

RADICALS ARREST OF 2,2-diphenyl-1-ptycryl hydrazyl (DPPH) IN RIPE AND RAW PAPAYA FRUIT (*Carica papaya* L. (orentang))

PENANGKAPAN RADIKAL 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) BUAH PEPAYA (*Carica papaya* L. (jingga)) TUA DAN MUDA

Emir Ramadhan*, Sudarsono

Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University, Yogyakarta Indonesia

ABSTRACT

*Some compounds were potentially as a radical catcher, it was also found in the papaya fruit (*Carica papaya* L. (orentang)). This study aimed to determine 2,2-diphenyl-1-ptycrylhydrazyl (DPPH) radical capture of ripe and raw papaya fruits with vitamin C synthetic as a benchmark. Mashed papaya pulp was dried by the freeze-drying method. The dried mass was dissolved in ethanol and reacted with DPPH. Vitamin C was also treated by the same method, then made a standard and curve of percent DPPH radical arrest by vitamin C. Percent DPPH radical capture by the ripe and raw papaya fruit powder extracts was plotted on a standard curve. Ripe papaya fruit had the ability to capture the highest DPPH radical (1.340,931 mg of fresh ripe papaya proportional to 1 mg of vitamin C). The raw papaya had the capability of 3.557,814 mg of fresh raw papaya proportional to 1 mg of vitamin C.*

*Keyword : *Carica papaya* L., vitamin C, DPPH*

ABSTRAK

*Beberapa senyawa yang berpotensi sebagai penangkap radikal diketahui terdapat juga di dalam buah pepaya (*Carica papaya* L. (jingga)). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penangkapan radikal 2,2-diphenyl-1-ptycryl hydrazyl (DPPH) antara buah pepaya tua dan muda dengan perbandingan vitamin C sintetik. Daging buah pepaya dihaluskan, kemudian dikeringkan dengan metode freeze - drying. Hasil pengeringan dilarutkan dalam etanol untuk direaksikan dengan DPPH. Vitamin C juga diperlakukan dengan metode yang sama, kemudian dibuat sebuah kurva baku persen penangkapan radikal DPPH oleh vitamin C. Persen penangkapan radikal DPPH oleh sari serbuk buah pepaya muda dan tua diplotkan pada kurva baku tersebut. Buah pepaya tua memiliki kemampuan penangkapan radikal DPPH sebesar 1.340,931 mg pepaya tua segar sebanding dengan 1 mg vitamin C. Buah pepaya muda memiliki kemampuan sebesar 3.557,814 mg pepaya muda segar sebanding dengan 1 mg vitamin C.*

*Kata kunci : *Carica papaya* L., vitamin C, DPPH*

PENDAHULUAN

Asupan gizi pada asupan makan yang secara kontinyu dapat berdampak pada penumpukan senyawa oksigen reaktif (ROS) dan pada jangka panjangnya akan cenderung terjadinya penyakit kelainan metabolik (Langseth, 1995, Winarsi, 2007). Kini pola makan yang banyak ditemui lebih tertuju pada sesuatu yang cepat saji (*instan*) serta praktis. Hal ini dapat dilihat dari sebuah contoh di masyarakat moderen yang cenderung gemar pada penggunaan suplemen-suplemen terutama suplemen vitamin C yang beredar di pasaran dibandingkan

bersusah payah untuk dilakukan pemotongan atau pengolahan buah segar untuk dikonsumsi; kemudian beberapa pertanyaan muncul di pihak penulis. Masyarakat sekarang memang sedang diberi masukan populer dengan perantaraan istilah antioksidan terutama yang bersumber dari vitamin C. Antioksidan berfungsi pada penghambatan oksidasi (Pokorni, dkk., 2001). Pada hakekatnya kandungan buah alami lebih kompleks. Maka sebuah bukti ilmiah perlu dimunculkan untuk keseimbangan wawasan dalam pertimbangan dalam penentuan alternatif pemilihan bahan alami dan bahan sintetik. Salah satu sumber antioksidan alami yang dapat kita peroleh adalah buah. Pepaya adalah jenis tumbuhan tropis yang banyak dijumpai di Indonesia. Pepaya termasuk buah yang berbuah

Corresponding author : Emir Ramadhan
E-mail: emirramadhan@yahoo.co.id

setiap saat (tidak mengenal musim), sehingga pemanenan dapat dilakukan setiap saat. Tumbuhan ini termasuk suku *Caricaceae*.

