

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK GAMBIR YANG DIPURIFIKASI MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM SEPHADEX LH-20

Antioxidant Activity of Purified Gambir Extract Using Sephadex LH-20 Column Chromatography

Rusdin Rauf¹, Umar Santoso², Suparmo²

¹Program Studi Gizi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jl. A. Yani, Tromol Pos 1 Pabelan, Kartasura, Surakarta 57162

²Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

ABSTRAK

Telah dilakukan ekstraksi terhadap gambir menggunakan tiga jenis pelarut [aquades:etanol (1:1), etanol:etil asetat (1:1), dan etil asetat], dilanjutkan dengan purifikasi menggunakan kromatografi kolom Sephadex LH-20. Kemudian diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH dan Ferritiosianat dalam sistem linoleat, yang dibandingkan dengan rutin dan BHT. Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak gambir terpurifikasi (EGP) memberikan aktivitas penangkapan radikal DPPH dan penghambatan peroksida yang lebih tinggi dibanding rutin dan BHT. Aktivitas penangkapan radikal DPPH tertinggi dari EGP yang diinkubasi pada menit ke-25, pada konsentrasi 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm, berturut turut yaitu fraksi etil asetat (27,58 % ± 1,87), fraksi etil asetat (tidak berbeda nyata dengan fraksi etanol:etil asetat) (34,05 % ± 0,96), dan fraksi etanol:etil asetat (42,54 % ± 0,73). Fraksi etanol:etil asetat menunjukkan penghambatan peroksida tertinggi (45,11 % ± 2,17 %), yang diinkubasi selama 10 hari.

Kata kunci: Gambir, antioksidan, purifikasi, DPPH, peroksida

ABSTRACT

Gambir was extracted with three types of solvents [aquadest:ethanol (1:1), ethanol:ethyl acetate (1:1), and ethyl acetate], followed by purification using Sephadex LH-20 column chromatography. They were tested for antioxidant activity using DPPH and Ferrythiocyanate in linoleic system, compared with rutin and BHT. The results indicated that the purified gambir extracts (PGE) gave the higher DPPH radical scavenging activity and inhibition of peroxide than rutin and BHT. The highest DPPH radical scavenging activity of PGE incubated for 25 minutes, at a concentration of 60 ppm, 80 ppm, and 100 ppm, were ethyl acetate fraction (27,58 % ± 1,87), ethyl acetate fraction (34,05 % ± 0,96), and ethanol:ethyl acetate fraction (42,54 % ± 0,73), respectively. The fraction of ethanol:ethyl acetate displayed the highest inhibition of peroxide (45.11 % ± 2.17), incubated for 10 days.

Keywords: Gambir, antioxidant, purification, DPPH, peroxide

PENDAHULUAN

Gambir merupakan produk dari daun tanaman gambir (*Uncaria gambir* Roxb) yang mengandung senyawa polifenol. Senyawa polifenol yang terkandung dalam produk gambir adalah katekin (Rauf dkk., 2010). Dalam pembuatan produk gambir, daun tanaman gambir diekstrak menggunakan air, melalui berbagai tahapan yaitu perebusan, pengepresan,

dan pengeringan hingga diperoleh produk gambir berbentuk padatan kering.

Penelitian tentang gambir telah banyak dilakukan, mulai dari proses ekstraksi komponen fenolik gambir, kemampuan antioksidannya, hingga pada kemampuannya sebagai antibakteri. Rauf dkk. (2010) telah mengekstrak produk gambir menggunakan berbagai macam pelarut tunggal maupun campuran, antara lain aquades, etanol, etil asetat,

campuran aquades:etanol (1:1), dan campuran etanol:etil asetat (1:1). Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat, campuran aquades:etanol (1:1) dan campuran etanol:etil asetat (1:1) memiliki aktivitas penangkapan radikal DPPH yang tidak berbeda nyata. Aktivitas penangkapan radikal DPPH ketiga ekstrak tersebut lebih tinggi dibanding ekstrak aquades dan etanol.

