

Sintesis Tetrapeptida (Phe-Asn(Trt)-Ala-Pro) Sebagai Kandidat Antioksidan dengan Metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS)

Rizky Saputra & Nety Kurniaty & Diar Herawati & Rani Maharani

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Bandung, Indonesia

email: rzkysaputra11@gmail.com, netykurniaty@yahoo.com, diarmunawar@gmail.com, r.maharani@unpad.ac.id

ABSTRACT: Antioxidant peptides are a group of peptides that have antioxidant activity that plays a role in counteracting free radicals by complementing the deficiency of free radicals thereby inhibiting chain reactions. One of the natural antioxidant peptides that researchers found was tetrapeptide (Phe-Leu-Ala-Pro) which was isolated from the sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) located in the china and was found to have antioxidants activity. The search on the analogues of the antioxidant tetrapeptide was continued. From this study, a tetrapeptide analogue FNAP (Phe-Asn(Trt)-Ala-Pro) has been successfully synthesised by solid phase peptide synthesis (SPPS) method with Fmoc-amino acid strategy using 2-chlorotriethyl chloride resin as a buffer and coupled with a coupling reagent, HOBt and DIPEA. The sample weight resulted was 173,4 mg which was then characterized using a mass spectrophotometer and it was obtained the peak of the fragment at m/z 448,2193. RP HPLC was used to obtain the purity of the tetrapeptide mixture which resulted peak retention time at 5,738 and 5,725 minutes. On the antioxidant assay using DPPH method, the results obtained from the tetrapeptide compound showed an IC50 value of 2.819 ppm which indicated the antioxidant activity of the tetrapeptide compound was weak, which indicates that FNAP exhibits lower antioxidant activity than FLAP in previous studies

Keywords : Solid phase peptide synthesis (SPPS), tetrapeptide, antioxidant

ABSTRAK: Peptida antioksidan merupakan kelompok peptida yang memiliki aktivitas antioksidan yang berperan untuk menangkal radikal bebas dengan cara melengkapi kekurangan elektron dari radikal bebas sehingga menghambat terjadinya reaksi berantai. Salah satu peptida antioksidan alami yang telah ditemukan pada peneliti sebelumnya adalah tetrapeptida (Phe-Leu-Ala-Pro) yang diisolasi dari teripang (*Acaudina molpadioides*) yang berada di cina dan telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan. Pencarian analog tetrapeptida antioksidan yang lebih baik hingga saat ini masih terus dilakukan. Pada penelitian ini telah berhasil disintesis analog tetrapeptida lainnya FNAP (Phe-Asn(Trt)-Ala-Pro) dan telah berhasil disintesis dengan menggunakan metode sintesis peptida fase padat (SPPS) menggunakan strategi Fmoc-asam amino, penyangga yaitu resin 2- klorotrietil klorida dan dikopling dengan reagen pengkopling diantaranya HBTU, HOBt dan DIPEA. Hasilnya didapat bobot sampel sebesar 173,4 mg yang kemudian dilakukan proses karakterisasi dengan menggunakan spektrofotometer massa didapat puncak fragmennya pada m/z 448,2193 dan untuk memastikan kemurnian dari senyawa tetrapeptida tersebut dilakukan proses RP-HPLC yaitu hasil yang didapat pada menit ke 5,738 dan 5,725 menunjukkan puncak waktu retensinya. Pada pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH, nilai IC50 yang di dapat sebesar 2.819 ppm yang menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari senyawa tetrapeptida tersebut lemah, yang mengindikasikan bahwa FNAP menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih rendah daripada FLAP pada peneliti sebelumnya.

Kata kunci : Sintesis peptida fase padat, tetrapeptida, antioksidan

1 PENDAHULUAN

Radikal bebas dapat menyebabkan berbagai penyakit di dalam tubuh. Radikal bebas merupakan atom atau gugus yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas juga dijumpai pada lingkungan, beberapa logam (besi dan tembaga), obat, asap rokok, bahan aditif, makanan dalam kemasan, dan lain-lain (Droge, 2002). Dalam melindungi tubuh dari serangan 2 | Rizky Saputra, et al. radikal bebas, substansi antioksidan berfungsi untuk menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron dari radikal bebas sehingga menghambat terjadinya reaksi berantai (Windono

et al., 2001). Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat digunakan untuk menstabilkan radikal bebas sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Senyawa ini memiliki suatu molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas sehingga dapat berikatan dengan molekul antioksidan dan juga dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas (Murray, 2009).

