

Studi Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Mangga Bachang (*Mangifera foetida* Lour.) dan Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

¹Nia Kristiningrum, ²Sri Hernawati, ¹Rizki Putri Aulia, ¹Pramudia Wardani

¹ Fakultas Farmasi Universitas Jember, Jl. Kalimantan I / 2 Kampus Tegal Boto, Jember, 2. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Jl. Kalimantan I / 37 Kampus Tegal Boto
Email: niakristiningrum.farmasi@unej.ac.id

Abstrak

Radikal bebas berperan sebagai pemicu pada berbagai penyakit degeneratif diantaranya adalah diabetes melitus dan hipertensi. Secara umum ada mekanisme perlindungan dalam sel dan jaringan tubuh terhadap radikal bebas namun pertahanan dari dalam tubuh seringkali masih kurang sehingga dapat menyebabkan stres oksidatif pada sel. Resiko dari penyakit ini dapat dikurangi dengan mensuplai senyawa antioksidan alami yang berasal dari tanaman. Diantara tanaman yang memiliki potensi sebagai antioksidan yaitu rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). Kelopak bunga rosella mengandung banyak asam organik seperti asam sitrat, asam askorbat, dan pektin serta mengandung polifenol seperti antosianin, asam fenolik, dan flavonoid. Tanaman lain yang diduga memiliki potensi sebagai antioksidan adalah mangga pakel (*Mangifera foetida* Lour.). Hal ini disebabkan karena kandungan mangiferin pada daun mangga yang merupakan senyawa golongan polifenol. Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antioksidan kombinasi antara ekstrak etanol daun mangga pakel dan kelopak bunga rosella dalam berbagai perbandingan dengan tujuan mendapatkan kombinasi yang memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi. Metode yang digunakan pada pengujian aktivitas antioksidan adalah metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl). DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil. Dalam bentuk radikal DPPH dapat diabsorbansi pada panjang gelombang 515-520 nm tetapi dengan adanya reaksi dengan senyawa antioksidan akan mengalami penurunan absorbansi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Nilai IC₅₀ untuk ekstrak etanol daun mangga pakel sebesar 7,634±0,142 µg/ml, ekstrak etanol kelopak bunga rosella 83,154±0,286 µg/ml, dan nilai IC₅₀ kombinasi ekstrak etanol daun mangga pakel dengan ekstrak etanol kelopak bunga rosella pada perbandingan 2:1 adalah 27,005±0,218 µg/ml, perbandingan 1:1 adalah 43,277±0,504 µg/ml dan perbandingan 1:2 adalah 58,171±0,875 µg/ml. Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan terbesar adalah ekstrak etanol daun mangga pakel, sedangkan kombinasi ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan terbesar adalah kombinasi ekstrak etanol daun mangga pakel dan ekstrak etanol kelopak bunga rosella dengan perbandingan 1:1.

Kata Kunci: aktivitas antioksidan, *Hibiscus sabdariffa* L., *Mangifera foetida* Lour. Radikal bebas, DPPH

1. PENDAHULUAN

Radikal bebas berkontribusi pada ratusan penyakit diantaranya aterosklerosis, artritis, iskemia, gastritis, kanker, AIDS, penyakit degeneratif seperti diabetes melitus, hipertensi dan lainnya (Dalle-Donne et al., 2006; Sen et al., 2010). Pembentukan radikal bebas dapat terjadi di dalam sel dan jaringan tubuh secara normal sebagai hasil dari proses metabolisme. Selain itu, radikal bebas juga dapat bersumber dari luar tubuh, misalnya paparan radiasi, ozon, asap rokok, polusi udara, dan bahan kimia (Sen et al., 2010).

Secara umum ada mekanisme perlindungan dalam sel dan jaringan tubuh untuk melindungi kerusakan akibat radikal bebas yaitu melalui sistem antioksidan yang diproduksi dalam tubuh misalnya glutathion peroksidase, katalase, dan superoksida dismutase (Pietta, 2000). Pertahanan dari dalam tubuh seringkali masih kurang akibat pengaruh lingkungan dan makanan yang buruk sehingga dapat menyebabkan stres oksidatif pada sel dan dapat memicu pada terjadinya penyakit (Pham-Huy et al., 2008). Resiko dari penyakit tersebut dapat dikurangi dengan mensuplai senyawa antioksidan dari luar tubuh (Tiwari, 2001).

Antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua bagian, yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami (Inggrid dan Santoso, 2014). Salah satu sumber antioksidan alami yaitu dari tanaman. Tanaman yang memiliki aktivitas antioksidan umumnya mengandung senyawa fenol dan

flavonoid (Baba & Malik, 2015). Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai antioksidan yaitu rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*). Kelopak bunga rosella mengandung banyak asam organik seperti asam sitrat, asam askorbat, dan pektin serta mengandung polifenol seperti antosianin, asam fenolik, dan flavonoid (Tzu-Li et al., 2007). Berdasarkan penelitian sebelumnya ekstrak air kelopak bunga rosella memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} yaitu 486,52 $\mu\text{g/ml}$ (Liuqing et al., 2012).

Tanaman lain yang diduga memiliki potensi sebagai antioksidan adalah mangga pakel (*Mangifera foetida Lour.*). Hal ini disebabkan karena kandungan mangiferin yang dimiliki daun mangga. Mangiferin merupakan senyawa golongan polifenol yang memberikan kontribusi terhadap aktivitas antioksidan (Barreto et al., 2008).

Pada penelitian ini dilakukan kombinasi antara ekstrak etanol daun mangga pakel dan kelopak bunga rosella dalam berbagai perbandingan dengan tujuan agar didapatkan kombinasi yang memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dari ekstrak tunggal kelopak bunga rosella serta diharapkan memiliki aktivitas antidiabetes dan antihipertensi. Metode yang digunakan pada pengujian aktivitas antioksidan adalah metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl). DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil. Dalam bentuk radikal DPPH dapat diabsorbansi pada panjang gelombang 515-520 nm tetapi dengan adanya reaksi dengan senyawa antioksidan akan mengalami penurunan absorbansi. Metode ini dipilih karena mudah, cepat, dan sensitif untuk pengujian antioksidan pada ekstrak tanaman (Sagar dan Singh, 2011).

2. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Analisis, Fakultas Farmasi, Universitas Jember mulai dari ekstraksi hingga analisis sampel. Waktu pelaksanaan penelitian dilakukan mulai bulan Desember 2016.

2.2. Alat dan Bahan Penelitian

2.2.1. Alat

Spektrofotometer (Hitachi U-1800), rotary evaporator (Steroglass Strike 300), timbangan analitik (Sartorius), ultrasonic cleaner (Elmasonic), mikropipet (Socorex), penghalus serbuk, maserator, oven, alat-alat gelas, kuvet disposable, batang pengaduk, spatula, ball filler, dan stopwatch.

2.2.2. Bahan

Kelopak bunga rosella yang didapatkan di Desa Tawang Sari, Kecamatan Pujon, Kabupaten Malang, daun mangga pakel yang didapatkan di Desa Gambiran, Kecamatan Kalisat, Kabupaten Jember, difenilpikrilhidrazil/DPPH (Sigma-Aldrich), vitamin C (PT. Brataco), metanol (teknis), etanol 96%, dan akuades.

2.3. Pembuatan Simplisia

Kelopak bunga rosella dan daun mangga pakel segar disortasi basah, dicuci dengan air mengalir, dipotong kecil-kecil, dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam ruangan, tidak terkena sinar matahari langsung selama 3 hari. Selanjutnya daun dan kelopak bungan dimasukkan ke dalam oven suhu 40-46°C untuk pengeringan dan dilanjutkan dengan sortasi kering. Simplisia dihaluskan dan diayak sehingga diperoleh serbuk dengan ukuran yang seragam.