Banyak metode yang dikembangkan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan komponen bahan pangan secara *in vitro*. Namun seringkali metode tersebut tidak berkorelasi dengan kemampuan komponen tersebut dalam menghambat reaksi oksidasi. Hal ini disebabkan oleh jenis reaksi komponen antioksidan tersebut, bersifat sebagai antioksidan primer atau sekunder. Disamping itu adanya interaksi dengan komponen lain serta kesesuaian antara polaritas dari komponen antioksidan dengan sistem pelarut yang digunakan dalam pengujian akan mempengaruhi aktivitas antioksidannya. Untuk mengantisipasi kondisi tersebut perlu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan berbagai metode.

Meskipun secara ekstensif produk gambir telah banyak dipelajari, namun belum dilakukan proses purifikasi serta mempelajari efek dari ekstrak gambir terpurifikasi terhadap aktivitas antioksidan.

METODE PENELITIAN

Gambir komersial diperoleh dari pasar Brinjarharjo Yogyakarta. DPPH (*1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl*) dan reagen Folin (Sigma Chem. Co.), adsorben Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), asam linoleat, ammonium tiosianat, ferro klorida, katekin standar, BHT, rutin, pelarut kualitas PA (metanol dan etanol), pelarut aquades, etanol dan etil asetat.

Peralatan yang digunakan antara lain: kromatografi kolom (1,4 x 33 cm), *Fraction Collector* (BIORAD Model 210), *rotary vacuum evaporator* (Vacuum-Controller VC 2), *shaker water bath*, peralatan gelas, dan kertas Whatman No. 42. Untuk analisis digunakan spektrofotometer UV Vis (Shimadzu, UV-1650 PC).

Ekstraksi dan Purifikasi Gambir

Gambir diekstrak sesuai yang dilakukan oleh Rauf dkk. (2010), yaitu 100 g bubuk gambir diaduk dalam 100 ml pelarut [aquades:etanol (1:1), etanol:etil asetat (1:1), dan etil asetat] menggunakan *shaker water bath* selama 60 menit pada suhu 30 °C. Setelah disaring dengan kertas Whatman No. 42, residu diekstrak lagi sebanyak 2 kali. Ekstrak cair kemudian dikeringkan dengan *rotary vacuum evaporator*.

Ekstrak kering 0,1 g dilarutkan dalam 1 ml metanol, kemudian dipurifikasi menggunakan kromatografi kolom

(1,4 x 33 cm) dengan adsorben Sephadex LH-20, dan dielusi menggunakan metanol, dengan kecepatan aliran ± 0,28 ml/menit. Eluen ditampung dalam 20 tabung kolektor menggunakan *Fraction Collector*. Dalam setiap tabung ditampung ± 3,6 ml eluen. Kemudian eluen dari setiap tabung kolektor di-scan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 200-300 nm untuk mengidentifikasi komponen katekin. Tabung yang teridentifikasi mengandung senyawa katekin, dikeringkan menggunakan gas nitrogen hingga diperoleh EGP.

Pengujian Fenolik Total

Fenolik total dari EGP diuji menggunakan prosedur Folin-Ciocalteu, sebagaimana didiskripsikan oleh Singleton dan Rossi (1965). Sebanyak 0,5 mL sampel dari ekstrak cair atau satu seri standar asam gallat (0, 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm) dicampur dengan 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu 50 % (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., U.S.A) dan 7,5 mL deionised water. Campuran dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian ditambahkan 1,5 mL sodium karbonat 2 % (w/v). Campuran selanjutnya dipanaskan pada suhu 40 °C dalam *water bath* selama 20 menit, dan secepatnya didinginkan. Kemudian diukur absorbansinya pada 755 nm. Hasilnya diekspresikan sebagai % fenol per berat sampel.

