

ANALISIS KAPASITAS ANTIOKSIDAN MINUMAN SUMBER VITAMIN C

Fahrul Rozi¹, Muhammad Nuzul Azhim Ash Siddiq^{2*}, Chaidir Masyhuri Majidin³

Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Mulawarman^{1,2,3}

*Corresponding Author : nuzulazhim@gmail.com

ABSTRAK

Antioksidan telah menjadi fokus penelitian yang signifikan dalam konteks kesehatan dan pangan. Antioksidan berperan dalam melawan radikal bebas di dalam tubuh, sehingga memberikan efek positif terhadap kesehatan tubuh. Derajat kesehatan manusia yang semakin menurun (meningkatnya prevalensi penyakit tidak menular), membuat keberadaan antioksidan (pangan) semakin penting. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas antioksidan pada bahan pangan sumber antioksidan (vitamin C) dan mengetahui metode yang digunakan dalam menganalisis aktivitas antioksidan pada bahan pangan tersebut. Pada akhirnya, penelitian ini dapat menjadi salah satu acuan terkait dengan sumber antioksidan. Penelitian ini dilakukan pada 15 Desember 2020 di Laboratorium Biokimia, Departemen Gizi Masyarakat, Institut Pertanian Bogor. Desain penelitian yang digunakan adalah analisis deskriptif menggunakan metode spektrofotometri DPPH. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pengukuran standar yang diuji pada konsentrasi antara 0.05-10 mg/dL menunjukkan nilai absorbansi yang cukup ideal (0.289-0.701). Semakin tinggi konsentrasi pada standar, nilai absorbansi semakin berkurang, semakin banyak elektron yang disumbangkan oleh asam askorbat untuk menjadikan radikal bebas DPPH lebih stabil. Aktivitas antioksidan pada sampel menunjukkan persen inhibisi yang fluktuatif. Kondisi ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti kontaminasi zat lain, perubahan pH pada sampel, sistem pencahayaan, dan keberadaan oksigen. Persen inhibisi tertinggi terdapat pada konsentrasi 0.833 mg/dL, sebesar 84.88%. Rata – rata persen inhibisi sampel adalah 83.41%.

Kata kunci : antioksidan, DPPH, vitamin C

ABSTRACT

Antioxidants have been the focus of significant research in the context of health and food. Antioxidants play a role in fighting free radicals in the body, thereby providing a positive effect on body health. The declining level of human health (increasing prevalence of non-communicable diseases), makes the presence of antioxidants (food) increasingly important. Therefore, this research aims to analyze the antioxidant activity of food sources of antioxidants (vitamin C) and determine the methods used to analyze the antioxidant activity of these foods. In the end, this research can be a reference regarding sources of antioxidants. This research was conducted on December 15 2020 at the Biochemistry Laboratory, Department of Community Nutrition, Bogor Agricultural Institute. The research design used was descriptive analysis using the DPPH spectrophotometric method. The results of this research show that standard measurements tested at concentrations between 0.05-10 mg/dL show quite ideal absorbance values (0.289-0.701). The higher the concentration in the standard, the absorbance value decreases, the more electrons are donated by ascorbic acid to make DPPH free radicals more stable. Antioxidant activity in the samples showed fluctuating percent inhibition. This condition can be caused by several factors such as contamination with other substances, changes in pH in the sample, lighting system, and the presence of oxygen. The highest percent inhibition was found at a concentration of 0.833 mg/dL, amounting to 84.88%. The average percent inhibition of the sample was 83.41%.

Keywords : antioxidant, DPPH, vitamin C

PENDAHULUAN

Perkembangan penelitian dalam bidang kesehatan dan pangan telah menjadi perhatian para peneliti pada peran antioksidan dalam memelihara keseimbangan redoks dan kesehatan

manusia. Radikal bebas, sebagai produk sampingan dari proses metabolismik dan paparan lingkungan, dapat menyebabkan stres oksidatif yang dikenal sebagai penyebab penyakit degeneratif (penyakit tidak menular) seperti obesitas, kanker, diabetes, dan penyakit kardiovaskular (hipertensi). Sejalan dengan peran vital ini, penelitian antioksidan telah menjadi subjek yang semakin menarik dan relevan (Kumar & Pandey, 2015).

