

PENGHAMBATAN ENZIM TIROSINASE dan AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK BUNGATELANG PUTIH (*Clitoria ternatea*) MENGGUNAKAN METODE DPPH

Bayu Febram Prasetyo*, Amrozi, Nur Anisa BS

Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

*Penulis Korepondensi : bayupr@apps.ipb.ac.id

Abstrak

Clitoria ternatea atau yang dikenal dengan nama bunga telang putih banyak dimanfaatkan dalam bidang kesehatan karena berbagai khasiatnya, antara lain sebagai antidiabetes, anti inflamasi, anti mikroba, antikanker, analgesik, antipiretik, dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan mengkaji aktivitas antioksidan dan inhibitor tirosinase ekstrak etanol bunga telang putih serta mengidentifikasi kandungan fitokimianya. Aktivitas antioksidan ditentukan dengan metode DPPH. Hasil penelitian ini menunjukkan ekstrak bunga telang putih memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah dengan nilai IC_{50} lebih dari 200 ppm. Hasil aktivitas inhibitor tirosinase menunjukkan bahwa ekstrak bunga telang putih tidak menghambat enzim tirosinase. Berdasarkan uji penapisan fitokimia, komponen kimia yang terkandung dalam ekstrak bunga telang putih adalah flavonoid, tanin, saponin, dan steroid. Ekstrak bunga telang putih memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah dan pengujian inhibitor tirosinase menunjukkan ekstrak bunga antioksidan dengan metode DPPH. Hasil pengujian inhibitor tirosinase menunjukkan ekstrak Bungatelang putih tidak memiliki aktivitas menghambat enzim tyrosinase.

Kata kunci: Antioksidan, *Clitoria ternatea*, DPPH, Fitokimia, Tirosinase

Abstract

Clitoria ternatea or known as the butterfly pea is widely used in the health sector due to its efficacy as antidiabetic, anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer, analgesic, antipyretic, and antioxidants. The purpose of this research is to examine the antioxidants and tyrosinase inhibitor activities of butterfly pea ethanol extract as well as to identify the phytochemical content. Antioxidants activities are determined by the DPPH method. The results of this study indicates that butterfly pea extract has very weak antioxidant activities with an IC_{50} value more than 200 ppm. The results of the tyrosinase inhibitor activities showed that the butterfly pea extract did not inhibit the tyrosinase enzyme. Based on the screening phytochemical tests, the chemical components contained in butterfly pea extract are flavonoids, tannins, saponins, and steroids. Bunga telang flower extract has very weak antioxidant activity and tyrosinase inhibitor testing showed antioxidant flower extract by DPPH method. Tyrosinase inhibitor assay results showed white Bungatelang extract has no activity to inhibit tyrosinase enzyme.

Keywords: Antioxidants, *Clitoria ternatea*, DPPH, Phytochemicals, Tyrosinase.

PENDAHULUAN

Pengaruh lingkungan seperti paparan sinar ultraviolet (UV), polutan, dan temperatur diketahui menimbulkan efek pada kesehatan karena menyebabkan pembentukan radikal bebas yang salah satu dampaknya adalah penuaan dini (Winarsi, 2007). Sinar UV juga dapat memicu tubuh menghasilkan pigmen melanin sehingga

menyebabkan kulit menjadi semakin gelap (Batubara & Adfa, 2013; Kusumawati et al., 2021). Proses sintesis melanin melibatkan peran enzim tirosinase (Chang, 2009).