2.4. Ekstraksi Simplisia

Simplisia kelopak bunga rosella dan daun mangga pakel ditimbang masing-masing sejumlah 200 g kemudian dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 2 liter di dalam maserator. Maserat yang diperoleh diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 50 °C dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak selanjutnya dibuat dalam 3 formulasi dengan perbandingan seperti yang ditunjukkan pada tabel 1. Masing – masing formula selanjutnya di uji aktivitas antioksidannya.

Tabel 1. Formulasi ekstrak tunggal dan kombinasi

Perbandingan EM:ER	Aktivitas antioksidan		Fenol total dan flavonoid total	
	Berat EM (mg)	Berat ER (mg)	Berat EM (mg)	Berat ER (mg)
1:0	30	-	25	-
2:1	20	10	16,4	8,6
1:1	15	15	12,5	12,5
1:2	10	20	8,6	16,4
0:1	-	30	-	25

EM: Ekstrak etanol daun mangga pakel; ER: Ekstrak etanol kelopak bunga rosella

2.5. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

2.5.1. Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak etanol daun mangga pakel dan kelopak bunga rosella serta kombinasinya ditimbang sebanyak 30 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol pada labu ukur 25 ml dan 10 ml. Kemudian dilakukan pengenceran dengan metanol sehingga diperoleh beberapa konsentrasi larutan uji. Konsentrasi larutan uji dari ekstrak etanol daun mangga pakel yaitu 12 µg/ml, 24 µg/ml, 36 µg/ml, 48 µg/ml, 60µg/ml, 72 µg/ml, 120 µg/ml. Konsentrasi uji dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella yaitu 120 µg/ml, 240 µg/ml, 480 µg/ml, 600 µg/ml, 1200 µg/ml, 2400 µg/ml, 3000 µg/ml. Sedangkan konsentrasi larutan uji kombinasi ekstrak etanol daun mangga pakel dan kelopak bunga rosella yaitu 36 µg/ml, 72 µg/ml, 120 µg/ml, 240 µg/ml, 360 µg/ml, 720 µg/ml, dan 1200 µg/ml.

2.5.2. Pembuatan Larutan Vitamin C

Vitamin C ditimbang sebanyak 25 mg dan 30 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan metanol hingga diperoleh vitamin C dengan konsentrasi sebesar 2500 µg/ml dan 3000 µg/ml. Larutan ini selanjutnya diencerkan dengan metanol hingga diperoleh satu seri konsentrasi larutan vitamin C akhir yaitu 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 250 µg/ml, 300 µg/ml.

2.5.3. Pembuatan Larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 1 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml kemudian dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 0,1 mM.

2.5.4. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal DPPH

Sebelum dilakukan pengujian aktivitas antioksidan terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum dengan memipet sebanyak 1,2 mL larutan DPPH 0,1 mM kemudian ditambahkan 0,3 ml metanol. Campuran dikocok hingga homogen dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan dan dalam tempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 400-600 nm.

2.5.5. Penentuan Waktu Inkubasi sampel

Larutan uji ekstrak daun mangga pakel dan kelopak bunga rosella masing-masing direaksikan dengan larutan DPPH dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimumnya mulai menit ke-0 sampai menit ke-60 dengan selang waktu 5 menit.

2.5.6. Penetapan Aktivitas Antioksidan Larutan Uji dan Vitamin C

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara memipet sebanyak 0,3 ml dari masing-masing larutan uji ekstrak dan larutan vitamin C lalu dimasukkan kedalam kuvet yang berisi 1,2 ml DPPH 0,1 mM. Campuran dikocok sampai homogen kemudian diinkubasi pada suhu ruang sesuai hasil optimasi waktu inkubasi. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yaitu 515 nm.