Antioksidan merupakan reduktan atau senyawa yang dapat memberikan elektron (*electron donor*) untuk menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Flieger et al., 2021). Radikal bebas yaitu senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya sehingga senyawa tersebut bersifat reaktif untuk mencari pasangan dengan menyerang dan mengikat elektron molekul yang ada di sekitarnya. Reaktivitas senyawa radikal bebas memiliki berbagai dampak seperti kerusakan sel atau jaringan, penyakit autoimun, penyakit degeneratif, dan kanker. Oleh karena itu, antioksidan berperan penting bagi tubuh manusia dalam menjaga kesehatan terutama mencegah terjadinya penyakit-penyakit tersebut (Martemucci et al., 2022).

Antioksidan digolongkan menjadi tiga kelompok berdasarkan mekanisme kerjanya yaitu antioksidan primer, sekunder, dan tersier. Antioksidan primer/antioksidan enzimatis merupakan antioksidan yang menghambat pembentukan senyawa radikal bebas dengan mengubah radikal bebas menjadi molekul yang kurang reaktif sebelum radikal bebas bereaksi. Antioksidan ini meliputi enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutation peroksidase. Antioksidan sekunder/antioksidan eksternal/antioksidan non-enzimatis merupakan antioksidan yang tidak dihasilkan oleh tubuh sehingga berasal dari makanan seperti vitamin C, vitamin E, flavonoid, beta karoten, isoflavan, dan lain sebagainya. Sementara itu, antioksidan tersier yaitu antioksidan yang memperbaiki kerusakan sel dan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas seperti enzim DNA *repair* dan metionin sulfoksida reduktase (Flieger et al., 2021).

Vitamin C digunakan sebagai antioksidan dalam penelitian ini. Vitamin C yaitu antioksidan yang larut dalam air dan mudah teroksidasi secara *reversibel* membentuk asam dehidro-L-asam askorbat dan kehilangan dua atom hidrogen yang menyebabkan vitamin C merupakan suatu zat reduktor yang kuat. Sebagai antioksidan, vitamin C berperan sebagai donor elektron yang bentuk tereduksinya dapat diubah kembali menjadi asam askorbat oleh glutation (Gegotek & Skrzylowska, 2022). Umumnya, vitamin C digunakan sebagai standar dalam pengujian aktivitas antioksidan (Kholifah et al., 2023).

Metode spektfotometri DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) merupakan salah satu metode pengukuran kapasitas antioksidan yang menggunakan *reagent* berupa DPPH. Metode ini tergolong metode yang sederhana, mudah, cepat, serta menggunakan sampel yang sedikit. Penangkapan hidrogen dari senyawa antioksidan oleh DPPH menjadi dasar dalam metode ini. DPPH berperan sebagai radikal bebas stabil yang ditangkap oleh antioksidan dari sampel yang kemudian diubah menjadi DPPH-H (bentuk tereduksi DPPH). Penangkapan hidrogen tersebut mengakibatkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning yang kemudian diukur menggunakan spektfotometer pada panjang 517 nm. Berdasarkan hasil pengujian, semakin kuning atau mendekati jernih perubahan warna tersebut yang ditandai dengan semakin kecilnya nilai absorbansi yang terukur, maka semakin tinggi kemampuan antioksidan dalam menangkap radikal DPPH (Baliyan et al., 2022). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada bahan pangan sumber antioksidan berupa minuman kesehatan sumber vitamin C (1000 mg vitamin C) dan mengetahui metode yang digunakan dalam menganalisis aktivitas antioksidan pada bahan pangan tersebut.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian analisis deskriptif eksperimental untuk mengetahui aktivitas antioksidan bahan pangan. Penelitian ini dilakukan pada 15 Desember 2020 di

Laboratorium Biokimia, Departemen Gizi Masyarakat, Institut Pertanian Bogor. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minuman kesehatan sumber vitamin C (You C 1000 Lemon Water; 1000 mg vitamin C), larutan standar asam askorbat 1 mg/mL, DPPH, metanol, dan akuades. Adapun alat-alat yang digunakan yaitu labu ukur, pipet mikro, pipet Mohr dan bulp, gelas ukur, vortex, spektofotometer, kuvet, tissue, dan lemari tertutup.