Pengujian Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH

DPPH dilarutkan dalam metanol. Sebanyak 0,1 mL larutan ekstrak EGP (100, 80, dan 60 ppm) ditambahkan kedalam 2,9 mL larutan DPPH. Campuran diinkubasi pada suhu kamar dan kondisi gelap selama 30 menit. Setiap 5 menit absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada λ 517 nm. Larutan kontrol dibuat dari 0,1 mL methanol dan 2,9 mL larutan DPPH (Brand –Williams dkk., 1995). Rutin dan BHT digunakan sebagai pembanding. Persentase penangkapan radikal DPPH selama inkubasi dihitung menggunakan persamaan:

$$\% \text{ Penangkapan radikal DPPH} = \frac{(Abs_{10} - Abs_{in}) / Abs_{10}}{100} \times 100 \%$$

Pengujian Aktivitas Antioksidan dalam Sistem Linoleat

Pengujian aktivitas antioksidan dalam sistem linoleat dilakukan menurut metode Kikuzaki dan Nakatani (1993), dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 4 mL larutan sampel dalam etanol (60 ppm), 4,1 mL larutan asam linoleat 2,51 % dalam etanol, 8 mL 0,05 M buffer fosfat pH 7 dicampur merata, ditempatkan dalam wadah tertutup kemudian diinkubasi pada suhu 60 °C kondisi gelap. Kontrol diperlakukan dengan asam linoleat tanpa penambahan antioksidan. Angka peroksida ditentukan tiap 5 hari, selama 15 hari waktu inkubasi. Sebanyak 0,1 mL campuran yang telah diinkubasi tersebut

ditambahkan 9,7 mL etanol 75 % dan 0,1 mL ammonium thiocyanate 30 %. Kemudian ditambahkan 0,1 mL larutan 0,02 M ferro klorida dalam HCL. Setelah 3 menit tepat, ditera absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Rutin dan BHT digunakan sebagai pembanding.

Aktivitas antioksidan diekspresikan sebagai persentase penghambatan peroksida pada akhir inkubasi, yang dihitung dengan persamaan:

$$\% \text{ penghambatan peroksida} = [1 - (\text{Abs sampel}) / (\text{Abs kontrol})] \times 100 \%$$

Analisis Statistik

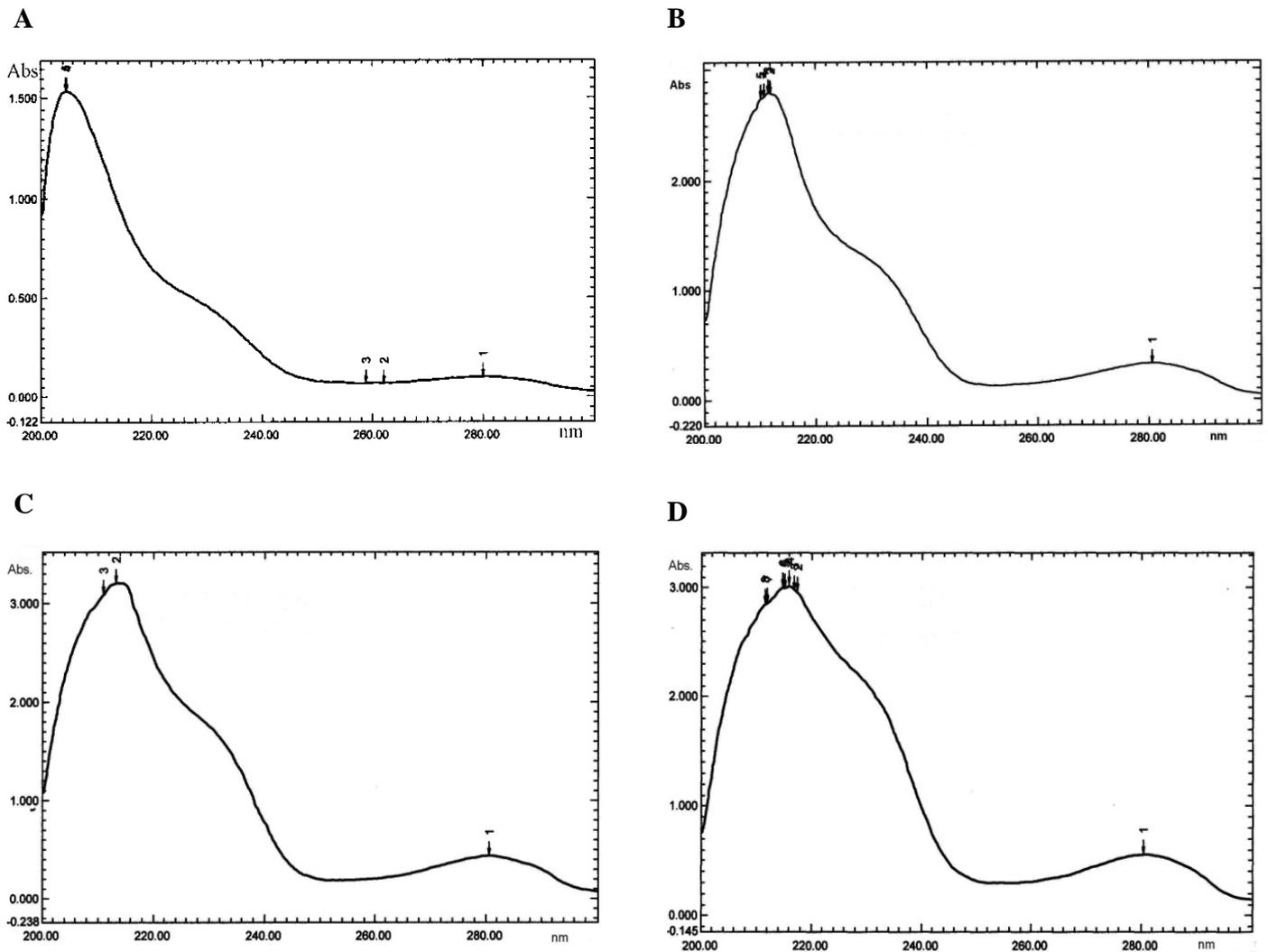
Rancangan percobaan menggunakan rancangan acak lengkap. Data dianalisis menggunakan analisis variansi