Pada masyarakat Indonesia, buah pepaya sering diolah dalam dua bentuk penyajian yaitu buah yang sudah tua atau pengolahan buah yang masih muda untuk dikonsumsi dalam bentuk "rujak". Fenomena tersebut, dapat sebagai dasar pemilihan buah pepaya tua dan muda sebagai fokus penelitian ini. Di Indonesia, banyak jenis buah pepaya yang ditanam seperti pepaya Bangkok, pepaya California, dan pepaya jingga. Buah pepaya jingga sering dikenal sebagai buah pepaya lokal oleh masyarakat. Keberadaannya mulai tergeser oleh pepaya impor karena warnanya yang lebih kuning serta ukurannya yang lebih kecil. Maka persepsi ini perlu diubah agar tetap berpihak pada produk dalam negeri. Salah satunya melalui sebuah penelitian ilmiah.

Pepaya jingga berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai salah satu sumber antioksidan. Antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan. Bobot molekul senyawa ini kecil, tetapi mampu dalam penangkalan perkembangan reaksi oksidasi, dengan cara pencegahan terbentuknya radikal. Antioksidan adalah senyawa yang dapat berfungsi pada penghambatan reaksi oksidasi, dan dengan pengikatan radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Akibatnya, kerusakan sel dapat dihambat (Winarsi, 2007). Dari data kandungan kimia, ternyata berbagai macam kandungan kimia, dan yang dapat digunakan sebagai sumber penangkap radikal adalah 4-terpineol, alamin, asam askorbat beta-karoten, arginin, asam sitrat, asam maleat, asam tartrat, asam fumarat, histidin, asam laurat, likopen, mangan, metionin, metil salisilat, merisin, asam meristat, asam meristoleat, asam palmitat, riboflavin, selenium, treonin, triptofan, terpinolen, alfa tokoferol, asam kafeat, kampesterol, kolesterol, skualen, sukrosa ditemukan pada papaya (Anonim, 2010).

Salah satu harapan hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai tambahan informasi tentang tanaman obat yang dapat dimanfaatkan sebagai salah satu sumber antioksidan alami. Salah satu cara pengukuran potensi antioksidan adalah dengan metoda penangkapan radikal. Radikal yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH), karena tingkat sensitifitas yang tinggi. Di samping itu dapat digunakan untuk analisis sejumlah besar sampel dalam waktu yang singkat.

Pengujian dengan DPPH didasarkan pada pengamatan penurunan absorbansi pada daerah sekitar 517 nm yang terjadi karena reduksi radikal oleh antioksidan (AH). DPPH salah satu radikal

nitrogen organik yang stabil dan berwarna ungu. Kestabilan ini disebabkan adanya delokalisasi elektron tunggal dari DPPH yang mengelilingi seluruh molekul. *Operating time* yang digunakan dapat selama 30 menit karena diperkirakan telah bereaksi secara sempurna dan lebih mudah diperbandingkan pada penghitungan kinetika reaksi secara komplet (Molyneux, 2004).

METODOLOGI

Bahan dan alat

Daging buah pepaya tua dan muda diperoleh dari desa Trihanggo, Gamping, Sleman, Yogyakarta yang diambil dengan metode acak, vitamin C sintetik (E.Merck®), DPPH (Aldrich Chemistry®), etanol p.a. (E.Merck®).

Blender (National model MX-T110GN 220 – 240 volts 190 watts 50 – 60 Hz seri no. 890606), *Freeze dryer* (Alpha 1-2 LO), alat-alat gelas, *aluminum foil*, timbangan neraca analitik, pisau. Alat Penguji Kemampuan penangkapan radikal spektrofotometer sinar tampak Genesys 10.