2.5.7. Perhitungan

Perhitungan aktivitas antioksidan ditentukan dari persen peredaman warna ungu dari larutan DPPH pada panjang gelombang maksimum digunakan rumus sebagai berikut: (Molyneux, 2004)

$$\text{Inhibisi DPPH} = (\text{Abs DPPH} - \text{Abs larutan uji}) / (\text{Abs DPPH}) \times 100\%$$

Setelah diperoleh data inhibisi DPPH kemudian dibuat kurva baku antara konsentrasi larutan uji sebagai x dengan peredaman DPPH sebagai y, setelah itu persamaan regresi yaitu: $y = Bx + A$. Dari persamaan tersebut kemudian dihitung nilai IC50 dengan memasukkan nilai 50 pada y. IC50 dari larutan uji merupakan konsentrasi efektif untuk meredam aktivitas radikal bebas larutan DPPH sebesar 50%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Ekstraksi

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pengumpulan sampel. Sampel yang digunakan adalah daun mangga pakel tua yang berwarna hijau tua, kemudian sampel kelopak bunga rosella yang digunakan yaitu kelopak bunga rosella yang sudah tua dan diperoleh di daerah dataran tinggi, berwarna merah gelap. Tahapan selanjutnya adalah sortasi basah dari masing-masing sampel tumbuhan. Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran-kotoran, bagian tumbuhan yang rusak, dan pengotor lainnya. Selanjutnya dilakukan pencucian daun pakel dan kelopak bunga rosella dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan mengurangi jumlah mikroba. Setelah dicuci, sampel tanaman dipotong menjadi bagian yang lebih kecil untuk mempermudah proses pengeringan, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat yang terbuka dan tidak terkena sinar matahari langsung selama beberapa hari. Kemudian dilanjutkan dengan pengeringan akhir dengan oven pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$. Sebelum dihaluskan, simplisia disortasi kering untuk memisahkan benda-benda asing dan pengotor lain yang masih ada. Proses selanjutnya yaitu dilakukan penghalusan, hal ini bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel sehingga akan mempercepat kelarutan senyawa ke dalam pelarut pengeskrak.

Pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi tanaman daun mangga pakel dan kelopak bunga rosella yaitu pelarut etanol. Pelarut etanol memiliki kemampuan yang baik untuk menarik senyawa-senyawa golongan polifenol (Alothaman et al., 2009). Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi. Ekstrak kental yang dihasilkan kemudian ditimbang untuk menghitung rendemennya. Hasil perhitungan rendemen ditunjukkan pada Tabel 3.1. Rendemen adalah perbandingan antara bobot ekstrak yang diperoleh dengan bobot simplisia awal. Nilai rendemen menunjukkan keefektifan proses ekstraksi. Efektivitas proses ekstraksi dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan sebagai penyari, ukuran partikel simplisia, serta metode ekstraksi.

Tabel 3.1. Hasil ekstraksi sampel

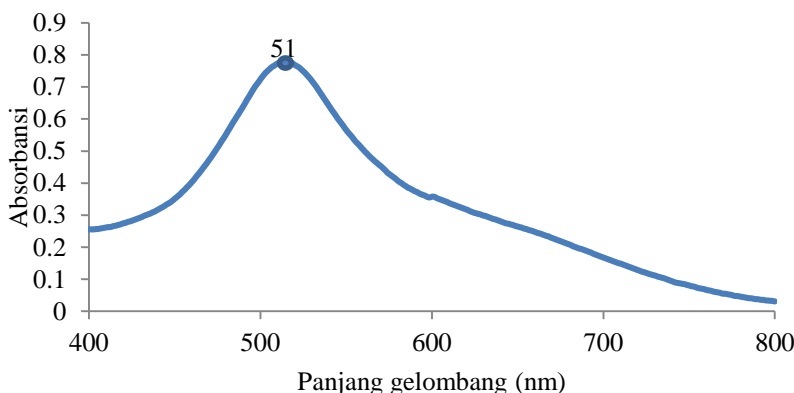
Sampel	Bobot serbuk (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol daun mangga pakel	200,00	19,31	9,65
Ekstrak etanol kelopak bunga rosella	200,00	47,55	23,78

Berdasarkan tabel 3.1 dapat diketahui bahwa rendemen yang diperoleh berbeda pada masing-masing tanaman. Perbedaan hasil rendemen tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan jumlah senyawa yang dapat larut dalam pelarut etanol pada tanaman yang diekstraksi (Hsu et al., 2005).