Efek samping dari paparan sinar UV ini dapat dikurangi dengan aktivitas antioksidan dan inhibitor tirosinase. Antioksidan memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas

(Hidayah et al., 2023). Dalam perkembangannya, antioksidan dari bahan alami dan sintetis dalam bentuk sediaan topikal diketahui mampu melawan radikal bebas yang disebabkan sinar UV (Hanani *et al.*, 2005; Farhamzah et al., 2022). Sementara itu, inhibitor tirosinase dapat menghambat produksi melanin berlebih akibat sinar UV. Saat ini, berbagai studi menunjukkan senyawa aktif dalam tanaman dapat menghambat aktivitas tirosinase yang digunakan dalam sediaan pemutih kulit seperti ekstrak licorice, mulberi, teh hijau dan lain-lain (Chang, 2009). Kombinasi antioksidan dan inhibitor tirosinase dapat ditemukan baik pada bahan alami maupun sintetis. Namun, penggunaan bahan pengawet, antioksidan, dan inhibitor tirosinase sintetis tidak direkomendasikan karena diduga dapat memicu kanker (karsinogenik) (Winarsi, 2007).

Berbagai jenis tanaman berpotensi sebagai sumber antioksidan dan inhibitor tirosinase, salah satunya yaitu Bungatelang putih. Tanaman ini terkenal dengan ciri khas kelopak tunggal berwarna ungu. Selain sebagai tanaman hias, tumbuhan ini dipercaya oleh masyarakat sebagai obat mata dan banyak digunakan sebagai pewarna biru pada makanan (Mukherjee *et al.*, 2003). Beragam khasiat Bungatelang putih juga telah dilaporkan, seperti antibakteri, antikanker, antidiabetes, antiinflamasi, dan analgesik (Uma *et al.*, 2009; Shyamkumar & Ishwar, 2012). Bunga telang putih telah banyak dieksplorasi potensi sifat antioksidasinya untuk menggantikan senyawa antioksidan sintetis. Meskipun demikian, belum banyak penelitian mengenai inhibitor tirosinase pada Bungatelang putih. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan dan inhibitor tirosinase serta

mengidentifikasi senyawa fitokimia yang terdapat pada ekstrak Bungatelang putih.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada Agustus 2022 di Laboratorium Farmasi, Departemen Farmasi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Proses evaporasi dilakukan di Laboratorium Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor. Pengujian antioksidan dan inhibitor tirosinase dilakukan di Pusat Studi Biofarmaka Tropika, Institut Pertanian Bogor.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital, *blender*, peralatan metode maserasi, *evaporator*, *waterbath*, desikator, *vortex*, *microplate*, *micropipette*, inkubator, dan ELISA *microplate reader*. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak Bungatelang putih, vitamin C, asam kojat, etanol 96%, akuades, enzim tirosinase, dimetil sulfoksida (DMSO), L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), reagen uji fitokimia dan (2,2-difenil-1-pikrihidrasil) DPPH

Pembuatan ekstrak Bungatelang putih dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Simplisia bunga telang ditimbang dengan perbandingan bunga telang putih dan pelarut etanol 96% sebesar 1:10. Bunga telang putih dimasukkan ke dalam wadah yang berisi pelarut etanol 96%, lalu dimaserasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, bahan tersebut disaring untuk mendapatkan ekstrak. Proses maserasi dilakukan selama 3 kali. Filtrat hasil proses maserasi dievaporasi di PAU Bioteknologi IPB menjadi ekstrak kental Bungatelang putih dan disimpan dalam wadah tertutup. Selanjutnya, ekstrak Bungatelang putih digunakan dalam

pengujian antioksidan, inhibitor tirosinase, dan penapisan fitokimia.

Uji antioksidan metode DPPH (Salazar-Aranda *et al.*, 2011). Stok DPPH 125 μ M disiapkan dengan cara 2.5 mg DPPH dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur dan ditera hingga volume 50 mL, labu ukur kemudian dilapisi dengan aluminium foil. Preparasi sampel dan vitamin C dilakukan dengan cara masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg. Sampel dan vitamin C dilarutkan dengan DMSO sebanyak 1 mL. Campuran disonikasi hingga larut dan selanjutnya divorteks. Sampel dibuat dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm.