Menurut Windono et al. (2001), antioksidan adalah senyawa yang bisa digunakan untuk melindungi bahan pangan melalui perlambatan kerusakan, ketengikan atau perubahan warna yang disebabkan oleh oksidasi. Selain itu antioksidan mampu bertindak sebagai penyumbang radikal

hidrogen atau dapat bertindak sebagai akseptor radikal bebas sehingga dapat menunda tahap inisiasi pembentukan radikal bebas. Adanya antioksidan alami salah satunya dapat di isolasi dari senyawa fenolik maupun sintesis dapat menghambat oksidasi lipid, mencegah kerusakan, perubahan komponen organik dalam bahan makanan sehingga dapat memperpanjang umur simpan (Rohdiana, 2001).

Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Jin et al., (2019) yaitu isolasi dari teripang *Acaudina molpadioides* yang menghasilkan senyawa tetrapeptida Phe-Leu-Ala-Pro. Pada penelitian ini dilakukan modifikasi tetrapeptida yang baru dilakukan pada susunan asam amino kedua dari FLAP yaitu leusin (L) menjadi asparagin (N) menghasilkan analog FNAP (Phe-Asn(Trt)-ala-Pro) yang bertujuan untuk menguji turunannya apakah mempunyai aktivitas antioksidan yang berbeda dari bahan alamnya. Asam amino Phenilalanin (F), Alanin (A), dan Prolin (P) tidak diganti karena mempunyai peranan tinggi terhadap aktivitas antioksidan dari senyawa tetrapeptida. Aktivitas antioksidan dari peptida ditentukan oleh asam amino penyusunnya. Telah dilaporkan oleh Zou et al., (2016) bahwa hidrofobisitas, keunikan struktur dan berat molekul asam amino penyusun yang digunakan dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dari peptida.

Berdasarkan uraian diatas, maka rumusan masalah pada penelitian ini apakah penggantian asam amino Leu oleh Asn memiliki perbedaan aktivitas antioksidan dengan susunan alamnya, bagaimana cara mensintesis tetrapeptida Phe-Asn(Trt)-Ala-Pro dengan metode SPPS dan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mensintesis tetrapeptida Phe-Asn(Trt)-Ala-Pro menggunakan metode SPPS dengan dikarakterisasi dengan spektrometer massa dan dideteksi oleh instrumen HPLC.

Manfaat dari penelitian ini yaitu dapat memberikan alternatif bahwa tetrapeptida Phe-Asn(Trt)-Ala-Pro yang disintesis dengan metode SPPS akan menghasilkan kandidat obat antioksidan untuk menstabilkan senyawa radikal bebas

2 METODOLOGI

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral

Universitas Padjadjaran Bandung (UNPAD). Asam amino yang digunakan yaitu Fmoc-Fenilalanin-OH, Fmoc-Asparagin (Trt)-OH, Fmoc-Alanin-OH dan Fmoc-Prolin-OH. Penelitian ini terdiri dari tiga tahap yaitu tahap sintesis, tahap karakterisasi, dan dan tahap uji aktivitas antioksidan. Pada tahap sintesis menggunakan metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS). Terdiri dari beberapa tahap yaitu; pengkondisian tabung reaktor, pengembangan resin, pengkoplingan asam amino pertama, *capping* resin, uji kloranil, deproteksi, pengkoplingan asam amino kedua, ketiga, dan keempat. Pada tahap karakterisasi hasil sintesis digunakan spektrofotometer massa dan RP-HPLC. Analisis menggunakan spektrofotometer massa dilakukan untuk melihat nilai *m/z* tetrapeptida linier. Kemudian dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan RP-HPLC untuk melihat asam amino yang berhasil disintesis. Selanjutnya, pada tahap terakhir yaitu uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH terdiri dari beberapa tahapan lagi yaitu; pengujian sampel tetrapeptida dan pengujian vitamin C sebagai pembanding.