Penelitian dilakukan melalui dua tahap yaitu pembentukan kurva standar vitamin C sebagai antioksidan dan analisis kapasitas antioksidan menggunakan metode spektofotometri DPPH. Pembentukan kurva standar vitamin C dilakukan pada konsentrasi larutan standar asam askorbat 0,05, 1, 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/mL (M_f). Tahapan ini diawali dengan perhitungan volume larutan standar asam askorbat (V_s) dengan konsentrasi 1 mg/mL (M_s) dan volume akhir larutan standar sebanyak 10 mL (V_f) menggunakan rumus pengenceran dalam molar sehingga diketahui volume larutan standar asam askorbat yang harus ditambahkan pada setiap konsentrasi secara berurutan sebanyak 0,5, 10, 20, 40, 60, 80, dan 100 mL. Volume larutan standar asam askorbat tersebut dipipet ke dalam labu ukur kemudian ditambahkan 2 mL DPPH dan ditera menggunakan metanol. Setelah itu, larutan dalam labu ukur tersebut dihomogenkan menggunakan vortex. Setelah homogen, larutan didiamkan selama ±30 menit dalam ruang gelap (lemari tertutup). Setelah 30 menit, larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm.

Analisis kapasitas antioksidan diawali dengan pembuatan blanko dan sampel. Sebanyak 2 mL DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditera dengan 8 mL metanol yang kemudian digunakan sebagai blanko. Sementara itu, sampel berupa minuman kesehatan sumber vitamin C (1000 mg vitamin C) diencerkan satu kali dengan penambahan akuades hingga menghasilkan lima sampel dan satu sampel tidak mengalami pengenceran sehingga diperoleh enam sampel dengan konsentrasi yang berbeda. Perbandingan sampel dan akuades yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, dan 1:9. Setelah itu, sebanyak 1 mL sampel dimasukkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan akuades sesuai perbandingan. Kemudian, 7 mL metanol dan 2 mL DPPH ditambahkan ke dalam gelas ukur. Selanjutnya, sampel dalam gelas ukur tersebut dihomogenkan menggunakan vortex. Setelah homogen, sampel didiamkan selama ±30 menit dalam ruang gelap (lemari tertutup). Setelah 30 menit, sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm dan kapasitas antioksidan atau % inhibisi suatu bahan pangan dapat ditentukan (Baliyan et al., 2022).