Cara kerja

Pembuatan Ekstrak Buah Pepaya

Daging buah dimasukkan ke dalam *blender*, daging buah dihaluskan selama 20 detik, kemudian ditimbang dan dikeringkan dengan *freeze dryer* selama dua hari pada suhu -47°C. Hasil pengeringan berupa serbuk, kemudian ditimbang dan dihitung perbandingan antara bobot segar dan bobot kering.

Orientasi sampel

Panjang gelombang maksimal larutan DPPH dicari dengan *scanning* pada rentang panjang gelombang 400 nm sampai 700 nm (blanko etanol). Setelah itu dilakukan orientasi jumlah pelarut etanol untuk proses ekstraksi serbuk hasil *freeze-drying* agar dapat dihasilkan kadar ekstrak yang diharapkan (serapan yang dihasilkan dalam rentang 0,2 - 0,8 setelah direaksikan dengan DPPH saat diukur dengan spektrofotometer sinar tampak).

Proses Pengujian Penangkapan Radikal DPPH

Serbuk daging buah sebanyak 0,50 g (hasil orientasi sampel) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Serbuk daging buah tersebut dilarutkan dengan etanol sesuai hasil orientasi (sebanyak 10,0 mL etanol). Sebanyak 100 µL ekstrak hasil pelarutan daging buah dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dengan mikropipet (*yellow tip/ blue tip* telah disonifikasi dengan transonic T570). Sebanyak 1,0 mL DPPH dan etanol ditambahkan sampai volume total 5,0 mL. Larutan tersebut dihomogenisasi selama 20 detik, didiamkan 30

menit (seluruh permukaan labu takar ditutup dengan aluminum foil). Serapan sinar larutan tersebut diukur pada bilangan gelombang maksimal hasil *scanning* (blanko merupakan larutan ekstrak daging buah dalam etanol).

Pembuatan Kurva Baku Penangkapan Radikal DPPH oleh vitamin C

Setelah didapat serapan sinar sampel, dibuat seri kadar vitamin C dan diusahakan tidak terjadi ekstrapolasi terhadap serapan sinar hasil sampel dengan cara yang sama dengan cara proses pengujian kemampuan penangkapan radikal sampel.

Cara analisis

Data Serapan Sinar dari Sampel yang Telah Direaksikan dengan DPPH

Dari percobaan akan didapatkan data penimbangan bobot serbuk buah serta serapan sinar dari sampel yang telah direaksikan dengan DPPH; kemudian dihitung rerata, *standart deviation* (SD), dan *coefisient of variation* (CV) dari kedua jenis data tersebut.

Kurva Baku Vitamin C

Dari percobaan akan didapatkan data serapan sinar dari setiap konsentrasi vitamin C yang telah direaksikan dengan DPPH. Kemudian dihitung rerata, SD, dan CV dari setiap kelompok data tersebut.

Persen Penangkapan radikal DPPH sampel dan Vitamin C

Perhitungan dilakukan untuk setiap data pada masing – masing konsentrasi vitamin C, kemudian dihitung rerata, SD, dan CV dari setiap kelompok data tersebut (Hertiani, 2000).

Persen penangkapan radikal =

$$\frac{\text{Serapan sinar control} - \text{Serapan sinar kontrol}}{\text{Serapan sinar kontrol}} \times 100\%$$

Kurva Baku Persen Penangkapan Radikal DPPH oleh Vitamin C

Dari analisis data sebelumnya akan didapatkan data rerata persen penangkapan radikal DPPH oleh vitamin C. data tersebut dimasukkan ke dalam regresi linier sebagai sumbu Y dan kadar vitamin C sebagai sumbu X, sehingga dihasilkan persamaan :

$$Y = BX + A$$

B = slope atau kemiringan kurva; A = intersep atau titik potong kurva pada sumbu y; X = konsentrasi vitamin C dalam pelarut etanol; Y = persen penangkapan radikal