(ANOVA), perbedaan hasil diuji menggunakan Duncan pada taraf 5 %.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Fraksi Katekin Gambir Terpurifikasi

Ekstrak gambir yang dipurifikasi menggunakan kromatografi kolom Sephadex LH-20, ditampung dalam 20 tabung kolektor. Setiap tabung kolektor di-scan menggunakan spektrofotometer untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa katekin melalui spektra yang terbentuk pada panjang gelombang 200 – 300 nm, dan dibandingkan dengan standar katekin.



Gambar 1. Spektra ekstrak gambir terpurifikasi A (katekin standar), B (fraksi aquades:etanol), C (fraksi etanol:etil asetat), dan D (fraksi etil asetat)

Ekstrak gambir yang dipurifikasi menggunakan kromatografi kolom Sephadex LH-20, setelah di-scan menunjukkan bahwa akumulasi senyawa katekin terdapat pada tabung kolektor nomor 11, 12, dan 13. Spektra ekstrak gambir terpurifikasi yang disajikan pada Gambar 1, dapat dijelaskan bahwa spektra standar (+)-katekin yang di scan pada panjang gelombang 200 – 300 nm menunjukkan adanya puncak pada kisaran panjang gelombang 204 – 220 nm. Demikian pula spektra fraksi aquades:etanol, fraksi etanol:etil asetat, dan fraksi etil asetat menunjukkan puncak yang sama dengan standar katekin pada ke 3 tabung kolektor masing-masing fraksi. Hal ini menunjukkan bahwa ke tiga tabung kolektor dari semua fraksi terdeteksi adanya senyawa katekin.