Sebanyak 100 μ L sampel dan vitamin C dimasukkan ke dalam *microplate*. Sampel ulangan satu dan dua ditambahkan DPPH sebanyak 100 μ L. Khusus kontrol negatif hanya ditambahkan etanol sebanyak 100 μ L. *Microplate* diinkubasi pada suhu ruang dalam kondisi gelap selama 30 menit. Setelah diinkubasi, dilakukan pengukuran dengan ELISA *microplate reader* dengan panjang gelombang 517 nm. Penentuan persentase inhibisi dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Menurut Wijaya (2014), hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi sampel sebagai absis (sumbu x) dan nilai persen inhibisi antioksidan sebagai ordinat (sumbu y). Persamaan regresi linier yang diperoleh dalam bentuk $y = a(x)+b$ digunakan untuk mencari *Inbition Concentration* 50% (IC_{50}) dari masing-masing sampel dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC_{50} . Nilai IC_{50} menyatakan besarnya konsentrasi larutan

sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi radikal bebas DPPH sebesar 50%.

Uji antioksidan penapisan fitokimia (Modifikasi Harborne, 1987) identifikasi alkaloid. Beberapa tetes ammonia ditambahkan ke 1 gram sampel lalu dihaluskan. Selanjutnya, sebanyak 5 mL kloroform ditambahkan dan disaring. Kemudian, filtrat ditambahkan dengan asam sulfat. Lapisan asam tersebut dibagi 3 bagian. Bagian 1 ditambahkan reagen Dragendrof, apabila warna jingga maka bereaksi positif. Bagian 2 ditambahkan reagen Mayer, apabila berwarna putih maka bereaksi positif. Bagian 3 ditambahkan reagen Wagner, apabila berwarna coklat maka bereaksi positif.

Identifikasi Flavonoid. Sebanyak 5 gram sampel ditambahkan akuades kemudian dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Hasil saringan ditambahkan serbuk magnesium, asam klorida:etanol (1:1), dan amil alkohol. Apabila muncul warna jingga, maka reaksi dinyatakan positif.

Identifikasi Tanin. Sebanyak 5 gram sampel ditambahkan aquades kemudian dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Hasil saringan ditambahkan 3 tetes besi (III) klorida 10%. Apabila muncul warna hitam kehijauan, maka reaksi dinyatakan positif.

Identifikasi Saponin. Sebanyak 5 gram sampel ditambahkan aquades kemudian dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Hasil saringan kemudian dikocok. Apabila menghasilkan buih stabil, maka reaksi dinyatakan positif.

Identifikasi Triterpenoid dan Steroid. Sebanyak 1 gram sampel ditambahkan etanol panas kemudian disaring. Hasil saringan dipanaskan hingga kering kemudian ditambahkan 1 mL dietil eter dan dihomogenkan, kemudian ditambahkan 1

tetes asam sulfat pekat dan 1 tetes asetat anhidrat. Jika positif mengan dung triterpenoid, maka akan muncul warna merah/ungu. Jika positif steroid, maka akan muncul warna hijau/biru.

Uji inhibitor tirosinase. Pengujian aktivitas inhibitor tirosinase mengacu pada metode yang dilakukan oleh Batubara *et al.* (2010). Pembuatan larutan ekstrak pada berbagai konsentrasi dilakukan dengan melarutkan 2 mg ekstrak padat bunga telang putih menggunakan DMSO hingga mendapat konsentrasi sebesar 2000 ppm. Ekstrak ini merupakan stok yang kemudian akan diencerkan dalam *buffer* natrium fosfat (50µM dan pH 6.5). Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada pengujian ini adalah 31.25 – 2000 ppm. Pengujian ini menggunakan asam kojat sebagai kontrol positif dan diuji pada konsentrasi 7,8125 – 500 ppm. Asam kojat dipilih karena merupakan inhibitor tirosinase yang memiliki daya hambat dan kestabilan yang paling tinggi (Miyazawa *et al.*, 2006).

Pengujian ini menggunakan *microplate* dengan 96 sumur. Pada lubang-lubang sumur tersebut dimasukkan ekstrak dari berbagai konsentrasi sebanyak 70 µL lalu ditambahkan dengan 30 µL tirosinase. Masing-masing konsentrasi dilakukan dengan tiga kali ulangan. Setelah itu, plate disimpan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan substrat (2 µM L-tirosin dan 12 µM L-DOPA) sebanyak 110 µL ke dalam setiap lubang sumur, *microplate* tersebut diinkubasi kembali selama 30 menit.

