PENGARUH LOKASI DAN PELARUT PENGEKSTRAKSI TERHADAP KANDUNGAN FITOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica* L. Urb)

THE EFFECT OF LOCATION AND EXTRACTION SOLVENTS ON PHYTOCHEMICAL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PEGAGAN EXTRACT (*Centella asiatica* L. Urb)

Nina Artanti, Rizna Triana Dewi dan Faiza Maryani

Pusat Penelitian Kimia – Lembaga Ilmu Penelitian Indonesia,
Kawasan PUSPIOTEK Serpong – Tangerang Selatan, Banten, Indonesia
Email : rtriana_dewi@yahoo.com

Diterima : 05 Agustus 2014, Revisi : 15 Agustus 2014, Disetujui : 29 Agustus 2014

ABSTRAK

Pegagan (*Centella asiatica* Linn Urb.) merupakan jenis tanaman yang biasa digunakan dalam industri farmasi dan kosmetik. Penelitian ini ditujukan untuk mengevaluasi pengaruh tiga lokasi asal sampel dan tiga jenis larutan pengeksktraksi (metanol, etanol 96% (v/v), dan etanol 70% (v/v)) terhadap aktivitas antioksidan herbal pegagan (*Centella asiatica* Linn Urb). Sampel pegagan yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Lembang, Bandung, dan Solo. Pada ekstrak yang diperoleh dilakukan penentuan kadar fenol total, flavonoid total, dan triterpenoid total. Aktivitas antioksidan dari ekstrak dievaluasi berdasarkan metoda peredaman radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa simplisia pegagan asal Lembang yang diekstrak dengan etanol 70% mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi serta kandungan fenol total dan flavonoid total tertinggi. Sedangkan simplisia pegagan asal Bandung yang diekstrak dengan pelarut metanol memiliki kandungan triterpenoid total tertinggi tetapi memiliki kandungan fenol total dan flavonoid total serta aktivitas antioksidan yang terendah. Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa lokasi asal simplisia pegagan dan polaritas pelarut yang digunakan untuk ekstraksi secara signifikan ($p < 0,05$) mempengaruhi kandungan fenol total, flavonoid total dan triterpenoid total serta aktivitas antioksidan dari ekstrak pegagan.

Kata kunci : ekstrak pegagan, antioksidan, polaritas pelarut

ABSTRACT

Pegagan (*Centella asiatica* Linn Urb.) is a plant species that commonly used in the pharmaceutical and cosmetic industry. Objective of this study is to evaluate the effect of different source location and solvent polarity for the extraction to the content of total phenolic, total flavonoid total triterpenoids as well as antioxidant activity of pegagan (*Centella asiatica* (Linn.) Urb.) extracts. Pegagan materials for this study are from three different locations: Bandung, Lembang and Solo. Based on polarity differences methanol, ethanol 96% and ethanol 70% were used as solvent for

extraction. Antioxidant activity of the extract was evaluated based on the method of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. Results showed that the highest total phenolic content and flavonoid content and antioxidant activity were from 70% ethanol extract from Lembang. Materials from Bandung extracted with methanol gave the highest content of total triterpenoid, however has the lowest content of total phenolic, total flavonoid and antioxidant activity. Statistic analysis showed that there is significant differences ($p < 0,05$) of results of total phenolic, total flavonoid, total triterpenoid and antioxidant activity due to source location and solvent polarity.

Keywords : asiatica (Linn.) Urb extract, antioxidant, polarity solvent

PENDAHULUAN

Ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan sistem pertahanan antioksidan di dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif, yang merupakan faktor penting dalam perkembangan penyakit kronis dan degenerative seperti arteriosklerosis, diabetes, menginisiasi kanker dan juga terlibat dalam proses penuaan⁽¹⁾. Oleh karena itu, terapi antioksidan merupakan pengobatan yang menjanjikan untuk mengatasi efek stres oksidatif. Antioksidan dapat menghambat proses oksidasi lipid, dengan meredam radikal bebas dan menghambat peroksidasi lipid, sehingga mampu melindungi tubuh dari beberapa penyakit yang disebabkan serangan radikal bebas⁽²⁾.