Rendemen

Tabung kolektor yang teridentifikasi mengandung senyawa katekin, setelah dikeringkan menggunakan hembusan gas nitrogen, diketahui memiliki rendemen yang berbeda dari tiap fraksi. Rendemen ekstrak gambir terpurifikasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen ekstrak gambir terpurifikasi

Sampel	Rendemen (% b/b ekstrak gambir)	Rendemen (% b/b gambir)
Fr. Aquadest:Ethanol (1:1)	68,90 ± 4,95	60,05 ± 4,31
Fr. Ethanol:Ethyl asetat (1:1)	81,70 ± 0,14	62,58 ± 0,10
Fr. Ethyl asetat	90,80 ± 2,26	65,06 ± 1,63

Hasil purifikasi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memberikan rendemen tertinggi jika didasarkan pada berat ekstrak gambir, sedangkan ekstrak aquades:etanol (1:1) memberikan rendemen yang paling rendah. Perbedaan rendemen ini disebabkan oleh perbedaan sifat dan struktur dari senyawa katekin dalam tiap ekstrak dan kesesuaiannya dengan karakteristik adsorben Sephadex LH-20 yang menggunakan pelarut metanol. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa katekin dari ekstrak etil asetat mudah larut dalam metanol dan sesuai dengan sifat dan tingkat pengembangan adsorben Sephadex LH-20.

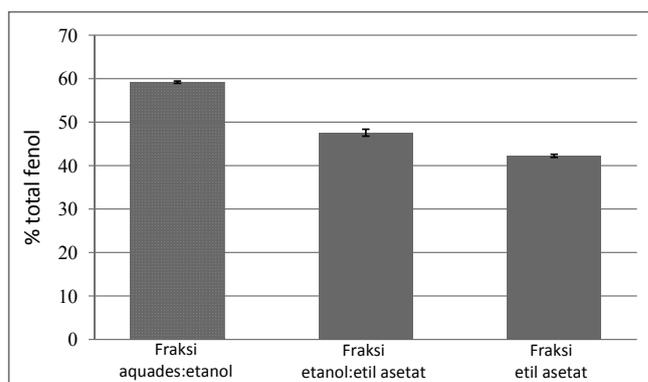
Katekin gambir ditemukan dalam berbagai bentuk, antara lain berbentuk monomer, dimer, oligomer, maupun polimer, dan untuk mengekstrak setiap komponen tersebut tergantung pada penggunaan pelarut dalam ekstraksi (Taniguchi dkk., 2007). Ukuran partikel basah dari Sephadex LH-20 bervariasi, tergantung pada pelarut yang digunakan dalam pengembangannya. Semakin polar pelarut yang digunakan, semakin besar tingkat pengembangan partikelnya (Anonim, 2002). Besarnya rendemen dari proses purifikasi

menggunakan Sephadex LH-20 tergantung pada jenis pelarut yang dihubungkan dengan sifat polaritas komponen terekstrak, serta kesesuaian dari tingkat pengembangan partikel Sephadex LH-20 dengan struktur kimia komponen terpurifikasi. Senyawa katekin yang terkandung dalam ekstrak etil asetat memiliki tingkat keragaman sifat yang lebih tinggi dibanding ekstrak lainnya untuk melewati adsorben Sephadex LH-20, sehingga akumulasi senyawa terpurifikasi pada fraksi etil asetat lebih banyak.

Rendemen ekstrak gambir terpurifikasi jika didasarkan pada berat gambir, maka setiap fraksi memiliki rendemen yang tidak berbeda nyata. Sejak gambir diekstrak dengan menggunakan pelarut Aquades:etanol (1:1), etanol:etil asetat (1:1), dan etil asetat, kemudian dilanjutkan dengan purifikasi, ketiga perlakuan tersebut menghasilkan rendemen terpurifikasi yang tidak berbeda nyata.

Fenolik Total

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan dari setiap fraksi gambir terpurifikasi, yang ditunjukkan oleh nilai signifikansi $p = 0,014$ ($p < 0,05$). Kadar fenolik total dari ekstrak gambir terpurifikasi (Gambar 2) menunjukkan bahwa fraksi aquades:etanol memiliki kadar fenolik total ($59,19 \% \pm 0,27$) yang lebih tinggi dibanding fraksi etanol:etil asetat ($47,57 \% \pm 0,80$) dan fraksi etil asetat ($42,25 \% \pm 0,35$).



Gambar 2. Fenolik total ekstrak gambir terpurifikasi dari beberapa fraksi

Ekstrak gambir hanya tersusun atas senyawa katekin (Rauf dkk., 2010), sehingga perbedaan kadar fenolik total dari tiap fraksi hanya disebabkan oleh perbedaan struktur katekin dari setiap ekstrak gambir. Ekstrak gambir terpurifikasi tersusun atas senyawa katekin spesifik (struktur) yang merupakan komponen mayor dari setiap ekstrak gambir.