Panjang optik dari setiap sumur ditentukan menggunakan ELISA *microplate reader* pada panjang gelombang 492 nm. Selanjutnya, konsentrasi dari masing-masing ekstrak yang dapat

menghambat setengah dari aktivitas tirosinase (IC₅₀) ditentukan dengan cara membandingkan absorbans sampel tanpa penambahan ekstrak dengan penambahan ekstrak pada panjang gelombang 492 nm.

Perhitungan nilai absorbansi pada kedua reaksi tersebut dihitung menggunakan rumus:

$$\frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ diperoleh dari persamaan regresi linier antara % inhibisi (sumbu y) dan konsentrasi ekstrak (sumbu x), persamaan regresi linier dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$Y = a + bx$$

Keterangan:

Y: variabel dependen, a : konstanta, b : koefisien regresi, x : variabel independen

Data penelitian dianalisis secara kuantitatif menggunakan *Microsoft Excel* 2016.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji penapisan fitokimia dilakukan sebagai uji pendahuluan yang bertujuan memberikan gambaran golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu tanaman. Hasil dari uji penapisan fitokimia bersifat kualitatif (Kristianti, 2008). Hasil pengujian penapisan fitokimia ekstrak Bungatelang putih dengan metode analisis menggunakan fitokimia warna dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Kandungan senyawa fitokimia ekstrak Bungatelang putih

Parameter	Hasil
Flavonoid	Positif
Alkaloid	Negatif

Tanin	Positif
Saponin	Positif
Quinon	Negatif
Steroid	Positif
Triterpenoid	Negatif

Keterangan:

-Positif : Sampel mengandung senyawa antioksidan terkait

-Negatif : Sampel tidak mengandung senyawa antioksidan terkait

Berdasarkan penelitian ini, hasil pengujian kandungan fitokimia ekstrak bunga telang putih menunjukkan sampel mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan steroid.

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH yang mengacu pada Salazar-Aranda *et al.* (2011). Metode DPPH digunakan dengan tujuan untuk mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas suatu senyawa. Mekanisme penghambatan aktivitas radikal bebas DPPH oleh antioksidan adalah dengan mendonorkan atom hidrogen dari sebagian gugus hidroksilnya ke senyawa radikal bebas DPPH sehingga membentuk senyawa radikal bebas DPPH yang lebih stabil (DPPH-H). Metode DPPH dapat digunakan untuk sampel yang berupa padatan maupun cairan (Prakash *et al.*, 2001). Sampel Bungatelang putih yang digunakan dalam uji ini berbentuk padatan. Vitamin C digunakan sebagai kontrol positif. Hasil uji aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 Hasil uji aktivitas antioksidan

Sampel	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak Bunga Telang	356,651795
Vitamin C	4,741763

Berdasarkan hasil, sampel uji ekstrak Bungatelang putih mempunyai IC₅₀ sebesar 356,651795 ppm. Hasil ini dinilai lemah apabila mengacu pada penelitian Phongpaichit *et al.* (2007) yang menyatakan suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC₅₀ < 10 ppm, kuat apabila nilai IC₅₀ berkisar antara 10-50 ppm, lemah apabila IC₅₀ berkisar antara 100-250 ppm, dan sangat lemah apabila IC₅₀ diatas 250 ppm. Vitamin C yang digunakan sebagai kontrol positif memiliki nilai IC₅₀ yang secara signifikan lebih rendah yaitu sebesar 4,741763. Hal ini membuktikan bahwa vitamin C mempunyai antioksidan yang lebih kuat jika dibandingkan dengan ekstrak bunga telang putih . Dalam proses ekstraksi suatu bahan tanaman, banyak faktor yang dapat mempengaruhi kandungan senyawa hasil ekstraksi, di antaranya jenis pelarut, konsentrasi pelarut, metode ekstraksi dan suhu yang digunakan untuk ekstraksi (Rima *et al.*, 2014).