3 PEMBAHASAN DAN DISKUSI

Sintesis senyawa tetrapeptida dengan susunan FNAP (Phe-Asn(Trt)-Ala-Pro) dilakukan dengan menggunakan metode sintesis peptida fasa padat, dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu; loading resin, deproteksi gugus pelindung, kopling dan pelepasan peptida dari resin. Metode SPPS ini merupakan metode yang mempunyai beberapa keuntungan diantaranya yaitu lebih sederhana serta dapat memproduksi senyawa yang diinginkan dengan lebih cepat (Kim & McAlpine, 2013). Strategi SPPS yang digunakan adalah strategi Fmoc berdasarkan penggunaan gugus pelindung Fmoc pada gugus amino yang labil dalam basa, dan strategi perlindungan gugus pelindung pada rantai samping yang labil dalam asam (Chan dan White, 2000). Pada sintesis ini resin yang digunakan adalah resin 2-klorotritil klorida karena memiliki gugus yang meruah sehingga dapat mengurangi terjadinya rasemisasi (Maharani, 2016). Resin ini dipilih karena gugus aktifnya dapat meruah sehingga dapat mengoptimalkan pengikatan sisi aktif antara resin dengan asam amino yang akan direaksikan pada tahapan selanjutnya (Subiros et. al., 2009). Pada

metode ini digunakan reagen HBTU dan HOBt sebagai penyusun dalam asam amino Phe-Asn(Trt)-Ala-Pro. Digunakannya HBTU karena merupakan reagen yang sering digunakan, namun pada proses reaksi ini akan membentuk N yang kurang reaktif sehingga perlu ditambahkan HOBt untuk menjadi gugus yang lebih reaktif.

Pengkoplingan Asam Amino Pertama

Pada sintesis tetrapeptida ini asam amino pertama yang dikopling yaitu asam amino prolin. Asam amino Fmoc-Pro-OH yang pada gugus hidroksil (-OH) pada rantai samping asam amino tersebut tidak dilindungi dan gugus amina pada terminal-N asam amino telah dilindungi dengan gugus Fmoc agar tidak mengganggu pada suatu proses reaksi. Pengikatan asam amino prolin pada resin 2-klorotritil klorida diawali dengan cara ditambahkan pelarut DCM, selanjutnya pengikatan asam amino ujung C pada Fmoc-Pro-OH terhadap resin 2-klorotritil klorida dilakukan dengan cara mencampurkan dengan DIPEA. Penggunaan DIPEA berfungsi sebagai basa organik dan bisa juga sebagai reagen pada proses pengikatan asam amino dengan resin.

Tahapan selanjutnya dilakukan pengukuran Loading resin atau jumlah asam amino pertama yang terikat pada resin. Nilai loading resin dapat menentukan jumlah asam amino yang ditambahkan pada tahap selanjutnya (Chan & White, 2000). Nilai loading resin sebaiknya tidak terlalu besar karena dapat menyebabkan proses penyusunan peptida lebih sulit dan dapat terjadinya potensi agregasi asam amino semakin besar (Maharani, *et al.*, 2016). Penentuan nilai loading resin dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai loading resin yang didapat pada sintesis FNAP adalah sebesar 0,305 mmol/g. Nilai rata-rata loading yang baik adalah 0,1-1,3 mmol/mg menandakan bahwa peptida yang terikat pada resin baik.

Setelah dilakukan pengikatan asam amino pertama pada resin, perlu dilakukan capping resin untuk menutupi sisi aktif resin 2-klorotritil klorida sehingga asam amino selanjutnya tidak berikatan dengan sisi aktif resin yang tidak berikatan dengan asam amino pertama (Chan, 2000). Capping resin dilakukan dengan cara sampel ditambahkan campuran metanol : DCM : DIPEA (2:7:1).

Selanjutnya setelah dilakukan capping resin dilakukan proses deproteksi gugus pelindung

Fmoc asam amino yang berfungsi membebaskan sisi aktif asam amino pertama sehingga dapat berinteraksi dengan asam amino selanjutnya melalui reaksi kopling. Gugus pelindung Fmoc merupakan gugus pelindung yang labil terhadap basa, sehingga pada saat deproteksi digunakan larutan basa, dalam penelitian ini digunakan larutan piperidin 20% dalam DMF. Pelepasan gugus pelindung Fmoc diawali dengan penyerangan atom hidrogen pada gugus fluorena yang terdapat pada Fmoc oleh piperidin sehingga membentuk senyawa intermediet siklopentadiena (Chan & White, 2000). Selanjutnya dilakukan uji kloranil untuk melihat keberhasilan dari proses deproteksi. Hasilnya yaitu ditandai dengan berubahnya warna resin menjadi warna hijau, karena terdapat gugus amina (-NH₂) yang bebas.