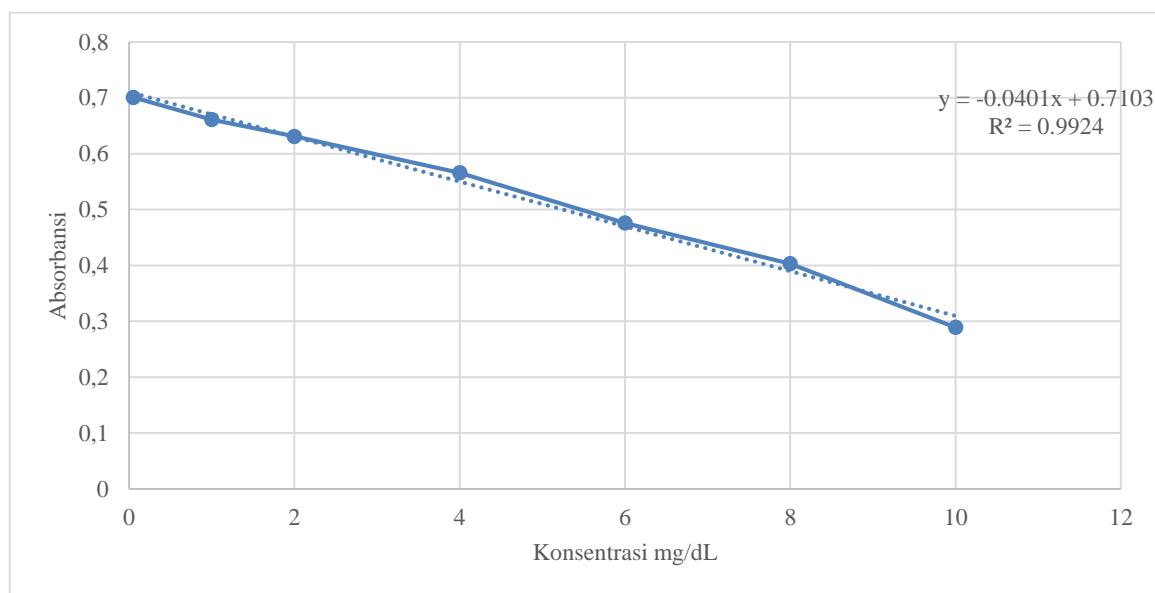
HASIL

Tabel 1 berikut akan menunjukkan hasil pengukuran standar (kontrol) antioksidan yang berasal dari asam askorbat. Gambar 1 berikut akan menunjukkan kurva standar antioksidan dengan model regresi linear dan nilai determinasi (R^2). Tabel 2 menunjukkan aktivitas antioksidan minuman sumber vitamin C pada penelitian ini dengan berbagai konsentrasi (mg/dL).

Tabel 1 menunjukkan hubungan antara konsentrasi dan absorbansi standar antioksidan. Pada Tabel 1 di atas ditunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi (mg/dL) standar antioksidan, maka akan semakin kecil nilai absorbansinya. Semakin kecil nilai absorbansi, maka akan semakin kuat aktivitas antioksidannya. Gambar 1 di bawah juga menjelaskan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi. Berdasarkan Gambar 1 di bawah dapat diinterpretasikan bahwa semakin tinggi konsentrasi standar, maka akan semakin rendah nilai absorbansinya (semakin baik aktivitas antioksidannya). Nilai determinasi (R^2) kurva standar yang ditunjukkan oleh persamaan regresi linear pada Gambar 1 adalah 0,9924. Hal ini menunjukkan bahwa, model regresi kurva standar antioksidan dapat menjelaskan variasi data sebesar 99,24% (sangat baik).

Tabel 1. Hasil Pengukuran Standar Antioksidan

Konsentrasi (mg/dL)	Absorbansi
0.05	0.701
1	0.661
2	0.631
4	0.566
6	0.476
8	0.403
10	0.289

**Gambar 1.** Kurva Standar Antioksidan**Tabel 2.** Aktivitas Antioksidan Minuman Sumber Vitamin C

No.	Sampel	Konsentrasi (mg/mL)	% inhibisi (%)
1	1	0.625	83.39
2	1:1	0.833	84.88
3	1:2	0.555	82.89
4	1:3	0.416	82.65
5	1:4	0.333	82.28
6	1:9	0.166	84.39

Tabel 2 menunjukkan aktivitas antioksidan sampel penelitian (minuman sumber vitamin C). Berdasarkan Tabel 2 dapat dijelaskan bahwa persentase inhibisi sampel minuman Vitamin C bersifat fluktuatif/variatif (naik turun) pada berbagai konsentrasi (mg/dL).