Kandungan antosianin pada ekstrak Bungatelang putih merupakan senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan (Santoso, 2006). Perubahan pH sampel setelah sampel diekstraksi dapat menyebabkan kapasitas antioksidan berubah karena mempengaruhi kadar antosianin (Sakanaka *et al.* 2005). Semakin rendah nilai pH, maka antosianin akan semakin stabil (Widjanarko, 2008). Jenis pelarut yang digunakan dalam proses maserasi juga memberi pengaruh terhadap rendaman sehingga akan memengaruhi jumlah senyawa aktif yang terlarut dalam proses ekstraksi Bungatelang putih.

Kapasitas antioksidan juga dipengaruhi oleh jenis sampel yang digunakan untuk menjadi ekstrak. Penggunaan bunga telang putih segar lebih baik berbanding bunga telang putih kering karena

proses pemanasan dalam pembuatan simplisia menyebabkan antosianin pada Bungatelang putih terdegradasi (Kusrini *et al.*, 2017).

Pengujian aktivitas inhibitor tirosinase ini mengacu pada metode yang telah dilakukan oleh Batubara *et al.* (2010). Pengujian ini menggunakan asam kojat sebagai kontrol positif. Hasil pengujian aktivitas inhibitor dapat dilihat dari nilai IC₅₀ pada Tabel 3.

Tabel 3 Hasil uji aktivitas inhibitor tirosinase

Sampel	Enzim Tirosinase IC ₅₀ (ppm)	
	Diphenolase	Monophenolase
Ekstrak Bungatelang putih	4113,628069	5345,720677
Asam kojat	33,16	78,74

Hasil uji aktivitas inhibitor tirosinase menunjukkan ekstrak Bungatelang putih memiliki nilai IC₅₀ yang tinggi pada kedua reaksi uji yaitu sebesar 4113,628069 pada diphenolase dan 5345,720677 pada monophenolase yang nilainya secara signifikan lebih besar dibandingkan dengan asam kojat, yaitu IC₅₀ sebesar 33,16 pada diphenolase dan 78,74 pada monophenolase. Penggolongan aktivitas inhibitor tirosinase tergolong tidak aktif apabila IC₅₀ > 1000 ppm (Miyazawa *et al.* 2006). Hal ini menunjukkan ekstrak Bungatelang putih tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase. Onanong & Watcharee (2014) melaporkan ekstrak Bungatelang putih mempunyai kandungan fenolik yang tinggi, kadar antosianin yang tinggi, menghambat radikal bebas dengan sederhana; namun sebaliknya mempunyai proses inhibitor tirosinase yang sangat lemah.

KESIMPULAN

Hasil pengujian pada penapisan fitokimia menunjukkan ekstrak bunga telang putih mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan steroid yang berperan sebagai antioksidan. Ekstrak Bungatelang putih memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah yaitu dengan IC₅₀ 356,651795 ppm berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Hasil pengujian inhibitor tirosinase menunjukkan ekstrak Bungatelang putih tidak memiliki aktivitas menghambat enzim tirosinase karena memiliki nilai IC₅₀ yang tinggi yaitu 4113,628069 pada diphenolase dan 5345,720677 pada monophenolase. Pengujian antioksidan dengan Bungatelang putih segar perlu diuji agar dapat diperoleh kadar antioksidan yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Batubara, I., & Adfa, M. (2013). Potensi tumbuhan sebagai penghambat kerja enzim tirosinase. *Jurnal Sains & Matematika*, 1(2), 52–56.
- Batubara, Darusman, Mitsunaga, Rahminiwati, Djauhari. (2010). Potency of medicinal plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. *Journal of Biological Sciences*, 10(2), 138–144.
- Chang, T.S. (2009). An update review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 10, 2440–2475.
- Farhamzah, Kusumawati AH., Alkandahri MY, Hidayah H, Sujana D, Gunarti NS, *et al.* Sun Protection Factor Activity of Black Glutinous Rice Emulgel Extract (*Oryza sativa* var glutinosa). *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2022; 56(1): 302–310.
- Hanani, Mun'im, Sekarini. (2005). Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *Callyspongia* sp dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2(3), 127–133.
- Harborne, Jeffrey. (1987). *Metode Fitokimia*. Edisi ke-2. Bandung: ITB-Press.
- Hidayah H, Amal S, Yuniarsih N, Farhamzah, Kusumawati AH, Gunarti NS, *et al.* Sun