Antioksidan yang berasal dari alam relative lebih banyak dipilih dibandingkan antioksidan sintesis. Salah satu herbal yang menunjukkan aktivitas antioksidan adalah pegagan (*Centella asiatica* Linn Urb.)⁽²⁻⁴⁾. Pegagan merupakan salah satu dari tumbuhan obat yang

dimiliki Indonesia yang telah digunakan secara tradisional dalam pengobatan berbagai penyakit seperti untuk penyakit kulit, sakit perut, batuk, batuk berdarah, disentri, penyembuh luka, radang, pegal linu, asma, wasir, tuberkulosis, lepra, demam dan penambah selera makan⁽⁵⁾. Kandungan kimia utama yang penting dan khas pada pegagan adalah senyawa golongan triterpen ester glikosida yaitu asiaticosida dan madecassosida, dan senyawa golongan triterpen yaitu asam asiatic dan asam madecassic, selain itu pegagan juga mengandung berbagai senyawa yang termasuk dalam golongan senyawa lainnya⁽⁶⁾.

Kadungan kimia dan aktivitas ekstrak dari tumbuhan obat dipengaruhi oleh berbagai hal yang berkaitan dengan tumbuhan itu sendiri maupun proses pengekstraksiannya. Dalam melakukan ekstraksi tumbuhan obat, banyak faktor yang dapat mempengaruhi kandungan kimia dan aktivitas ekstrak yang diperoleh, antara lain adalah faktor lokasi tempat tumbuh dan polaritas pelarut yang digunakan untuk mengekstrak tumbuhan obat tersebut^(2, 7, 8). Pengaruh lokasi tempat tumbuh perlu diteliti mengingat, di Indonesia sebagian besar simplisia tumbuhan obat diperoleh dari alam dan hanya sedikit yang sudah dibudidayakan. Demikian pula dengan pengaruh pelarut yang digunakan untuk mengetahui efektivitas ekstraksi untuk mendapatkan kadungan kimia dan aktivitas yang diharapkan.

Aktivitas antioksidan merupakan salah satu dari sekian banyak aktivitas yang dimiliki pegagan⁽⁹⁾. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh perbedaan polaritas pelarut pengekstraksi terhadap kandungan kimia dan aktivitas antioksidan dari ekstrak pegagan yang simplisiannya berasal dari Bandung, Lembang dan Solo. Metanol, etanol 96% (v/v), dan etanol 70% (v/v) dipilih sebagai pelarut pengekstraksi berdasarkan perbedaan polaritas pelarut. Kandungan kimia yang dianalisa dengan metoda kolorimetri adalah fenol total, flavonoid total dan triterpen total. Sedangkan, aktivitas antioksidan dari ekstrak dievaluasi berdasarkan metoda peredaman radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

BAHAN DAN METODA

Bahan

Sampel herbal pegagan diperoleh dari tiga lokasi yang berbeda yaitu dari Bandung, kebun tanaman obat Lembang dan Balai Penelitian Tanaman Obat Tawangmangu, Solo. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dan Follin-Ciocalteu 2N diperoleh dari Sigma. Asam galat, quercetin, vanillin, Na₂CO₃, AlCl₃, NaNO₂, NaOH, H₂SO₄, diperoleh dari Merck. Sedangkan pelarut

etanol dan methanol teknis, didestilasi terlebih dahulu sebelum digunakan.

Peralatan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: timbangan analitik, penguap vacuum berputar (Buchi), dan spectrometer Hitachi U2000.

Metoda

Preparasi Sampel

Masing-masing sampel dengan berat 100 gr dikeringkan dan dihancurkan. Sampel halus kemudian dimaserasi masing-masing dengan pelarut methanol, etanol 96%, dan etanol 70% selama satu malam dimana kepolaran pelarut adalah metanol < etanol 96% < etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh digunakan untuk analisa lebih lanjut.

Penentuan Kandungan Senyawa Fenol total

Kandungan senyawa fenol total dalam ekstrak ditentukan dengan metoda Follin-Ciocalteu⁽⁹⁾ menggunakan asam galat sebagai standar. Kandungan senyawa fenol total dalam ekstrak dinyatakan sebagai asam galat equivalen (mg/g ekstrak) berdasarkan persamaan regresi dari kurva kalibrasi ($y=0,0903+0,039x$, $R^2=0,99$). Larutan sampel (0,5 mL) atau larutan standar asam galat (50, 100, 150, 200, dan 250 µL) dipipet kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 7 mL aquades dan 0,5 mL Folin-Ciocalteu dan dikocok. Setelah didiamkan selama 8 menit, 1,5 mL Na₂CO₃ 20% ditambahkan dan dikocok homogen. Campuran kemudian didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Serapan diukur pada panjang gelombang 765 nm. Pengukuran dilakukan 3 kali pengulangan sehingga kadar fenol yang diperoleh hasilnya dapat sebagai asam galat equivalen (mg/gram ekstrak).