Pengkoplingan Asam Amino Kedua, Ketiga dan Keempat

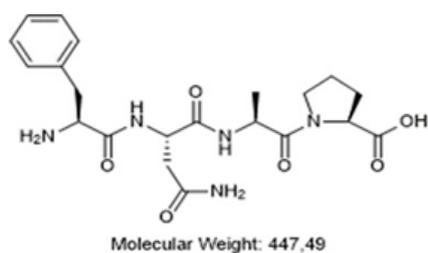
Setelah gugus amino bebas tersedia, dilakukan pengkoplingan asam amino kedua. Penyusunan fragmen peptida linear dilakukan dengan cara menambahkan asam amino berikutnya pada resin. Sintesis peptida fase padat merupakan reaksi heterogen sehingga interaksi antar molekul pada fase padat dan fase larutan menjadi terbatas. Oleh karena itu, penambahan jumlah asam amino dilakukan 3 kali lipat dari seharusnya untuk meningkatkan konsentrasi dan laju reaksi dengan memperbesar frekuensi tumbukan antar molekul. Pengkoplingan asam amino kedua yaitu Fmoc-AlaOH dengan menggunakan reagen HBTU, HOBt dan DIPEA dipilih karena efisien, cepat, dapat menjadikan gugus-N lebih reaktif dan dapat mencegah terjadinya rasemisasi. Keberhasilan kopling asam amino kedua dibuktikan dengan uji kloranil yang ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna resin disebabkan karena tidak ada gugus NH₂ yang bebas (Subiros, *et al.*, 2009). Setelah dilakukan kopling asam amino kedua dilakukan deproteksi gugus Fmoc untuk menyediakan sisi aktif asam amino tersebut yang nantinya akan berikatan dengan asam amino berikutnya sampai terbentuk tetrapeptida pada resin dengan menggunakan larutan basa piperidin 20% dalam DMF selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan uji kloranil kembali untuk melihat keberhasilan dari proses deproteksi. Hasilnya yaitu ditandai dengan berubahnya warna resin menjadi warna hijau, karena terdapat gugus amina (-NH₂) yang bebas. Tahap selanjutnya adalah

tahapan kopling asam amino ketiga dan keempat yang diawali dengan kopling asam amino ketiga dengan urutan kopling dan deproteksi Fmoc yang dilanjutkan dengan kopling asam amino keempat dengan tahapan yang sama hingga tetrapeptida tersusun pada resin.

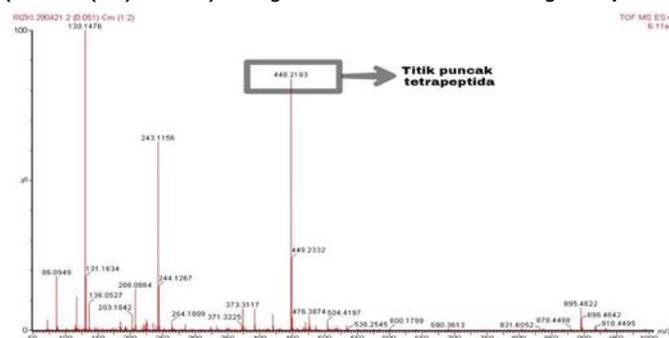
Setelah terbentuk tetrapeptida linier FNAP, dilakukan tahapan pelepasan peptida target dari resin. Pelepasan tetrapeptida dari resin dilakukan dengan penambahan TFA 95% dalam air. TFA 95% dipilih karena selain untuk melepaskan peptida target dari resin, konsentrasi yang tinggi dari reagen TFA juga dimaksudkan untuk melepaskan gugus pelindung rantai samping T-rt. Air dalam reaksi ini bertindak sebagai scavenger karbokation yang terbentuk setelah pelepasan peptida dari resin. Filtrat merah kecoklatan yang terbentuk setelah pelepasan peptida dari resin ditampung dalam vial lalu dipekatkan menggunakan rotary evaporator. Selanjutnya dipekatkan dengan rotary evaporator menghasilkan serbuk yang tidak terlalu kering berwarna kuning keputihan sebanyak 173,4 mg.

Spektrofotometer Massa dan RP-HPLC

Hasil krud FNAP kemudian dikarakterisasi dengan Spektrofotometer Massa didapatkan puncak fragmen pada m/z 448,2193 puncak ini mengindikasikan puncak ion $[M+H]^+$ untuk tetrapeptida. Hasil teoritis yang didapat untuk asam amino FNAP menggunakan software chemdraw didapat rumus kimia $C_{21}H_{29}N_5O_6$ dengan bobot molekul m/z 447,49.