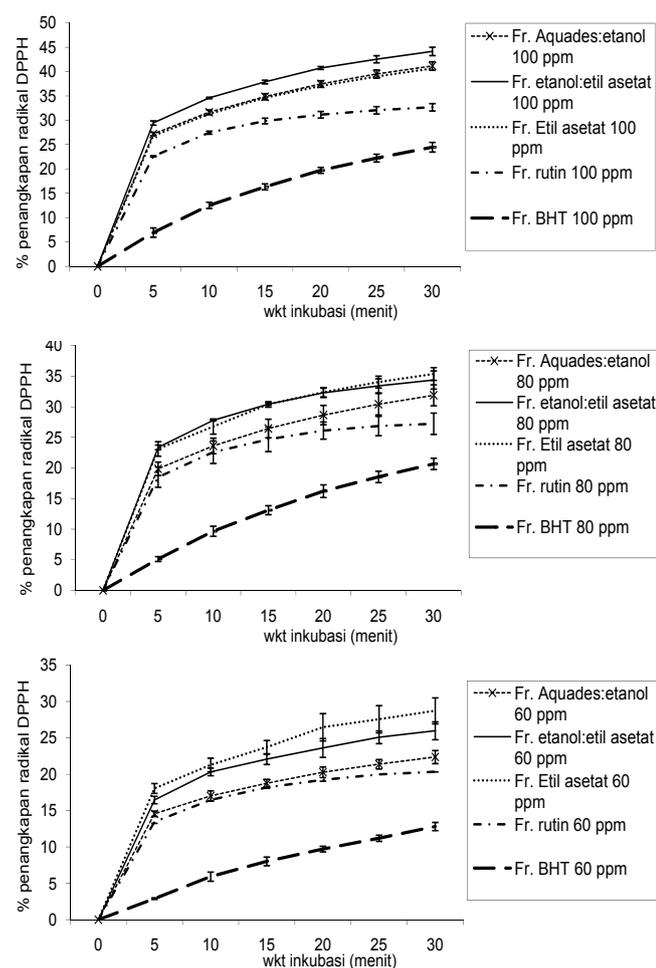
Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH

Pengukuran aktivitas penangkapan radikal DPPH dari ekstrak gambir terpurifikasi yang diinkubasi selama 30 menit

dan dimonitor setiap 5 menit, menunjukkan bahwa ekstrak gambir terpurifikasi memiliki kemampuan penangkapan radikal DPPH yang lebih tinggi dibanding rutin dan BHT untuk setiap waktu inkubasi (Gambar 3).

Semua ekstrak gambir terpurifikasi menunjukkan persentase penangkapan radikal DPPH yang cukup tinggi pada inkubasi menit ke-5. Kemudian pada menit ke-10 sampai menit ke-30 menunjukkan kecenderungan yang melambat. Aktivitas penangkapan radikal DPPH optimum terjadi pada inkubasi menit ke-25. Inkubasi menit ke-30 secara umum tidak berbeda nyata dengan menit ke-25, sehingga pembahasan selanjutnya didasarkan pada hasil inkubasi menit ke-25.

Hasil uji statistik dari aktivitas penangkapan DPPH menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan dari setiap fraksi EGP, rutin dan BHT, yang ditunjukkan oleh nilai signifikansi dari setiap konsentrasi pengujian (60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm) yaitu masing-masing sebesar $p = 0,000$ ($p < 0,05$).



