

PENENTUAN KANDUNGAN FENOLIK TOTAL, SIFAT ANTIOKSIDAN DAN TOKSISITAS DARI EKSTRAK KULIT BATANG RENGAS (*Gluta renghas* L.)

DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT, ANTIOXIDANT AND TOXIC PROPERTIES OF RENGAS (*Gluta renghas* L.) STEM BARK EXTRACTS

Emil Salim^{1*}, Adlis Santoni², Nindi Antika Febriana³

¹²³Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas
Kampus Limau Manis, Padang, 25163 Indonesia.

* e-mail korespondensi : emilsalim@sci.unand.ac.id

Abstrak

Tujuan penelitian ini untuk menentukan jumlah kandungan fenolik total, sifat antioksidan dan toksisitas dari ekstrak kulit batang rengas (*Gluta renghas* L.). Sampel kulit batang rengas diekstraksi secara bertahap menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol pada temperatur ruang. Jumlah kandungan fenolik total ditentukan dengan metode *Folin-Ciocalteu*, sifat antioksidan ditentukan dengan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*), dan sifat toksisitas ditentukan dengan metode BSLT (*Brine Shimp Lethality Test*). Ekstrak metanol kulit batang rengas memiliki kandungan fenolik total paling tinggi (20,042 mg GAE/g ekstrak kering) dibandingkan ekstrak etil asetat dan n-heksan. Sifat antioksidan dari ekstrak metanol dan etil asetat tergolong sangat kuat dengan nilai IC_{50} 12,252 mg/L dan 48,151 mg/L secara berturut-turut, sedangkan ekstrak n-heksan bersifat lemah dengan nilai IC_{50} 206,06 mg/L. Sifat toksisitas kulit batang rengas menunjukkan bahwa semua ekstrak bersifat toksik, dimana ekstrak metanol memiliki sifat toksisitas paling kuat dengan nilai LC_{50} 54,113 mg/L. Senyawa aktif dari ekstrak kulit batang rengas ini selanjutnya dapat dilakukan isolasi untuk mengetahui strukturnya.

Kata kunci: *Gluta renghas* L., kandungan fenolik total, antioksidan, toksisitas.

Abstract

The aim of this study is to determine total phenolic content, antioxidant and toxic properties of rengas stem bark (*Gluta renghas* L.) extracts. Samples were extracted in stages using n-hexane, then ethyl acetate, and methanol in room temperature. Total phenolic content was carried out by the *Folin-Ciocalteu* method, antioxidant property was carried out by the DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*) method, and toxicity by the BSLT (*Brine Shimp Lethality Test*) method. Methanol extract of rengas stem bark has the highest total phenolic content (20,042 mg GAE/g dry extract) compared to ethyl acetate and n-hexane extracts. Antioxidant properties of methanol and ethyl acetate extracts are very strong with IC_{50} 12.252 mg/L and 48.151 mg/L, respectively, whereas n-hexane extract is weak with IC_{50} 206.06 mg/L. All extracts of rengas stem bark are toxic, where methanol extract has the highest toxicity with LC_{50} 54.113 mg/L. Next, active compounds in rengas stem bark extracts can be isolated to determine their structures.

Keywords: *Gluta renghas* L., total phenolic content, antioxidant, toxicity.

PENDAHULUAN

Tumbuhan merupakan salah satu tempat terjadinya proses biosintesis berbagai struktur senyawa organik yang kompleks, seperti senyawa metabolit sekunder. Tempat tumbuh sangat mempengaruhi jumlah dan jenis kandungan senyawa metabolit sekundernya. Ada beberapa jenis tumbuhan yang dapat tumbuh di daerah ekstim.