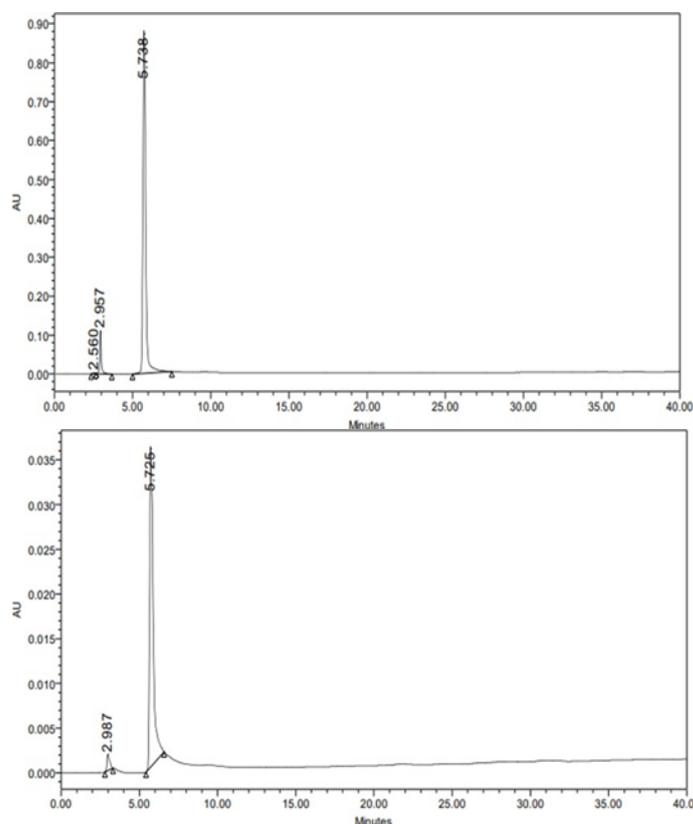


Gambar 1. Berat molekul struktur tetrapeptida FNAP (Huo-Xi Jin, et. al., 2019)



Gambar 2. Hasil Spektrofotometer Massa Tetrapeptida

Setelah dikarakterisasi, kemudian dianalisis kemurniannya menggunakan Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) dengan fase diam ODS yang bergugus non-polar dan fase gerak polar karena tetrapeptida sifatnya polar sehingga nantinya akan terelusi pertama kali yang ditunjukkan dikromatogramnya. Panjang gelombang yang digunakan merupakan panjang gelombang yang umum digunakan untuk analisis peptida yaitu 210 dan 240 nm.



Gambar 3. Hasil Kromatogram RP-HPLC tetrapeptida

Berdasarkan dari hasil kromatogram bahwa sampel tetrapeptida sudah murni karena hanya terdapat satu puncak. Hasil kromatogram didapat waktu retensi pada menit ke 5,738 dan 5,725 membentuk satu puncak. Sampel tetrapeptida ini disebut murni karena hanya terdapat satu puncak

Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH untuk melihat seberapa kuat suatu sampel dalam menangkal radikal bebas. Uji antioksidan dilakukan menggunakan skala mikro dengan variasi konsentrasi 0, 1600, dan 8000 ppm. Uji antioksidan senyawa tetrapeptida FNAP dilakukan sekali di waktu yang sama untuk menghindari perbedaan absorbansi yang signifikan yang disebabkan oleh perubahan radikal DPPH. Optimisasi uji antioksidan menggunakan metode DPPH dapat dilakukan dengan penggunaan banyak variasi konsentrasi sampel yang akan diuji. Dari hasil uji aktivitas antioksidan didapatkan nilai IC_{50} dari FNAP adalah 2,819 ppm. Hasil uji antioksidan senyawa FNAP menunjukkan aktivitas antioksidan yang rendah.

Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Sampel

konsentrasi (ppm)	ABS	% Inhibisi	IC_{50} (ppm)
0	1,7989	0	
1600	1,2501	30,507	2,819
8000	1,2042	33,059	

Pembandingan dari uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan Vitamin C karena sifatnya yang larut dalam air dan merupakan antioksidan yang sangat kuat.

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Vitamin C

konsentrasi (ppm)	ABS	% Inhibisi	IC_{50} (ppm)
0	1,7989	0	
1	0,1165	93,524	0,073
10	0,0846	95,297	

Dari hasil uji aktivitas antioksidan vitamin C memiliki nilai IC_{50} sebesar 0,073 ppm, yang menandakan bahwa antioksidan yang terkandung dalam vitamin C sangat kuat karena < 50 ppm

(Molyneaux, 2004).