Pengeplotan Data Sampel ke dalam Kurva Baku Vitamin C

Setiap data persen penangkapan radikal sampel, di *plot* kan ke dalam kurva baku persen penangkapan radikal vitamin C untuk didapat kadar vitamin C yang sebanding dengan potensi penangkapan radikal sampel. Kemudian dihitung rerata, SD, dan CV dari kelompok data tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Buah pepaya muda yang digunakan berwarna kuning kehijauan, rasa sepat, tekstur keras, dan bau khas pepaya pada daging buahnya. Buah pepaya tua yang digunakan berwarna kuning kemerahan (jingga), rasa manis, tekstur lembut, dan bau khas pepaya pada daging buahnya. Setelah dilakukan penghalusan daging buah dan dilanjutkan pengeringan dengan *freeze-dryer*, daging buah pepaya muda terjadi penyusutan bobot sebesar 81,941 %, sedangkan daging pepaya tua terjadi penyusutan bobot sebesar 74,582 %. *Freeze-dryer* digunakan sebagai salah satu cara pengeringan daging buah ke dalam bentuk serbuk. Hal ini bermanfaat untuk penurunan kadar air dalam sampel sehingga aktivitas enzim yang mampu reaksi katabolisme senyawa yang terdapat pada buah pepaya dapat ditekan dan sampel dapat disimpan dalam waktu yang lama.

Pada penelitian ini, hasil *scanning* dengan spektrofotometer bagi larutan DPPH, didapatkan panjang gelombang maksimal sebesar 516 nm. Hasil ini sesuai dengan tinjauan pustaka yaitu pada sekitar daerah 517 nm. Penggunaan DPPH untuk metode penangkapan radikal mempunyai keuntungan yaitu: mudah digunakan, dengan tingkat sensitifitas yang tinggi, dan dapat untuk analisis sejumlah besar sampel dalam waktu yang singkat.

Konsentrasi DPPH yang digunakan pada percobaan ini sebesar 0,4mM; hal ini sesuai dengan hukum *Lambert Beer*, yang diprediksikan konsentrasi larutan yang akan diukur serapan sinarnya relatif encer. Pada konsentrasi yang kental, dikhawatirkan hukum *Lambert Beer* sudah tidak berlaku karena indeks bias larutan ikut berpengaruh dalam penyerapan sinar dan linieritas hasil percobaan menjadi berubah. Pada orientasi serapan sinar dari sampel yang direaksikan dengan DPPH, pada orientasi pertama yaitu 0,503 g serbuk daging buah pepaya tua dalam 5 mL etanol dihasilkan serapan sinar negatif (hal ini karena konsentrasi sari buah pepaya tua yang direaksikan terlalu pekat sehingga hasil reaksi DPPH dengan sari buah yang seharusnya berwarna merah muda, tetapi pada orientasi sampel ini menghasilkan warna kuning

Tabel I. Persen penghambatan radikal oleh pepaya muda dan tua , serapan sinar kontrol = 0,804

Replikasi	Konsentrasi pepaya muda	Serapan sinar	Persen penghambatan	Konsentrasi pepaya tua	Serapan sinar	Persen penghambatan
1	0,504 g/ 10 mL	0,543	32,463	0,504 g/ 10 mL	0,292	63,682
2	0,503 g/ 10 mL	0,551	31,468	0,509 g/ 10 mL	0,301	62,562
3	0,505 g/ 10 mL	0,546	32,089	0,500 g/ 10 mL	0,300	62,687
4	0,504 g/ 10 mL	0,549	31,716	0,502 g/ 10 mL	0,299	62,811
5	0,507 g/ 10 mL	0,543	32,463	0,509 g/ 10 mL	0,295	63,308
6	0,505 g/ 10 mL	0,548	31,841	0,507 g/ 10 mL	0,301	62,562
Rerata	0,506 g/ 10 mL	0,547	32,007	0,505 g/ 10 mL	0,298	62,935
SD	$2,098 \cdot 10^{-3}$	$3,266 \cdot 10^{-3}$	0,406	$3,764 \cdot 10^{-3}$	$3,688 \cdot 10^{-3}$	0,459
CV	0,415 %	0,597 %	1,268 %	0,745 %	1,238 %	0,729 %

Tabel II. Perhitungan kurva baku persen penghambatan radikal oleh vitamin C.