PEMBAHASAN

Penelitian dilakukan melalui dua tahap yaitu pembentukan kurva standar vitamin C sebagai antioksidan dan analisis kapasitas antioksidan sampel menggunakan metode spektrofotometri DPPH. Standar dalam analisis spektrofotometri sangat diperlukan untuk mendeteksi keberadaan suatu senyawa. Kurva kalibrasi atau kurva standar dalam pengujian spektrofotometri, didasarkan pada hukum *Lambert-* yang mana grafik konsentrasi dengan absorbansi akan membentuk suatu garis lurus. Kurva kalibrasi memudahkan dalam mengetahui konsentrasi suatu senyawa dalam sampel yang dapat dihitung dengan menggunakan persamaan

regresi $y=ax+b$, yang mana y adalah absorbansi, a adalah intersep, x adalah konsentrasi, dan b adalah kemiringan. Pada pengukuran kapasitas antioksidan diperlukan kurva standar sehingga perlu dibuat konsentrasi tertentu yang akan dinilai absorbansinya. Hasil pengukuran kurva standar antioksidan dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil pengukuran standar yang diuji pada beberapa konsentrasi antara 0.05-10 mg/dL menunjukkan nilai absorbansi yang cukup ideal yaitu 0.289-0.701. Hasil penelitian Yoga (2015) yang menggunakan konsentrasi standar 0-70 mg/L diperoleh nilai absorbansi ideal 0.2-0.8 pada asam askorbat terhadap radikal bebas DPPH 0.1mM. Rentang konsentrasi untuk sampel dipilih pada batas atas dan bawah linier dan titik tengah standar pada DPPH (Bolling, 2016).

Asam askorbat atau vitamin C dikenal sebagai sumber antioksidan yang sangat kuat karena dapat mendonorkan atom hidrogen dan membentuk radikal bebas askorbil yang relatif lebih stabil. Oleh karena itu, asam askorbat biasa digunakan sebagai standar dalam penentuan kapasitas antioksidan. Pada penelitian Thaipong *et al.* (2016), asam askorbat digunakan untuk membuat larutan standar (1 mg/mL). Kurva standar antioksidan dapat dilihat pada Gambar 1.

Grafik pada Gambar 1 menunjukkan kurva linier yang negatif berarti bahwa semakin tinggi konsentrasi maka semakin rendah nilai absorbansi dengan nilai $R^2 = 0.9924$. Pada saat konsentrasi 0.05 mg/dL diukur pada panjang gelombang 517 nm menunjukkan nilai absorbansi yang tinggi, namun ketika konsentrasi dinaikkan, nilai absorbansi menjadi berkurang hingga 0.289 pada konsentrasi 10 mg/dL, semakin banyak elektron yang disumbangkan oleh asam askorbat untuk menjadikan radikal bebas DPPH lebih stabil seiring dengan perubahan warna dari ungu menjadi semakin pudar akibat hilangnya sinyal resonansi paramagnetik dari elektron atau *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR) radikal bebas. Kurva standar digunakan dalam pengukuran sampel yang masih dalam rentang tersebut.

Penilaian aktivitas antioksidan pada sampel menggunakan metode DPPH. Sampel yang digunakan mengandung vitamin C dan merupakan salah satu sumber antioksidan. Prinsip metode ini yaitu radikal kromogen yang berwarna ungu (DPPH) akan direduksi oleh Vitamin C pada sampel ditandai dengan berubahnya warna menjadi kuning pucat. Kemampuan antioksidan sampel dalam mereduksi DPPH dievaluasi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 515-528 nm (Lugemwa *et al.*, 2020). Pelarut yang digunakan untuk melarutkan DPPH pada penelitian ini adalah metanol. DPPH hanya dapat dilarutkan oleh senyawa organik, seperti alkohol (Karadag *et al.*, 2019). Metanol merupakan salah satu bentuk alkohol. Pada penelitian ini juga dilakukan pengenceran terhadap sampel, dengan beberapa perbandingan. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi sampel yang bervariasi.