Informasi mengenai kandungan senyawa metabolit sekunder dari beberapa tumbuhan ini masih sangat terbatas. Salah satunya adalah tumbuhan rengas (*Gluta renghas* L.) yang termasuk kedalam famili Anacardiaceae. Spesies ini dapat ditemukan di sepanjang sisi sungai dan anak sungai air tawar. Tanah benam yang dangkal dan terendam oleh air merupakan tempat tumbuh

yang paling baik untuk rengas. Rengas mampu beradaptasi pada kondisi lingkungan anaerob dan pada daerah yang tergenang air saat musim hujan dimana pori-pori tanah tertutup oleh air (Heyne, K., 1987).

Rengas merupakan salah satu sumber kayu yang penting untuk bahan konstruksi bangunan, seperti bantalan rel kereta api, jembatan, perahu, kayu lapis dan perkakas rumah tangga. Pada umumnya, para Petani menanam rengas sebagai tanaman sela di hutan jati untuk menghambat pertumbuhan gulma (Nana, S., 2011). Rengas diketahui memiliki getah yang sangat beracun yang dapat menyebabkan gatal, iritasi berat pada kulit. Selain itu, getah rengas juga dapat menyebabkan kelumpuhan. Penduduk asli biasanya menggunakan getah rengas sebagai racun untuk berburu binatang (Zuharah, W.F., 2014).

Berdasarkan keunikan dari tumbuhan rengas ini, maka peneliti tertarik untuk menentukan kandungan kimia yang terdapat pada tumbuhan rengas tersebut. Selain itu, penelitian mengenai kandungan golongan senyawa aktif pada ekstrak tumbuhan ini dan aktivitasnya sebagai antioksidan dan toksisitas masih sangat terbatas. Penelitian sebelumnya, getah rengas memiliki beberapa kandungan senyawa yang telah diisoalsi, seperti ursiol, rengol, glutarengol, laccol dan thitsiol (Zuharah, W.F., 2014). Kayu rengas juga telah dilaporkan mengandung golongan senyawa lipid, steroid, flavonoid dan benzenoid (Heyne, K., 1987), namun belum ada dilakukan penelitian terhadap bagian tumbuhan rengas lainnya, yaitu bagian akar, kulit batang, bunga, buah, dan bagian lainnya.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kandungan kimia yang terdapat pada kulit batang rengas, kemudian ditentukan jumlah kandungan fenolik total untuk mendukung potensi aktivitasnya sebagai sumber antioksidan. Selain itu pada penelitian juga dilakukan uji toksisitas ekstrak kulit batang rengas terhadap larva udang *Artemia salina*.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *gerinder*, neraca analitik, alat distilasi, maserator, *rotary evaporator* BUCHI R-124, botol vial, tabung reaksi, *chamber*, pipa kapiler, lampu UV (254 nm dan 356 nm), spektrofotometer UV-Vis *Thermo Scientific*, wadah pembiakan larva udang, *micropipette*, dan alat gelas laboratorium lainnya.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel bubuk kulit batang rengas, pelarut (metanol, etil asetat dan heksan), pereaksi Mayer, sianidin test (bubuk magnesium dan asam klorida pekat), pereaksi Liebermann-Burchad, anhidrida asetat dan asam sulfat pekat, besi (III) klorida), ammonia, natrium hidroksida, asam askorbat, *2,2-difenil-1-pikrilhidrazil* (DPPH), larva udang *Artemia salina*, karbonat 20%, DMSO (dimetil sulfoksida), asam galat, reagen Folin-Ciocalteau, dan akuades.

1. Uji Profil Fitokimia

Uji profil fitokimia dari kulit batang rengas dilakukan menurut prosedur oleh Harborne, J.D., 1987 dan Parekh J. *et al*, 2004 dengan beberapa modifikasi. Serbuk kulit batang rengas (\pm 2 gram) ditambahkan 10 mL metanol dalam tabung reaksi dan kemudian dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Larutan ekstrak diambil untuk analisis selanjutnya.