4 KESIMPULAN

Berdasarkan pembahasan dalam penelitian ini, peneliti menyimpulkan beberapa hasil penelitian sebagai berikut:

Senyawa tetrapeptida FNAP berhasil disintesis menggunakan metode SPPS menghasilkan sebanyak 173,4 mg.

Karakterisasi dengan menggunakan spektrofotometer massa yang ditandai dengan munculnya puncak fragmen pada m/z 448,2193 yang menandakan puncak ion $[M+H]^+$.

Dilakukan pengujian menggunakan RP-HPLC untuk melihat kemurnian dari senyawa tetrapeptida didapat waktu retensinya pada menit ke 5,738 dan 5,725 (duplo) yang ditandai dengan adanya satu puncak.

Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH maka didapat nilai IC_{50} sebesar 2.819 ppm yang artinya tidak mencapai nilai IC_{50} sehingga aktivitas antioksidan dari senyawa tersebut lemah.

ACKNOWLEDGE

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT karena atas berkat rahmat, taufik dan hidayat-Nya penelitian ini dapat diselesaikan. Saya secara pribadi ingin mengucapkan terimakasih banyak kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu atas kontribusinya dalam penyelesaian penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- Chan WC, White PD. (2000). Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Sebuah Pendekatan Praktis. Oxford, Inggris.
- Droge, W. (2002). Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 82, 47-95.
- Huo-Xi J, Hong-Ping X, Yan Li, Qian-Wei Z and Hui Xie. (2019). Preparation and Evaluation of Peptides with Potential Antioxidant Activity by Microwave Assisted Enzymatic Hydrolysis of Collagen from Sea Cucumber *Acaudina Molpadioides* Obtained from Zhejiang Province in China. *Marine Drug*, China.
- Kim, S.J., McAlpine, S.R. (2013). *Solid Phase*

- versus Solution Phase Synthesis of Heterocyclic Macrocycles. *J. Molecules*, Vol. 8: 1111-1121.
- Maharani, R., Yanti, E. F. (2016). Sintesis Heptapeptida Linear (H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-Oh) Dengan Menggunakan Dic/Oksima Sebagai Reagen Pengkopling. (2016). Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Bandung 4(1).
- Merrifield, R.B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. 85(14): 2149-2154.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Rodwell, V. W. (2009). *Biokimia harper* (27 ed.). Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Molyneux, P. (2004). The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 212-217.
- Rohdiana, D. (2001). Aktivitas Daya Tangkap Radikal Polifenol dalam Daun Teh. *Majalah Jurnal Indonesia*. 12, 53-58.
- Rohman, A.; Riyanto S.; Yuniarti N.; Saputra W.R.; Utami R.; Mulatsih W. (2010). Antioxidant Activity, Total Phenolic and Total Flavaonoid of Extracts and Fractions of Red Fruit (*Padanus conoideus* Lam). *International Food Research Journal*. 17, 97- 106.
- Sanchez A, Vasquez A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Qual Saf*. 1: 29-46.
- Subandiyono, S., Hastuti. (2016). *Buku Ajar Nutrisi Ikan*. Semarang: Lembaga Pengembangan dan Penjaminan Mutu Pendidikan Universitas Diponegoro.
- Subiros, R., Prohens, R., Barbas, R., Faham, A. E., Albericio, F. (2009). Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion. *Chemistry European A Journal*. Spain : Barcelona Science Park Baldiri Reixac 10.
- Sunarni, T., Pramono, S., Asmah, R. (2007). Flavonoid antioksidan penangkap radikal dari daun kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.). *Hook f. & Th., M.F.I.*, 18 (3) : 111-116.
- Windono, T., Soediman, S., Yudawati, U., Ermawati, E., Srielita, Erowati, T. I. (2001). Uji Peredam Radikal Bebas terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) dari Ekstrak Kulit Buah dan Biji Anggur (*Vitis vinifera* L.) Probolinggo Biru dan Bali. *Artocarpus*. 1, 34-4.
- Zou W, Xiao Z, Wen X, Luo J, Chen S, Cheng Z, et al. (2016). The Antiinflammatory Effect of *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees on Pelvic inflammatory Disease in Rats Through Down-Regulation of The NF-Kb Pathway. *BMC Complement Altern Med*.
- Fauzi, Nur Muhammad. (2021). *Uji Kualitatif dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Buah Maja (Aegle Marmelos (L.) Correa) dengan Metode DPPH*. *Jurnal Riset Farmasi*, 1(1), 1-8.