x	y	
1 ppm	21,078	a = -2,520
2 ppm	38,557	b = 21,940
2,4 ppm	50,000	r = 0,995
2,8 ppm	58,482	y = b x + a
3,2 ppm	69,403	y = 21,940 x -2,520
		x = konsentrasi vitamin C dalam pelarut etanol
		y = persen penghambatan radikal

pucat), dan 0,506 g serbuk daging buah pepaya muda dalam 5 mL etanol dihasilkan serapan sinar dalam rentang 0,2 - 0,8 (0,352). Rentang serapan sinar 0,2 - 0,8 dipilih sebagai batas orientasi sampel karena pada rentang tersebut data yang dihasilkan relatif linier. Pada orientasi kedua 0,505 g serbuk daging buah pepaya tua dalam 10 mL etanol dihasilkan serapan sinar dalam rentang 0,2 - 0,8 (0,294), dan 0,506 g serbuk daging buah pepaya muda dalam 10 mL etanol dihasilkan serapan sinar dalam rentang 0,2 - 0,8 (0,545). Jadi kedua jenis sampel yang direaksikan dengan DPPH disari dalam 10 mL etanol. Etanol dipilih sebagai pelarut, karena pelarut universal dan jika menggunakan etanol teknis, terdapat campuran air suling atau bahan lain. Air suling masih terdapat partikel pengganggu yang dikhawatirkan dapat memantulkan sinar dari alat spektrofotometer yang seharusnya diteruskan sehingga pengukuran absorbansi terganggu.

Dapat dilihat pada Tabel I bahwa persen penangkapan radikal buah pepaya tua kurang lebih dua kali dari pepaya muda. Potensi antioksidan pepaya tua lebih baik dari buah pepaya muda. Selanjutnya dilakukan pembuatan kurva baku penangkapan radikal oleh vitamin C. Rentang kadar yang digunakan pada percobaan berdasarkan pada nilai IC₅₀ dari beberapa laporan penelitian yang digunakan sebagai tinjauan pustaka. Nilai IC₅₀ yang didapat dari tinjauan pustaka (Atun dkk, 2008; Cholisoh dkk, 2008)

berkisar 3,10 ppm hingga 3,30 ppm. Percobaan pertama kali digunakan konsentrasi 3,20 ppm sebagai acuan. Namun dari data dihasilkan persen penangkapan radikal dengan konsentrasi tersebut sebesar 69,403 % (lebih besar dari tinjauan pustaka) sehingga rentang kadar yang digunakan untuk pembuatan kurva baku adalah 1 ppm hingga 3,2 ppm.

Kurva baku yang didapat adalah y = 21,940 x -2,520 dan dengan linearitas 0,995. Hal ini baik karena linearitasnya mendekati satu, namun linearitas ini sebenarnya berada pada batas linearitas yang diharapkan SNI (SNI mengharapakan nilai linearitas lebih besar dari 0,995).

Hasil pengeplotan didapatkan kemampuan penangkapan radikal buah pepaya muda yang direaksikan setara dengan vitamin C 1,573 ppm dan bagi buah pepaya tua adalah 2,983 ppm vitamin C. Berdasarkan hasil tersebut kemudian dicari konsentrasi sampel serbuk kering daging buah pepaya muda dan tua. Konsentrasi sampel pepaya muda sebesar 0,101 g/100 mL dan sampel pepaya tua sebesar 0,101 g/100 mL Kedua konsentrasi tersebut diubah dalam bentuk bobot serbuk kering dan didapatkan hasil bobot serbuk kering yang direaksikan bagi pepaya muda sebesar 5,060. 10⁻³ g dan pepaya tua sebesar 5,050. 10⁻³ g. Kedua hasil bobot serbuk kering dikonversikan untuk didapat bobot buah segar.

Tabel III. Pengeplotan data sampel ke dalam kurva baku vitamin C

Pepaya muda

Replikasi	Konsentrasi	Serapan sinar	Persen penghambatan	Hasil pengeplotan
1	0,504 g/ 10 mL	0,543	32,463	1,594 ppm
2	0,503 g/ 10 mL	0,551	31,468	1,549 ppm
3	0,505 g/ 10 mL	0,546	32,089	1,577 ppm
4	0,504 g/ 10 mL	0,549	31,716	1,560 ppm
5	0,507 g/ 10 mL	0,543	32,463	1,594 ppm
6	0,505 g/ 10 mL	0,548	31,841	1,566 ppm
Rerata	0,506 g/ 10 mL	0,547	32,007	1,573 ppm
SD	$2,098.10^{-3}$	$3,266.10^{-3}$	0,406	0,018
CV	0,415 %	0,597 %	1,268 %	1,144 %