Uji Flavonoid

Larutan ekstrak metanol (2 mL) dalam tabung reaksi ditambahkan HCl pekat dan beberapa butir serbuk magnesium. Apabila terbentuk warna jingga sampai merah, berarti ada kandungan senyawa flavonoid pada sampel.

Uji Fenolik

Larutan ekstrak metanol (2 mL) dalam tabung reaksi ditambahkan 5 tetes larutan FeCl₃ dan diamati perubahan warna larutan. Apabila terbentuk larutan berwarna biru atau hijau pekat menunjukkan adanya kandungan senyawa fenolik.

Uji Saponin

Larutan ekstrak metanol (2 mL) dalam tabung reaksi dikocok beberapa saat. Apabila terbentuk busa dan tidak hilang dengan penambahan beberapa tetes HCl pekat (± 5 menit), berarti ada kandungan senyawa saponin dalam sampel.

Uji Triterpenoid/Steroid

Larutan ekstrak metanol (2 mL) ditambah 2 mL akuades, kemudian ditambahkan 2 mL kloroform dan dikocok beberapa saat dan kemudian didiamkan sehingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan kloroform diambil menggunakan pipet tetes dan diteteskan pada pelat tetes, ditambah asam sulfat pekat dan anhidrida asetat. Apabila larutan berwarna ungu atau merah menunjukkan adanya kandungan senyawa terpenoid dan jika terbentuk warna hijau atau biru berarti ada kandungan senyawa steroid.

Uji alkaloid

Larutan ekstrak metanol (2 mL) dimasukkan kedalam tabung reaksi dan diuapkan pelarutnya, residu yang terbentuk ditambahkan 5 mL HCl 2N, kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer. Apabila terbentuknya endapan putih berarti ada kandungan senyawa alkaloid.

Uji Kumarin

Larutan ekstrak metanol ditotolkan pada pelat KLT dan dikeringkan. Plat KLT kemudian dielusi dengan eluen etil asetat: metanol (9:1). Plat KLT hasil elusi diamati dibawah sinar UV λ 365 nm dan 254 nm. Adanya warna biru yang berfluorisensi dan jika warna biru tersebut bertambah terang setelah disemprot dengan larutan NaOH 1M maka ada kandungan senyawa kumarin dalam sampel.

2. Ekstraksi Sampel Kulit Batang Rengas

Sampel kering berupa bubuk (± 1000 g) diekstraksi secara bertahap menggunakan 3 jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda (n-heksan, etil asetat dan metanol) pada suhu kamar. Ekstraksi pertama dilakukan dengan pelarut non polar (n-heksan). Proses maserasi dilakukan secara berulang sampai maserat berwarna lebih bening dan ketika diteteskan pada kaca arloji tidak meninggalkan bercak

noda. Hasil maserasi yang diperoleh digabungkan dan pelarutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga didapatkan ekstrak pekat heksan dan kemudian ditimbang. Ampas sisa dari ekstraksi dengan pelarut n-heksan dikeringanginkan dan proses maserasi dilanjutkan dengan pelarut etil asetat dan tahap terakhir dengan pelarut metanol dengan prosedur kerja yang sama.

3. Penentuan Kandungan Fenolik Total Ekstrak Kulit Batang Rengas

Masing-masing ekstrak (10 mg) dilarutkan dengan 10 mL metanol untuk mendapatkan konsentrasi larutan induk 1000 mg/L. Larutan induk diencerkan dengan cara melarutkan 1 mL dengan metanol di dalam labu 10 mL sehingga didapatkan konsentrasi 100 mg/L. Larutan sampel 100 mg/L sebanyak 0,5 mL dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan ditambah 0,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu*. Campuran didiamkan selama 5 menit sebelum ditambahkan 1 mL larutan Na_2CO_3 20% dan kemudian diencerkan sampai tanda batas dengan akuades. Larutan dibiarkan selama 2 jam dan serapan diukur pada panjang gelombang 765 nm. Asam galat digunakan sebagai larutan standar. Kandungan fenolik total dinyatakan dalam GAE (*Gallic Acid Equivalent*) (Slinkard, J., 1997).