Penentuan Kandungan Senyawa Flavonoid Total

Kandungan senyawa flavonoid total dihitung berdasarkan metoda aluminium klorida⁽¹⁰⁾. Kandungan senyawa flavonoid total dinyatakan sebagai quercetin equivalen (mg/g ekstrak) berdasarkan persamaan regresi dari kurva kalibrasi ($y=0,0108-0,004x$, $R^2=0,99$). Kandungan Total flavonoid ditentukan dengan metoda aluminum chloride colorimetric assay. Larutan ekstrak (500 µL) atau larutan standar quercetin (50, 100, 150, 200, dan 250 µL) dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 mL aquades. Ke dalam tabung ditambahkan 150 µL NaNO₂ 5%. Setelah 5 menit, 150 µL AlCl₃ 10% ditambahkan. Enam menit kemudian, 2 mL NaOH 1M dan aquades ditambahkan hingga volume menjadi 5 mL. Larutan dihomogenkan

dan diukur serapannya pada panjang gelombang 510 nm. Kadar flavonoid yang diperoleh adalah sebagai quercetin equivalen (mg/g ekstrak).

Penentuan Kandungan Senyawa Triterfenoid Total

Kandungan senyawa triterfenoid total ditentukan dengan metoda vanillin-asam sulfat⁽¹¹⁾. Larutan sampel (0,5 ml) dicampur dengan larutan vanillin (8% b/v) dan asam sulfat (72% v/v). Campuran diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit, selanjutnya didinginkan dalam penangas es selama 10 menit hingga mencapai suhu ruang. Serapan diukur pada panjang gelombang 534 nm. Batulinol digunakan sebagai senyawa pembanding, dan kandungan senyawa triterfen total dinyatakan sebagai betulinol equivalen (mg/g ekstrak) berdasarkan persamaan regresi dari kurva kalibrasi ($y=0,0392+0,0171x$, $R^2=0,99$).

Pengujian Peredaman Radikal Bebas DPPH

Aktivitas antioksidan dari ekstrak terhadap radikal bebas DPPH diukur menurut metoda Yen & Chen (1995)⁽¹²⁾. Larutan ekstrak (10-200 µg) dalam 4 mL methanol ditambahkan larutan 1 mL DPPH (1 mM dalam methanol). Campuran dikocok dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Serapan yang dihasilkan diukur pada panjang gelombang 515 nm. Persen inhibisi sampel dihitung berdasarkan perbedaan serapan antara blanko dan sample.

Statistik Analisis

Semua pengujian dilakukan dengan tiga kali ulangan dan hasil dinyatakan sebagai nilai rata-rata ± standar deviasi (SD). Analisis varian dihitung berdasarkan ANOVA (IBM SPSS Statistic version 19).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada Tabel 1 dapat dilihat hasil analisa kandungan senyawa fenol, flavonoid, dan triterpenoid total serta aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dari ekstrak pegagan yang berasal dari tiga lokasi dan diekstraksi dengan 3 jenis polaritas pelarut. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa lokasi asal tumbuhan dan polaritas pelarut memberikan variasi kandungan total fenol, total flavonoid, total triterpenoid dan aktivitas antioksidan dari ekstrak pegagan. Pada penelitian ini, metanol merupakan pelarut terbaik untuk mengekstraksi senyawa triterpenoid dari ketiga lokasi simplisia pegagan, terutama simplisia pegagan asal Bandung. Sedangkan pelarut etanol 70% merupakan pelarut terbaik untuk mengekstraksi senyawa fenol dan flavonoid dari simplisia pegagan Lembang dan Solo. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian-penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa campuran pelarut organik dengan air merupakan pelarut terbaik untuk

mengekstraksi senyawa fenol dan flavonoid dari tanaman pada umumnya⁽¹³⁾. Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa lokasi asal simplisia pegagan dan polaritas pelarut yang digunakan untuk ekstraksi secara signifikan ($p<0,05$) mempengaruhi kandungan fenol total, flavonoid total dan triterpenoid total serta aktivitas antioksidan dari ekstrak pegagan yang diperoleh, selain itu juga terjadi perbedaan signifikan antara interaksi perbedaan lokasi dan dan perbedaan polaritas pelarut yang digunakan.