Konsentrasi sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 0.625 mg/mL, 0.833 mg/mL, 0.555 mg/mL, 0.416 mg/dL, 0.333 mg/mL, dan 0.166 mg/mL. Penggunaan konsentrasi yang bervariasi bertujuan untuk mengetahui konsentrasi aktivitas antioksidan terbaik dan pembuatan persamaan (grafik) aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan pada sampel dinilai menggunakan persen inhibisi. Persen inhibisi merupakan persentase radikal bebas (DPPH) yang dapat ditangkap oleh sampel. Persen inhibisi semakin tinggi menunjukkan semakin banyak DPPH yang dapat direduksi oleh antioksidan sampel. Persen inhibisi sebanding dengan konsentrasi antioksidan. Tabel 2 di atas merupakan aktivitas antioksidan pada sampel menggunakan persen inhibisi.

Konsentrasi sampel pada Tabel 2 mengalami penurunan jika dilihat dari urutan ke-1 sampai ke-6. Hal ini disebabkan oleh faktor pengencer. Faktor pengencer yang semakin banyak menyebabkan penurunan konsentrasi sampel. Pada prinsipnya semakin tinggi persentase inhibisi maka akan semakin banyak DPPH yang direduksi (baik). Idealnya, persen inhibisi pada Tabel 2 semakin menurun jika diurutkan dari urutan ke-1 sampai ke-6 karena konsentrasi sampel yang semakin berkurang. Akan tetapi, hasil penelitian menunjukkan persen inhibisi yang fluktuatif. Kondisi ini ditunjukkan oleh meningkatnya persen inhibisi pada konsentrasi

sampel urutan ke-2 dan ke-6. Persen inhibisi paling tinggi berdasarkan Tabel 2 adalah pada konsentrasi 0.833 mg/dL, sebesar 84.88%.

Rata – rata persen inhibisi sampel pada beberapa konsentrasi di Tabel 2 adalah 83.41%. Persen inhibisi tersebut dikategorikan tinggi. Menurut Benmehdi *et al.* (2017), vitamin C memiliki potensi efek antioksidan dengan IC_{50} adalah pada konsentrasi 0.0331 mg/mL. Pada penelitiannya dengan konsentrasi vitamin C 0.5 mg/mL akan memiliki persen inhibisi sebesar 98%. Secara umum, aktivitas antioksidan yang normal ditunjukkan dengan pengurangan persentase inhibisi pada Tabel 2 karena penurunan konsentrasi sampel. Akan tetapi, persen inhibisi pada sampel menunjukkan hasil fluktuatif. Karadag *et al.* (2019) menyatakan persentase inhibisi yang menurun pada sampel konsentrasi tinggi menunjukkan reaksi antioksidan yang terjadi antara DPPH dan sampel. Metode DPPH merupakan salah satu metode pengukuran kapasitas antioksidan berdasarkan transfer elektron atau *electron transfer* (ET). Kemampuan dalam mendeteksi potensi antioksidan berdasarkan transfer satu elektron untuk mengurangi komponen tertentu, termasuk metal, karbonil, dan radikal.



Metode transfer elektron berdasarkan proses deprotonasi dan ionisasi antioksidan. Potensi ionisasi akan menurun dengan meningkatnya pH dan meningkatnya kapasitas donor elektron (Lemanska *et al.*, 2018). Dengan demikian, hasil persentase inhibisi yang berbeda (fluktuatif) pada persentase inhibisi ke-1 sampai ke-6 dapat disebabkan beberapa faktor kemungkinan: a) adanya kontaminasi zat lain terutama ion metal yang ikut tertangkap oleh DPPH dan mempengaruhi hasil persentase inhibisi b) perubahan pH pada sampel juga akan mempengaruhi absorbansi (Ulusoy *et al.*, 2021). Sistem pencahayaan dan keberadaan oksigen pada saat penelitian terbatas (tidak ideal), sehingga dapat menjadi faktor penyebab perbedaan fluktuatif persen inhibisi pada beberapa konsentrasi sampel (Gulcin & Alwasel., 2023).