4. Uji Sifat Antioksidan Ekstrak Kulit Batang Rengas dengan Metode DPPH

Larutan uji disiapkan dengan melarutkan masing-masing ekstrak (100 mg) dengan metanol dalam labu ukur 100 mL untuk mendapatkan larutan induk 1000 mg/L. Dari larutan induk dibuat variasi konsentrasi 400; 200; 100; 50; 25 mg/L untuk ekstrak n-heksan (Aranda, R., 2011), konsentrasi 100; 80; 60; 40; 20 mg/L untuk ekstrak etil asetat dan konsentrasi 30; 20; 15; 10; 5 mg/L untuk ekstrak metanol (Ekawati, 2017). Masing-masing variasi konsentrasi dari larutan uji (2 mL) dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan 3 mL DPPH 0,004% (b/v). Campuran didiamkan pada tempat gelap selama 30 menit setelah penambahan DPPH. Serapan diukur pada panjang gelombang 517 nm. Asam galat digunakan sebagai kontrol positif. Dari nilai absorbansi yang didapatkan dihitung persen inhibisi larutan uji terhadap radikal DPPH. Nilai IC_{50} dapat diperoleh dari persamaan regresi (Shimada, K., 1992).

5. Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Batang Rengas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Masing-masing ekstrak (50 mg) dilarutkan dengan pelarut masing-masing dalam labu ukur 50 mL sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 mg/L. Beberapa variasi konsentrasi sampel dibuat melalui pengenceran bertingkat yaitu 500; 250; 125; 62,5; 31,625; 15,625 dan 7,8125 mg/L (Ekawati, 2017). Larutan ekstrak dengan variasi konsentrasi masing-masing diambil sebanyak 5 mL dan kemudian dimasukkan ke dalam vial, diuapkan pelarutnya. Setelah pelarut menguap, ke dalam vial ditambahkan 50 µL DMSO dan 2 mL air laut. Prosedur yang sama juga dilakukan terhadap kontrol negatif (tanpa penambahan ekstrak). Sifat toksisitas ditentukan memasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* ke dalam vial yang telah berisi larutan uji dengan berbagai konsentrasi. Volume kemudian dicukupkan menjadi 5 mL dengan air laut. Larutan uji dibiarkan selama 24 jam dan jumlah larva yang mati dihitung (Ekawati, 2017). Masing-masing ekstrak dilakukan pengujian sebanyak 3 kali pengulangan (Prawirodiharjo, E., 2014).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil Fitokimia Sampel Kulit Batang Rengas

Profil fitokimia menunjukkan jenis golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada sampel secara kualitatif. Profil fitokimia dari ekstrak metanol kulit batang rengas ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Profil fitokimia ekstrak metanol kulit batang rengas

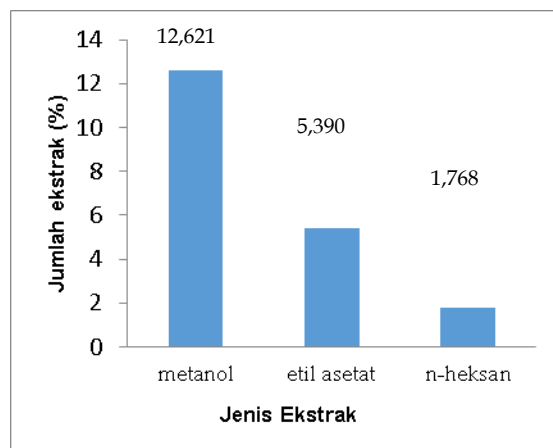
No	Uji Kualitatif	Hasil Uji
1.	Flavonoid	+
2.	Fenolik	+
3.	Saponin	-
4.	Triterpenoid	+
5.	Steroid	-
6.	Kumarin	+
7.	Alkaloid	+

Dari data tabel di atas diketahui bahwa kulit batang rengas mengandung beberapa golongan

senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, fenolik, triterpenoid, kumarin dan alkaloid.