3.2. Pengujian Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

3.2.1. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

Sebelum dilakukan uji aktivitas antioksidan, terlebih dahulu dilakukan pemindaian panjang gelombang maksimum. Pemindaian panjang gelombang bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang dapat memberikan absorbansi tertinggi dari senyawa yang akan dideteksi. Pada penelitian ini diperoleh panjang gelombang maksimum yaitu 515 nm. Secara teoritis, menurut Molyneux (2004) panjang gelombang yang biasa digunakan untuk melakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH adalah sekitar 515-520 nm. Hasil penetapan panjang gelombang maksimum ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Panjang gelombang maksimum DPPH

3.2.2. Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan mereaksikan 1,2 mL DPPH 0,1 mM dengan 0,3 mL larutan uji dengan waktu inkubasi sampel 45 menit untuk ekstrak rosella dan 60 menit untuk ekstrak mangga dan kombinasi. Waktu inkubasi tersebut merupakan hasil dari optimasi waktu inkubasi reagen dengan sampel. Nilai IC₅₀ sampel dapat dihitung setelah diperoleh persamaan dari regresi linier antara konsentrasi larutan uji dengan kemampuan peredaman DPPH (%) dari masing-masing sampel. Semakin rendah nilai IC₅₀ maka aktivitas antioksidan akan semakin tinggi (Molyneux, 2004). Pada penelitian ini digunakan kontrol positif yaitu vitamin C untuk memastikan metode yang diterapkan telah benar dan dapat menghasilkan nilai yang sesuai. Menurut penelitian Pamungkas (2016), IC₅₀ vitamin C adalah 2,613 µg/mL, sedangkan menurut penelitian Cahyani (2015) adalah 3,650 µg/mL. Pada penelitian ini nilai IC₅₀ adalah 3,409 ± 0,047 µg/mL. Nilai tersebut menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ tersebut sesuai dengan rentang. Perbedaan

nilai IC dapat disebabkan oleh beberapa hal, seperti adanya perbedaan kondisi analisis (Behera et al., 2012).

Hasil pengukuran aktivitas antioksidan untuk masing – masing formula ditunjukkan pada tabel 3.2. Berdasarkan hasil pada tabel 4.2 menunjukkan bahwa aktivitas yang paling tinggi dimiliki oleh ekstrak etanol daun mangga pakel dengan nilai IC_{50} yaitu $7,634 \pm 0,142 \mu\text{g/mL}$, sedangkan dari ketiga kombinasi ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yaitu pada perbandingan 2:1 dengan nilai IC_{50} yaitu $27,005 \pm 0,218 \mu\text{g/mL}$. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan dari kombinasi 1:1, kombinasi 1:2, serta ekstrak etanol rosella berturut-turut adalah (IC_{50} $43,277 \pm 0,504 \mu\text{g/mL}$), (IC_{50} $58,171 \pm 0,875 \mu\text{g/mL}$), serta (IC_{50} $83,154 \pm 0,286 \mu\text{g/mL}$). Hasil pengujian masing-masing sampel, memiliki perbedaan yang signifikan satu terhadap yang lain dengan ditunjukkan nilai $-p\text{-value} \leq 0,01$ pada uji one way ANOVA dan LSD.

Tabel 3.2. Hasil nilai IC_{50} masing-masing sampel

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mg}$)	Rata-rata IC_{50} ($\mu\text{g/mg}$)	SD	RSD (%)
Vitamin C	3,389	3,409	0,047	1,393
	3,376			
	3,464			
Ekstrak daun mangga pakel	7,559	7,634	0,142	1,865
	7,545			
	7,798			
Ekstrak kelopak bunga rosella	83,452	83,154	0,286	0,343
	82,883			
	83,127			
Kombinasi EM:ER (2:1)	26,861	27,005	0,218	0,809
	27,255			
	26,898			
Kombinasi EM:ER (1:1)	43,154	43,277	0,504	1,165
	42,845			
	43,831			
Kombinasi EM:ER (1:2)	57,881	58,171	0,875	1,504
	58,588			
	57,043			