Tabel 1. Hasil analisa kandungan kimia dan aktivitas antioksidan (peredaman radikal bebas DPPH berbagai ekstrak pegagan dari 3 lokasi menggunakan 3 perbedaan polaritas pelarut.

Sampel	Ekstrak	Fenol Total ¹	Flavonoid total ²	Triterpenoid Total ³	Antioksidan ⁴
Bandung	Metanol	29,43±2,86	110,65±5,24	245,04±6,06	1,87±0,08
	Etanol 96%	45,79±4,07	109,72±8,51	240,44±1,29	16,94±2,07
	Etanol 70%	39,09±2,11	69,21±0,33	139,96±0,54	35,90±0,08
Lembang	Metanol	54,49±3,13	180,09±3,09	234,47±1,08	89,59±1,95
	Etanol 96%	85,41±5,83	225,46±9,17	166,82±2,16	89,53±1,95
	Etanol 70%	111,46±3,29	295,37±3,53	115,93±2,27	91,34±2,32
Solo	Metanol	36,60±0,86	81,25±5,27	129,02±9,09	3,68±0,45
	Etanol 96%	44,85±1,33	95,14±6,22	127,26±0,97	20,86±6,71
	Etanol 70%	50,17±5,17	84,95±2,29	94,12±2,16	43,44±6,02

Keterangan:

¹asam galat equivalen (mg/gekstrak)

²quercetin equivalen (mg/g ekstrak)

³betulinol equivalen (mg/g ekstrak)

⁴% inhibisi pada konsentrasi sampel 200µg/mL

Ekstrak pegagan dari Lembang dengan ketiga jenis pelarut menunjukkan kandungan fenol total dan flavanoid total serta aktivitas antioksidan yang tertinggi dibandingkan dengan ekstrak pegagan dari Bandung dan Solo. Sedangkan ekstrak pegagan yang berasal dari Bandung yang diekstrak dengan ketiga jenis pelarut, menunjukkan kandungan total triterpenoid tertinggi dibandingkan dengan ekstrak pegagan dari Lembang dan Solo. Pada penelitian ini ekstrak pegagan asal Lembang yang diekstrak dengan etanol 70% memiliki kandungan fenol total dan flavonoid total tertinggi juga menunjukkan aktivitas antioksidan peredaman radikal bebas yang tertinggi dibanding sampel lainnya. Peredaman radikal bebas DPPH pada sampel tersebut (91,44% inhibisi pada 200µg/mL sampel) lebih tinggi dari hasil yang dilaporkan⁽⁴⁾ untuk pegagan di Malaysia yang juga diekstrak menggunakan pelarut etanol 70%, dimana nilainya adalah 72,99% inhibisi pada 250µg/mL sampel. Sedangkan hasil aktivitas antioksidan yang rendah dari ekstrak pegagan asal Bandung dan Solo mendekati hasil aktivitas antioksidan untuk ekstrak pegagan dari India dan Turki⁽¹⁴⁾. Hasil ini memperkuat dugaan bahwa senyawa fenol dan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak pegagan mempengaruhi

aktivitas peredaman radikal bebas DPPH, sedangkan senyawa triterpen tidak bertanggung jawab pada aktivitas antioksidan.

Efektifitas antioksidan terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti flavonoid, dan asam fenolat. Umumnya, senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi orto dan para terhadap gugus -OH dan -OR⁽¹⁾. Menurut Satria (2005)⁽¹⁵⁾, senyawa flavonoid mempunyai khasiat sebagai antioksidan dengan menghambat berbagai reaksi oksidasi serta mampu bertindak sebagai pereduksi radikal hidroksil, superoksida dan radikal peroksil. Hasil penelitian kandungan total fenol dan flavonoid serta aktivitas peredaman radikal bebas DPPH pada 21 tanaman yang dilaporkan oleh Mustafa et al. (2010)⁽¹⁶⁾ menyimpulkan bahwa flavonoid diduga merupakan komponen utama yang memberikan kemampuan antioksidan tanaman-tanaman tersebut. Akan tetapi, penelitian tersebut menunjukkan kecenderungan yang sedikit berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan pada pegagan Bandung dan Solo. Ekstrak pegagan asal Bandung yang kandungan flavonoidnya relatif lebih tinggi dari ekstrak pegagan asal Solo, ternyata mempunyai aktivitas peredaman radikal bebas yang lebih rendah. Hal ini menunjukkan bahwa pada pegagan flavonoid total tidak selalu merupakan komponen utama yang berperan dalam memberikan kemampuan aktivitas antioksidan ada kemungkinan senyawa lain atau interaksi antar senyawa yang dapat menentukan kemampuan aktivitas antioksidan dalam hal ini peredaman radikal bebas DPPH. Senyawa fenol yang dilaporkan terkandung dalam pegagan adalah 3-O-Caffeoylquinic acid (*Chlorogenic acid*); 1,5-Di-O-caffeoylquinic acid; 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid; 3,5-Di-O-caffeoyl-4-malonylquinic acid (*Irbic acid*); 4,5-Di-O-caffeoylquinic acid; 3,5-Di-O-caffeoyl-4-malonylquinic acid, sedangkan senyawa-senyawa flavonoidnya adalah *Quercetin* 3-O-b-D-glucuronide; *Quercetin*; *Kaempferol*⁽⁶⁾.