Hasil Ekstraksi Sampel Kulit Batang Rengas

Hasil proses ekstraksi sampel kulit batang rengas menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol dapat dilihat pada Gambar 1.

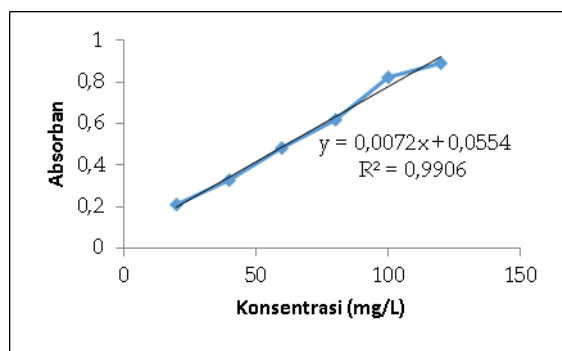


Gambar 1. Jumlah ekstrak kulit batang rengas yang dihasilkan

Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa jumlah ekstrak metanol lebih banyak dibanding ekstrak n-heksan dan etil asetat. Hasil ini mengindikasikan bahwa kulit rengas mengandung komponen polar yang lebih banyak dibanding komponen yang bersifat semi polar dan non polar. Ini dapat terlihat dari perbandingan jumlah ekstrak metanol dan ekstrak n-heksan, dimana ekstrak metanol 12,621% sedangkan ekstrak n-heksan dan etil asetat berturut-turut 1,768% dan 3,390%. Jenis pelarut yang digunakan sangat mempengaruhi jumlah ekstrak yang diperoleh, dimana komponen senyawa yang ada pada sampel memiliki kelarutan yang berbeda pada pelarut yang berbeda.

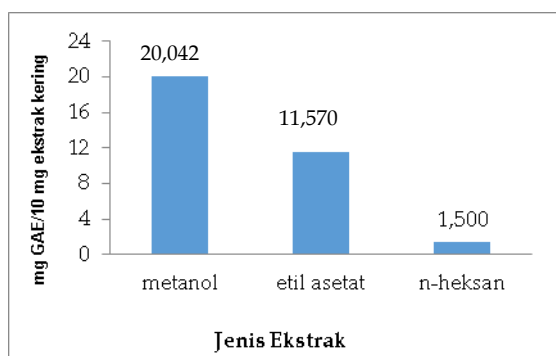
Hasil Penentuan Kandungan Fenolik Total Ekstrak Kulit Batang Rengas

Persamaan regresi larutan standar asam galat (Gambar 2) digunakan untuk menentukan kandungan fenolik total pada ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol dari kulit batang rengas.



Gambar 2. Kurva standar asam galat

Dari gambar di atas dapat dilihat bahwa kenaikan konsentrasi asam galat sebanding dengan nilai absorban yang diperoleh. Hal ini disebabkan oleh semakin banyak senyawa asam galat yang dapat mereduksi asam fosfomolibdat-fosfotungstat pada reagen Folin-Ciocalteu membentuk kompleks molibdenum tungsten menghasilkan larutan warna biru yang diukur pada panjang gelombang 765 nm sehingga terukur nilai serapan yang semakin tinggi. Gambar 3 menunjukkan kandungan fenolik total dari ekstrak metanol, etil asetat dan n-heksan dari kulit batang rengas.



Gambar 3. Kandungan fenolik total ekstrak kulit batang rengas

Dari grafik di atas dapat dilihat ekstrak metanol memiliki kandungan fenolik total paling tinggi, diikuti oleh ekstrak etil asetat dan n-heksan. Hasil ini menunjukkan sampel kulit batang rengas lebih banyak mengandung senyawa fenolik yang bersifat polar.