Pepaya tua

Replikasi	Konsentrasi	serapan sinar	Persen penghambatan	Hasil pengeplotan
1	0,504 g/ 10 mL	0,292	63,682	3,017 ppm
2	0,509 g/ 10 mL	0,301	62,562	2,966 ppm
3	0,500 g/ 10 mL	0,300	62,687	2,972 ppm
4	0,502 g/ 10 mL	0,299	62,811	2,978 ppm
5	0,509 g/ 10 mL	0,295	63,308	3,000 ppm
6	0,507 g/ 10 mL	0,301	62,562	2,966 ppm
Rerata	0,505 g/ 10 mL	0,298	62,935	2,983 ppm
SD	$3,764.10^{-3}$	$3,688.10^{-3}$	0,459	0,021
CV	0,745 %	1,238 %	0,729 %	0,704 %

Bobot segar buah pepaya muda sebesar 0,028g dan pepaya tua sebesar 0,020 g. Hal yang sama juga dilakukan pada konsentrasi vitamin C hasil pengeplotan agar didapatkan bobot serbuk vitamin C.

Perbandingan bobot buah segar pepaya tua dan muda dengan bobot vitamin C didapatkan hasil kemampuan penangkapan radikal paling tinggi dimiliki oleh buah pepaya tua dengan perbandingan dengan vitamin C sebesar 1.340,931 mg pepaya tua segar sebanding dengan 1 mg vitamin C dan kemampuan penangkapan radikal pepaya muda adalah 3.557,814 mg pepaya muda segar sebanding dengan 1 mg vitamin C. Hal ini sebagai bukti bahwa kemampuan penangkapan radikal pepaya tua lebih baik dari pepaya muda dengan rasio sekitar dua kali lipat.

KESIMPULAN

Sari pepaya muda dengan konsentrasi 0,101 g/100 mL berkemampuan persen penghambatan radikal sebesar 32,07%. Sari pepaya tua dengan konsentrasi 0,101 g/100 mL memiliki kemampuan persen penghambatan radikal sebesar 62,93%. Penangkapan radikal buah pepaya tua lebih tinggi dari pada pepaya

muda dengan perbandingan vitamin C sebesar 1.340,931 mg pepaya tua segar sebanding dengan 1 mg vitamin C. Kemampuan menangkap radikal 3.557,814 mg pepaya muda segar sebanding dengan 1 mg vitamin C.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2010, Pepaya, [http:// www.arsgrin.gov:8080/ npgspub/ xsql/ duke/ plantdisp. xsql/ taxon=209](http://www.arsgrin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/plantdisp.xsql/taxon=209), September 2010
- Atun, S., Arianingrum, R., & Aznam, N., 2008, Uji Aktivitas Beberapa Senyawa Oligoresveratrol Hasil Isolasi Dari Kulit Batang Tumbuhan *Hopea Odorata* Sebagai Pencegah Degradasi 2-Deoksiribosa, *Laporan Penelitian*, FMIPA UNY, Yogyakarta.
- Cholisoh, Z., & Utami, W., 2008, Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Etanol 70% Biji Jengkol, *Laporan Penelitian*, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Hertiani, 2000, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Antioksidan dari Daun Plantago major L., *Tesis*, Program pasca sarjana UGM

- Langseth, L., 1995, *Oxydant, Antioxydant and disease Prevention*, International Life Science, Institute Press Belgium
- Molyneux, P., 2004, The Use of The Stable Free Radikal Diphenyl picrilhidrazyl (DPPH) for Estimating Antioksidant Acti vity, *Laporan Penelitian*, Songklanakarin J. Sci. Technol.
- Pokorni, J., Yanishlieva, N., and Gor don, M., 2001, *Antioxidant in Food; Practical Application*, CRC Press, New York.
- Winarsi, Heri, 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*, Cetakan I, Kanisius, Yogyakarta.