Pengaruh lokasi asal terhadap kandungan triterpenoid ekstrak pegagan (Tabel 1) adalah sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan pada pegagan di Indonesia^(17, 18), dan negara lain seperti Madagaskar, Srilanka, India, Thailand⁽¹⁹⁾. Kebanyakan penelitian tentang pegagan yang berkaitan lokasi hanya melaporkan kandungan triterpenoid, ataupun kandungan senyawa asiatikosida, madekasosida, asam asiatat dan asam madekasat yang merupakan kandungan utama serta merupakan senyawa khas pada pegagan. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa lokasi juga mempengaruhi kandungan fenol total dan flavonoid total dalam ekstrak pegagan, seperti yang dilaporkan pada tumbuhan *Diospyros kaki*⁽²⁰⁾, *pandan*⁽²⁰⁾, dan *Portulaca oleracea*⁽²¹⁾.

Pengaruh polaritas pelarut terhadap kandungan kimia ekstrak pegagan dalam penelitian ini (Tabel 1) menunjukkan bahwa kenaikan polaritas pelarut hanya menunjukkan korelasi yang konsisten pada kandungan triterpenoid total, dimana kenaikan polaritas pelarut menurunkan kandungan triterpenoid total ekstrak pegagan untuk ketiga lokasi asal simplisia pegagan. Sedangkan kenaikan polaritas dengan kandungan fenol total dan flavonoid total tidak terlihat adanya korelasi yang konsisten. Di lain pihak, aktivitas antioksidan akan meningkat seiring dengan peningkatan polaritas pelarut dengan urutan sebagai berikut: ekstrak EtOH 70% > EtOH 96% > MeOH. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kenaikan polaritas pelarut karena pencampuran pelarut organik dengan air untuk ekstraksi menyebabkan kenaikan kandungan fenol total dan flavonoid total pada ekstrak pegagan⁽²⁾ dan juga ekstrak teh hitam⁽²²⁾.

KESIMPULAN

Kandungan fenol total tertinggi (111,46 mg/g) dan flavonoid total tertinggi (295,37 mg/g) serta aktivitas antioksidan tertinggi (91,34%) diperoleh dari simplisia pegagan asal Lembang yang diekstrak dengan etanol 70%. Simplisia pegagan asal Bandung yang diekstrak dengan pelarut metanol memiliki kandungan triterpenoid total tertinggi (245,04 mg/g) tetapi memiliki kandungan fenol total dan flavonoid total serta aktivitas antioksidan yang terendah. Disimpulkan bahwa lokasi asal dan polaritas pelarut memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kandungan kimia dan aktivitas antioksidan ekstrak pegagan, sehingga hal ini perlu mendapat perhatian dalam melakukan standarisasi simplisia pegagan untuk bahan baku obat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari program Tematik DIPA Puslit Penelitian Kimia-LIPI tahun anggaran 2014. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Dewi Sondari MSi, atas penyediaan sample pegagan dari Tawangwangu-Solo dan kepada Puspa Dewi NL MSc, atas masukan dan diskusi dalam penyusunan makalah ini..