Hasil Uji Sifat Antioksidan Ekstrak Kulit Batang Rengas

Sifat antioksidan ekstrak kulit batang rengas diuji untuk melihat daya hambatnya (inhibisi) terhadap radikal bebas (DPPH).

Tabel 2 menunjukkan nilai konsentrasi inhibisi sebanyak 50 persen (IC_{50}) dari ekstrak metanol, etil asetat dan n-heksan dari kulit batang rengas

Tabel 2. Sifat antioksidan ekstrak kulit batang rengas

<i>Sampel uji</i>	IC_{50} (mg/L)
Ekstrak metanol	12,252
Ekstrak etil asetat	48,151
Ekstrak n-heksan	206,062
Asam askorbat	10,592

Dari nilai IC_{50} di atas dapat dilihat bahwa ekstrak metanol memiliki sifat antioksidan yang paling kuat dengan nilai IC_{50} yang paling rendah dan nilainya mendekati nilai IC_{50} dari kontrol positif (asam askorbat). Semakin kecil nilai IC_{50} maka kemampuan penangkapan radikal bebas yang semakin tinggi (Putri, A.A.S., 2015). Dari data di atas menunjukkan ekstrak metanol lebih aktif antioksidan dibanding ekstrak etil asetat dan heksan disebabkan. Hal ini disebabkan oleh kandungan fenolik total yang lebih tinggi terdapat dalam ekstrak metanol, dimana senyawa fenolik merupakan salah satu golongan senyawa yang bertanggung jawab dalam menetralkan radikal bebas.

Menurut Fukumoto dan Mazza (2000), sifat antioksidan akan semakin meningkat dengan semakin bertambahnya gugus hidroksil ($-OH$) pada senyawa fenolik dan akan semakin menurun dengan adanya gugus glikosida (Zuhra, C. F., 2008). Berdasarkan hasil uji fitokimia, golongan senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan dalam ekstrak kulit batang rengas adalah flavonoid, fenolik, dan kumarin. Senyawa ini pada strukturnya mengandung gugus hidroksil dimana atom H bersifat asam yang dapat didonorkan untuk menetralkan radikal bebas (Meyer, B.N., 1982).

Nilai IC_{50} digunakan sebagai parameter sifat antioksidan. Jika nilai $IC_{50} < 50$ mg/L, maka sifat antioksidannya tergolong sangat kuat, jika nilai IC_{50} 50-100 mg/L tergolong kuat, jika nilai IC_{50} 101-250 mg/L tergolong sedang, jika nilai IC_{50} 250-500 mg/L

tergolong lemah, dan bersifat tidak aktif jika nilai $IC_{50} > 500$ mg/L (Shimada, 1992). Berdasarkan data ini, ekstrak metanol (IC_{50} 12,252 mg/L) dan ekstrak etil asetat (IC_{50} 48,151 mg/L) tergolong kuat sebagai antioksidan, sedangkan ekstrak heksan (IC_{50} 206,062 mg/L) tergolong sedang antioksidan.

Hasil Uji Toksisitas dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Uji sifat toksisitas ekstrak dilakukan terhadap larva udang *Artemia salina* menggunakan metoda BSLT. Jumlah larva udang yang mati dihitung pada setiap perlakuan. Dari hasil pengujian diamati bahwa angka kematian larva udang semakin meningkat dengan semakin besar nilai konsentrasi ekstrak yang ditambahkan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Harborne (1987), dimana sifat toksik dari ekstrak akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi dari ekstrak. Tabel 3 menunjukkan hasil uji toksisitas dari ekstrak kulit batang rengas terhadap larva udang *Artemia salina*.