KESIMPULAN

Aktivitas antioksidan dapat diukur melalui persen inhibisi melalui metode spektrofotometri DPPH. Standar dalam analisis spektrofotometri sangat diperlukan untuk mengetahui konsentrasi suatu senyawa dalam sampel yang akan dinilai absorbansinya. Berdasarkan hasil pengukuran standar antioksidan pada beberapa konsentrasi menunjukkan nilai absorbansi yang cukup ideal. Semakin tinggi konsentrasi standar, nilai absorbansi semakin berkurang, semakin banyak elektron yang disumbangkan oleh asam askorbat untuk menjadikan radikal bebas DPPH lebih stabil. Hasil penelitian aktivitas antioksidan menunjukkan persen inhibisi yang fluktuatif. Kondisi ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti kontaminasi zat lain, perubahan pH pada sampel, sistem pencahayaan, dan keberadaan oksigen. Rata – rata persen inhibisi sampel adalah 83.41%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan Terima Kasih diucapkan kepada Departemen Gizi Masyarakat, Fakultas Ekologi Manusia, Institut Pertanian Bogor yang telah menjadi tempat penelitian ini. Selain itu, ucapan terima kasih juga diucapkan kepada subjek dan tim peneliti yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Akar, Z., Küçük, M., Doğan ,H. (2017). A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 32 (1): 640-647.

- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, RP., Chang, CM. (2022). Determination of antioxidants by DPPH radical scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4):1326.doi: <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules27041326>.
- Benmehdi, H., Behilil, A., Memmou, F., Amrouche, A. (2017). Free radical scavenging activity, kinetic behaviour and phytochemical constituents of *Aristolochia clematitis* L. Roots. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1402-S1408
- Bolling, B. W. (2016). Assay dilution factors confound measures of total antioxidant capacity in polyphenol-rich juices. *J Food Sci*, 77(2):69-75.
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: classification, natural sources, activity/capacity, measurement, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, 14, 4135.doi: <https://doi.org/10.3390/ma14154135>.
- Gegotek, A., Skrzyllewska, E. (2022). Antioxidant and anti-inflammatory activity of ascorbic acid. *Antioxidants*, 11(10),1993.doi: <https://doi.org/10.3390/antiox11101993>.
- Gulcin, I., Alwasel, SH. (2023). DPPH radical scavenging assay. *Processes*. 11(8),2248. doi: <https://doi.org/10.3390/pr11082248>.
- Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. (2019). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analysis Methods*, 2:41-60 doi: 10.1007/s12161-008-9067-7.
- Kholifah, E., Nurazizah, D., Noviyanto, F. (2023). Antioxidant activity and vitamin C concentration analysis of gandaria (*Bouea macrophylla* griff) ethanol extract using spectrophotometry UV Vis. *Journal of Fundamental and Applied Pharmaceutical Science*. doi: 10.18196/jfaps.v2i1.15992.
- Kumar, S., Pandey, A. K. (2015). Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbals. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 7(6), 438–457. <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2015/16284>.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R. (2018). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(7):869-81.doi:10.1016/S0891-5849(01)00638-4.
- Lugemwa, FN., Snyder, AL., Shaikh, K. (2020). Determination of radical scavenging activity and total of wine and spices: A randomized study. *Antioxidants*. 2:110-121; doi: 10.3390/antiox2030110.
- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., D'Allesandro, AG. (2022). Free radical properties, sources and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2),48-47. doi: <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. (2016). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Composition and Analysis*. 19:669-675.
- Ulusoy, H., Ceylan, S., Peker, H. (2021). Determination of antioxidant and antimicrobial activity of sweetgum (*Liquidambar orientalis*) leaf, a medicinal plant. *Polimeros*. 31(2), e2021015, 2021, doi: <https://doi.org/10.1590/0104-1428.04221>.
- Yoga, I. B. K. W. (2015). Penentuan konsentrasi optimum kurva standar antioksidan; asam galat, asam askorbat dan trolox® terhadap radikal bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,1 mM. Proceedings Seminar Nasional FMIPA UNDIKSHA V. Universitas Udayana-Bali.