Gambar 3. Aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak gambir terpurifikasi yang diuji pada konsentrasi 100 ppm, 80 ppm, dan 60 ppm

Pengujian EGP pada konsentrasi 100 ppm, fraksi etanol:etil asetat menunjukkan aktivitas penangkapan radikal tertinggi ($42,54 \% \pm 0,73$), sedangkan fraksi aquades:etanol dan fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas penangkapan radikal yang tidak berbeda nyata (masing-masing $39,50 \% \pm 0,82$ dan $39,01 \% \pm 0,31$). Pada konsentrasi 80 ppm, fraksi etanol:etil asetat menunjukkan aktivitas yang tidak berbeda nyata dengan fraksi etil asetat (masing-masing $33,42 \% \pm 1,16$ dan $34,05 \% \pm 0,96$), keduanya menunjukkan aktivitas penangkapan DPPH yang lebih tinggi dibanding ekstrak aquades:etanol. Pada konsentrasi 60 ppm, fraksi etanol:etil asetat menunjukkan aktivitas penangkapan radikal DPPH tertinggi ($27,58 \% \pm 1,87$). Sedangkan fraksi aquades:etanol memberikan aktivitas penangkapan radikal DPPH terendah ($21,39 \% \pm 0,65$). Fraksi aquades:etanol dan fraksi etanol:etil asetat menunjukkan kecenderungan yang sama dalam peningkatan aktivitas penangkapan radikal DPPH saat konsentrasi masing-masing ekstrak ditingkatkan dalam pengujian. Sedangkan fraksi etil asetat meskipun menunjukkan peningkatan aktivitas penangkapan radikal DPPH dengan meningkatnya konsentrasi dari 80 ppm ke 100 ppm, namun kecenderungan peningkatannya lebih rendah dari fraksi lainnya.

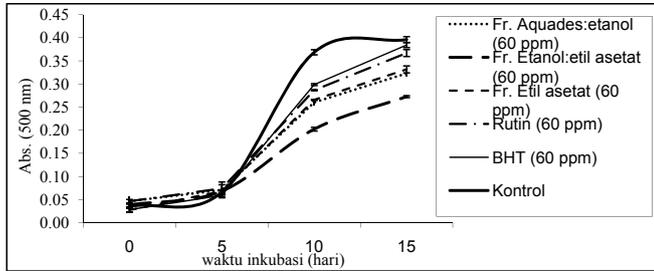
Perbedaan aktivitas penangkapan radikal DPPH dari ketiga fraksi tersebut yang diuji pada berbagai konsentrasi, menunjukkan adanya perbedaan struktur katekin dari tiap fraksi. Fraksi aquades:etanol meskipun memiliki kadar fenolik tertinggi, namun menunjukkan aktivitas penangkapan radikal DPPH yang lebih rendah dibanding dua fraksi lainnya, yang memperkuat dugaan adanya perbedaan struktur katekin dari setiap fraksi EGP. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lotito dan Fraga (2000) yang membuktikan adanya hubungan antara struktur kimia dari katekin dengan aktivitas antioksidannya dalam menghambat oksidasi lipid.

Aktivitas Antioksidan Metode Ferritiosianat dalam Sistem Linoleat

Pengujian aktivitas antioksidan metode Ferritiosianat dalam sistem linoleat mengilustrasikan kemampuan komponen antioksidan dalam menghambat oksidasi asam linoleat, yang dimonitor pada $\lambda 500 \text{ nm}$ yang secara spesifik mengukur absorbansi peroksida. Peroksida merupakan senyawa yang terbentuk selama proses oksidasi asam lemak tak jenuh, sehingga dapat dijadikan sebagai indikator dari tingkat oksidasi asam lemak.

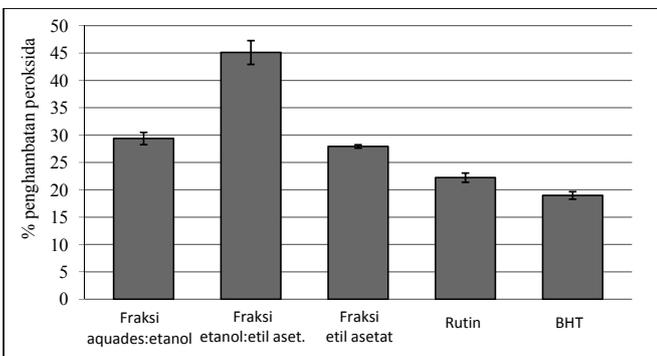
Pengujian terhadap ekstrak gambir terpurifikasi dalam menghambat oksidasi linoleat menunjukkan bahwa secara umum pada inkubasi hari ke-5 belum terbentuk peroksida, baik pada ekstrak gambir terpurifikasi, maupun pada kontrol (Gambar 4). Pada inkubasi hari ke-10 terbentuk peroksida