DAFTAR PUSTAKA

1. Chandra S and Dave R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An Overview. *Afr. J. Microbiol Res.* 3(13): 981-996 (2009)
2. Rahman, M. S. Hossain, A. Rahaman, N. Fatima, T. Nahar, B. Uddin, M.A. Basunia. Antioxidant Activity of *Centella asiatica* (Linn.) Urban:

- Impact of Extraction Solvent Polarity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1 (6): 27-32 (2013)
3. Hashim, P. Mini Review *Centella asiatica* in food and beverage application and its potential antioxidant and neuroprotective effect. *International Food Research Journal* 18(4): 1218-1222 (2011).
  4. Maulidiani, F. Abas, A. Khatib, K. Shaari, N.H. Lajis. Chemical characterization and antioxidant activity of three medicinal Apiaceae species. *Industrial Crops and Products* 55 (2014) 238-247 (2014).
  5. BPOM RI. Serial Data Ilmiah Tumbuhan Obat Terkini: Pegagan *Centella asiatica* (L.) Urban. ISBN 978-602-98653-1-8. Direktorat OAI Deputi II, Badan POM RI. 20 halaman (2010).
  6. James, J.T., and I.A. Dubery. Pentacyclic Triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules* 14: 3922-3941 (2009).
  7. Rahajanirina, V, S. Raoseta, E. Roger, H. Razafindrazaka, S. Pirotais, M. Boucher, and P. Danthu. The Influence of Certain Taxonomic and Environmental Parameters on Biomass Production and Triterpenoid Content in the Leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb. from Madagascar. *Chemistry & Biodiversity* 9 (2013) 298-308 (2013).
  8. Husnah, M., H. Barroroh, E.K. Hayati. Identifikasi dan uji aktivitas golongan senyawa antioksidan ekstrak kasar buah pepino (*Solanum muricatum* Aiton) berdasarkan variasi pelarut. *Alchemy* 1(1):10-15 (2009).
  9. Singleton, V.L. and Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144-158 (1965).
  10. Sultana B, Anwar F, and Ashraf M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules* 14: 2167-2180 (2009).
  11. Chen YF, Yang CH, Chang MS, Ciou YP, and Huang CY. Foam properties and detergent abilities of the saponins from *Camellia oleifera*. *Int. J. Mol. Sci.* 11:4417-4425 (2010).
  12. Yen G. and H.Chen. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity", *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 43: 27-32 (1995).
  13. Maja Dent, Dragovic-Uzelac V, Penic M, Brncic M, Bosiljkov T, and Levaj B. The effect of extraction solvents, temperatures and time on the composition and mass fraction of polyphenol in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extract. *Food Technol. Biotechnol.* 51(1) 84-91 (2013).
  14. Orhan, I.E., E. Atasua, F.S. Senola, N. Ozturk, B. Demirci, K. Das, N. Sekeroglu. Comparative studies on Turkish and Indian *Centella asiatica* (L.) Urban (gotu kola) samples for their enzyme inhibitory and antioxidant effects and phytochemical characterization. *Industrial Crops and Products* 47 316-322 (2013).
  15. Satria E. Potensi antioksidan dari daging buah muda dan daging buah tua mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor 2005.
  16. Mustafa, R.A, A. Abdul Hamid, S. Mohamed, F.A. Bakar. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *Journal of Food Science*. 75(1):C28-35 (2010).
  17. Sondari, D., S.B. Harmami, M. Ghazali, A. Randy, A. Amanda, Y. Irawan. Determination of the active asiaticoside content in *Centella asiatica* as anti-cellulite agent. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 2(2):221-226 (2011).
  18. Mora E dan A. Fernando. 2012 Optimasi ekstraksi triterpenoid total pegagan (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) yang tumbuh di Riau. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia* 1(1): 11-16 (2012).
  19. Putarak, P and P. Panichayupakaranant. Factors affecting the content of pentacyclic triterpenes in *Centella asiatica* raw materials. *Pharmaceutical Biology*, 50(12): 1508-1512 (2012).
  20. Lee JH, YB Lee, WD Seo, ST Kang, JW Lim, KM Cho. Comparative Studies of Antioxidant Activities and Nutritional Constituents of Persimmon Juice (*Diospyros kaki* L. cv. Gapjubaekmok). *Prev Nutr Food Sci.* 17(2):141-51 (2012).
  21. Ghasemzadeh A, HZ Jaafar. Profiling of phenolic compounds and their antioxidant and anticancer activities in pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) extracts from different locations of Malaysia. *BMC Complement Altern Med.* 13:341-350 (2013)
  22. Turkmen, N., Y.S. Velioglu, F. Sari, G. Polat. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules* 12: 484-496 (2007)