Tabel 3. Sifat toksisitas ekstrak kulit batang rengas terhadap larva udang *Artemia salina*

Ekstrak	IC_{50} (mg/L)
Metanol	54,1128
Etil asetat	461,1052
n-Heksan	659,1739

Dari tabel diatas dapat dilihat bahwa ekstrak metanol memberikan sifat toksisitas paling tinggi terhadap larva udang dengan nilai LC_{50} 54,1128 mg/L. Tingkat toksisitas dapat diketahui dari nilai LC_{50} -nya, dikatakan toksik jika LC_{50} kecil dari 1000 mg/L dan tidak toksik jika LC_{50} besar dari 1000 mg/L (Agustian, R., 2013). Dari parameter nilai LC_{50} , maka diketahui bahwa n-heksan, etil asetat dan metanol bersifat toksik. Senyawa yang berpotensi dalam menyebabkan sifat toksik adalah senyawa golongan alkaloid, kumarin dan triterpenoid. Hal ini didukung oleh hasil uji profil fitokimia dari ekstrak yang menunjukkan adanya kandungan senyawa-senyawa tersebut.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak metanol kulit batang rengas mengandung senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, fenolik, triterpenoid, kumarin dan alkaloid. Kandungan fenolik total dari ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol berbeda secara signifikan. Ekstrak metanol kulit batang rengas memiliki jumlah kandungan fenolik total paling tinggi dibandingkan terhadap ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan. Pada uji sifat antioksidan, ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat tergolong kuat sebagai antioksidan, sedangkan ekstrak heksan bersifat sedang. Semua ekstrak kulit batang rengas bersifat toksik, dimana sifat toksisitas paling kuat ditunjukkan oleh ekstrak metanol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih penulis ucapkan kepada Analis Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid I dan II. Terjemahan. Badan Litbang Kehutanan: Jakarta.
- Supriatna, N., Kelana, T. 2011. Informasi Singkat Benih Renghas (*Gluta renghas* L), Balai Pembenihan Tanaman Hutan Jawa dan Madura.
- Zuharah, W.F., Fadzly, N.; Ali, Y., Zakaria, R., Juperi, S., Asyraf, M., Dieng, H. 2014. Larvicidal Efficacy Screening of Anacardaciae Crude Extracts on the Dengue Hemorrhagic Vector, *Aedes Aegypti*. *Tropical Biomedicine* 31(2), 297–304.
- Aziz, Enda Desriyansyah. 2017. Uji Aktivitas Sitotoksik dan Antibakteri Ekstrak Daun Rengas (*Gluta renghas* L.). *Skripsi*. Universitas Andalas: Padang.
- Harborne, J.D. 1987. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. ITB: Bandung.

6. Parekh, J., Chanda S.V. 2007. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turk J Biol.* 31, 53-58.
7. Slinkard, J., Singleton, V.L. 1997. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic.* 28, 49-55.
8. Aranda, R., Lopez, L., Arroyo, J., Garza, B., & Torres, N. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from Northeast of Mexico. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-6.
9. Ekawati, Minanti A. 2017. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Daun Sembukan (*Paederia foetida* L) Serta Uji Aktivitasnya Sebagai Antioksidan. *Jurnal Kimia*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran: Bali, 11(1), 43-48.
10. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem.* 40, 945-948.
11. Prawirodiharjo, E. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 70% dan Ekstrak Air Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*). *Skripsi*. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
12. Putri, A.A.S., Hidajati, N. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Nyiri Batu (*Xylocarpus moluccensis*). *UNESA Journal of Chemistry* 4(1), 37-42.
13. Zuhra, C. F., Taringan, J. B., Sihotang, H. 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus androgunus* (L) Merr.), *Jurnal Biologi Sumatera* 1(3), 7-10.
14. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Nicols, J.L., McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Reseach* 45, 31-32.
15. Agustian, R., Yudiati, E., Sedjati, S. 2013. Uji Toksisitas Pigmen Kasar Mikroalga *Spirulina platensis* dengan Metode Uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*), *Journal of Marine Research* 1(2), 25-31.