yang cukup tinggi yang ditunjukkan oleh nilai absorbansinya. Penginkubasian pada hari ke-15 menunjukkan produksi peroksida yang melambat dibanding inkubasi pada hari ke-10. Kecenderungan yang terjadi pada inkubasi hari ke-15 disebabkan telah berkurangnya asam linoleat dalam sistem pengujian untuk dioksidasi menjadi peroksida.



Gambar 4. Absorbansi peroksida dalam sistem linoleat yang diuji dengan penambahan ekstrak gambir terpurifikasi pada konsentrasi 60 ppm

Aktivitas penghambatan produksi peroksida oleh EGP diilustrasikan pada inkubasi hari ke-10, karena produksi peroksida optimum pada “kontrol” tercapai pada titik tersebut. Hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa ada perbedaan penghambatan peroksida yang signifikan dari setiap fraksi EGP, rutin, dan BHT, yang ditunjukkan oleh nilai signifikansi yaitu $p = 0,000$ ($p < 0,05$).



Gambar 5. Aktivitas penghambatan peroksida oleh ekstrak gambir terpurifikasi (60 ppm) yang diuji pada inkubasi 10 hari

Secara umum ekstrak gambir terpurifikasi menunjukkan kemampuan penghambatan peroksida yang lebih tinggi dibanding rutin dan BHT ($22,23\% \pm 0,84$ dan $18,98\% \pm 0,70$) (Gambar 5). Fraksi etanol:etil asetat menunjukkan aktivitas penghambatan peroksida tertinggi, yaitu sebesar $45,11\% \pm 2,17$. Sedangkan fraksi aquades:etanol dan fraksi etil asetat menunjukkan kemampuan penghambatan peroksida yang tidak berbeda nyata, yaitu masing-masing sebesar 29,39

$\% \pm 1,12$ dan $27,94\% \pm 0,32$. Perbedaan kemampuan penghambatan peroksida dari setiap fraksi disebabkan oleh perbedaan bentuk monomer, dimer, dan oligomer katekin dari setiap fraksi (Rauf dkk., 2010).

KESIMPULAN

Ekstrak gambir terpurifikasi memiliki aktivitas penangkapan radikal DPPH dan penghambatan peroksida yang lebih tinggi dibanding rutin dan BHT. Fraksi etil asetat menunjukkan penangkapan radikal DPPH tertinggi jika diuji pada konsentrasi rendah (60 ppm). Sedangkan fraksi etanol:etil asetat memberikan penangkapan radikal DPPH tertinggi pada pengujian konsentrasi tinggi (100 ppm). Fraksi etanol:etil asetat memiliki daya hambat peroksida yang paling tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. (2002). *Gel Filtration: Principles and Methods*. Amersham Biosciences.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. dan Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **29**: 25–30.
- Kikuzaki, H dan Nakatani, N. (1993). Antioxidant effect of some ginger constituents. *Journal of Food Science* **58**: 1407-1410.
- Lotito, S.B. dan Fraga, C.G. (2000). Catechins delay lipid oxidation and α -tocopherol and β -carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **225**: 32–38.
- Rauf, R., Santoso, U. dan Suparmo (2010). Aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak gambir (*Uncaria gambir* Roxb.). *Agritech* **30**: 1-5.
- Singleton, V.L. dan Rossi, J. A. (1965). Colorimeter of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144–158.
- Taniguchi, S., Kuroda, K., Doi, K., Tanabe, M., Shibata, T., Yoshida, T. dan Hatano, T. (2007). Revised structures of gambirin A1, A2, B1, and B2, chalcone-flavan dimers from gambir (*Uncaria gambir* extract). *Chemistry and Pharmaceutical Bulletin* **55** (2): 268–272.