas antioksidan tinggi yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} yaitu 13,38 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiansyah. *Antioksidan dan Peranannya bagi Kesehatan*. 2007. <http://www.IslamicSpaceOnline> [Diakses tanggal 23 Desember 2007].
- Franswoth, N., R. 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plant. *J. Pharm. Sci.*, Vol. 55 No. 1 : 245-266.
- Harbone, J. B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung : ITB; p. 152.
- Hanani, E., Abdul, M., dan Ryany, S. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia Sp* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian* Vol. II. No. 3 : 127,130.
- Herliani, L., Slamet, I., I Ketut, A., dan Elin, Y. 2006. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daging Buah Salak Varietas Bangkok (*Salacca edulis* Reinw.). *Acta Pharmaceutica Indonesia*, Vol. XXXI. No. 1 : 25.
- Hernani, dan Mono, R. 2006. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta : Penebar Swadaya; p. 8, 18.
- Molyneux, P. 2004. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn J. Technol.*, 26(2) : 211-219.
- Patra, J. K., Sakti, K. R., Karmabeer, J., Vijaya, K. R., dan Hrudayanath, T. 2008. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activity of Seaweed (*Sargassum sp.*) Extract : A Study on Inhibition of Glutathione-S-Transferase Activity. *Turk. J. Biol.* 32 (2008) : 1-5.
- Tamat, S., Thamrin, W., dan Lina, S. 2007. Aktivitas antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau *Ulva reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* Vol. 5 No. 1 : 31-32.
- Winarsi, Hery. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta : Kanisius; p. 11, 13, 15, 77-78, 137-138.
- Windono, T., Ryanto, B., Ivone, Sherly, V., dan Yovita, S. 2004. Studi Hubungan Struktur Aktivitas Kapasitas Peredaman Radikal Bebas Senyawa Flavonoid Terhadap 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Artocarpus*, Vol. 4 No. 2 September : 48.
- Wright, Amy, E. 1998. *Natural Product Isolation : Isolation of Marine Natural Product*. New Jersey : Humana Press; p. 382.