Ekstrak etanol daun mangga pakel memiliki aktivitas antioksidan yang paling besar. Hal ini dikarenakan ekstrak etanol daun mangga pakel mengandung senyawa mangiferin yang merupakan senyawa flavonoid utama pada genus *Mangifera* (Jutiviboonsuk & Sardsaengjun, 2010). Senyawa tersebut merupakan golongan senyawa fenolik (Vermerris & Nicholson, 2006) yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan (Apak et al., 2007). Berdasarkan penelitian dari Liuqing et al.(2012) aktivitas antioksidan dari kelopak bunga rosella yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol memiliki nilai IC_{50} yaitu sebesar $289,01 \mu\text{g/ml}$ sedangkan nilai hasil percobaan menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih besar yaitu $83,154 \mu\text{g/ml}$. Perbedaan nilai IC_{50} ini dapat disebabkan oleh adanya perbedaan sampel rosella yang digunakan yaitu perbedaan tempat tumbuh dari tanaman sehingga menyebabkan adanya perbedaan kandungan metabolit sekunder. Kandungan metabolit sekunder dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti suhu, kelembaban, cahaya, dan kondisi tanah.

4. SIMPULAN

Nilai IC₅₀ untuk ekstrak etanol daun mangga pakel sebesar 7,634±0,142 µg/ml, ekstrak etanol kelopak bunga rosella 83,154±0,286 µg/ml, dan nilai IC₅₀ kombinasi ekstrak etanol daun mangga pakel dengan ekstrak etanol kelopak bunga rosella pada perbandingan 2:1 27,005±0,218 µg/ml, perbandingan 1:1 43,277±0,504 µg/ml dan perbandingan 1:2 58,171±0,875 µg/ml.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Alothman, M., R. Bhat, A.A. Karim. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chem.*, 115 (2009), pp. 785-788
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Esin, Ç. S., Bekta, O. B., Berker, K., Özyurt, D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12: 1496-1547.
- Baba, S. A., & Malik, S.A. 2015. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisemia jacquemontii* Blume. *Journal of Taibah University for Science*. 9(4):449-454.
- Barreto, J. C., Trevisan, M. T. S., Hull, W. E., Erben, G., de Brito, E. S., Pfundstein, B. 2008. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 :5599-5610.
- Behera B.C., Verma N, Sonone A And Makhija U. 2012. Antioxidant And Antibacterial Properties Of Some Cultured Lichens. *Bioresour Technol* 99: 776-784.
- Dalle-Donne, I., Ranieri R., Roberto C., Daniela G., Aldo M. 2006. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry*. 52:4 601– 623.
- Hsu B, Coupar IM, Ng K. 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem*. 98, 317-328.
- Inggrid, M., Santoso, H. 2014. *Ekstraksi Antioksidan dan Senyawa Aktif dari Buah Kiwi (Actinidia deliciosa)*. Universitas Katolik Parahyangan.
- Jutiviboonsuk, A. dan Sardsaengjun, C. 2010. Mangiferin in Leaves of Three Thai Mango (*Mangifera indica*) Varieties. *IJPS*. Vol. 6 (3): 122-129.
- Liuqing, Y., Ying, G., Ting Z., Jiangli Z., Fang L., Bingtao Z., Xiangyang W. 2012. Antioxidant capacity of extract from calyx fruits of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *African Journal of Biotechnology*. 11(17): 4063-4068.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical *diphenylpicryl-hydrazyl* (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*. 26 : 211–219.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *IJBS*. 4 (2):89–96.
- Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as Antioxidant. *Journal of natural product*. 63(7):1035-1042.
- Sagar, B.K., Singh, R.P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.*, 48(4):412– 422.
- Sen, S. 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int. J. Pharm*. 3 (1):91–100.
- Tiwari, A.K. 2001. Imbalance in antioxidant defense and human diseases: *Multiple approach of natural antioxidant therapy*. 8: 1179–1187.
- Tzu-Li lin, Lin, H.H., Chen, C.C., Lin, M.C., Chou, M.C., Wang, C.J. (2007). Hibiscus Sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research* . 27: 140-145.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Netherlands: Springer.