- Protection Factor Activity of Jamblang Leaves Serum Extract (*Syzygium cumini*). *Pharmacognosy Journal*. 2023; 15(1): 134-140.
- Kristianti, Aminah, Tanjung, Kurniadi. (2008). *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: FMIPA Universitas.
- Kusrini, Tristantini, Izza. (2017). Uji aktivitas ekstrak Bungatelang putih putih (*Clitoria ternatea*) sebagai agen anti-katarak. *Jurnal Jamu Indonesia*, 2(1), 30–36.
- Kusumawati AH, Farhamzah F, Alkandahri MY, Sadino A, Agustina LS, Apriana SD. Antioxidant Activity and Sun Protection Factor of Black Glutinous Rice (*Oryza sativa* var. glutinosa). *Tropical Journal of Natural Product Research*. 2021; 5(11): 1958-1961.
- Miyazawa, M., & Tamura, N. (2006). Inhibitory compound of tyrosinase activity from the sprout of *Polygonum hydropiper* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(3), 595–597.
- Mukherjee, Kumar, Kumar, Heinrich. (2003). The ayurvedic medicine *Clitoria ternatea* from traditional use to scientific assessment. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(3), 291–301.
- Onanong, R., & Watcharee, K. (2014). The comparative study in bioactivities of Rang jeud, Butterfly pea and Red grape peel. *Pharmaceutical Chemistry and Natural Products*, 12(1), 61–69.
- Phongpaichit, Nikom, Rungjindamai, Sakayaroj, Hutadilok, Rukachaisirikul, Kirtikara. (2007). Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from garciana plants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(3), 515–525.
- Prakash, Rigelhof, Miller. (2001). Antioxidant activity. *Medallions Labs*, 19(2), 1–4.
- Rima, Elisa, Akhmad, Erna. (2014). The comparasion of extraction method and solvent variation on yield and antioxidant activity of Brassica oleracea L. var. capitata f. ruvara Extract. *Traditional Medicine Journal*, 19(1), 43–48.
- Sakanaka, Tachibana, Okada. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (Kakinocha). *Food Chemistry*, 89(4), 569–575.
- Salazar-Aranda, Perez-Lopez, Lopez-Arroyo, Alanis-Garza, Waksman de Torres. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of plants from Northeast of Mexico. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1(1), 1–6.
- Santoso, Umar. (2006). *Antioksidan*. Yogyakarta: Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.
- Shyamkumar, & Ishwar B. (2012). Antiinflammatory, analgesic and phytochemical studies of *Clitoria ternatea* flower extract. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(3), 208–210.
- Uma, Prabhakar, Rajendran. (2009). Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Clitoria ternatea* against extended spectrum beta lactamase producing enteric and urinary pathogens. *Asian Journal of Phamaceutical and Clinic Research*, (4), 94–96.
- Vinolina, NS. (2014). *Peningkatan Produksi Centellosida dan Pegagan (Centella asiatica) Melalui Pemberian Fosfor dan Metil Jasmonat dengan Umur Panen yang Berbeda*. Disertasi. Universitas Sumatera Utara.
- Widjanarko, Simon. (2008). *Efek Pengolahan Terhadap Komposisi Kimia dan Fisik Ubi Jalar Ungu dan Kuning*. Yogyakarta: Liberti.
- Wijaya, Paendong, Abidjul. (2014)). Skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan dari daun nasi (*Phrynium capitatum*) dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Jurnal Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi Online*, 3(1), 11–15.
- Winarsi Hery. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensial dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.