

BIOASSAY ANTIOKSIDASI EKSTRAK DAGING BUAH SALAK BONGKOK (*SALACCA EDULIS* REINW.) DENGAN KHAMIR *CANDIDA* SP. Y390

Dede Falahudin

Puslit Oseanografi-LIPI
Jl. Pasir Putih I, Jakarta Utara, Jakarta
e-mail: dfalahudin@yahoo.com

ABSTRACT

This research was conducted to determine antioxidant activity of Bongkok snake fruit crude extract by in vivo assay using yeast cell Candida sp.Y390 as experimental model. Crude extract has secondary metabolite compound such as alkaloid, saponin, flavonoid, phenolic, and tannin. Mature crude extract of 200 ppm concentration potentially inhibits lipid peroxidase of yeast cell which has been treated by paracetamol 0.3%. The inhibition of the 200 ppm extraxt concentration is higher than vitamin 0.225 mg/ml reaching 61.06% and 53.65% respectively.

Keywords: Lipid peroxidase; Yeast; Candida; Sallacca edulis; Antioxidant

PENDAHULUAN

Penyakit degeneratif, kanker, dan penuaan dini menjadi masalah baru dalam dunia kesehatan. Salah satu penyebabnya akibat proses peroksidasi lipid sel tubuh akibat senyawa radikal bebas.¹ Penelitian bahan alam yang mempunyai aktivitas menghambat peroksidasi lipid berasal dari tumbuh-tumbuhan. Tumbuh-tumbuhan mengandung senyawa fitokimia yang mempunyai aktivitas antioksidasi seperti karotenoid, fitosterol, saponin, glikosinolat, polifenol, inhibitor protease, monoterpen, fitoestrogen, turunan senyawa flavonoid, sulfida, alkaloid, dan asam fitat.²

Mekanisme penuaan dini, apoptosis, kerusakan sel organisme tingkat tinggi, aktivitas antioksidan dan kompleksitas mekanismenya terhadap stres oksidatif dapat diuji menggunakan sel khamir.^{3,4} Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan sel khamir sebagai model untuk pengujian aktivitas antioksidasi ekstrak daging buah salak bongkok (*Salacca edulis* Reinw). Khamir yang digunakan merupakan koleksi laboratorium *Application microbiology*, Puslit Biologi-LIPI dengan klasifikasi yaitu kingdom Fungi, filum

Ascomycota, kelas Hemiascomycetes, ordo Sacharomycetales, famili Candidaceae, genus *Candida*, dan spesies *Candida* sp.⁵

Klasifikasi buah salak varietas bongkok yang digunakan sebagai sumber senyawa fitokimianya yaitu kingdom Plantae, kelas Magnolophyta, ordo Liliopsida, famili Arecales, genus *Salacca* dan species *Salacca edulis* Reinw.⁶ Salak jawa var. 'Bongkok' merupakan jenis salak jawa (*Salacca zalacca* (Gaertner) Voss.). Nama salak bongkok berasal dari tempat salak ini yaitu Desa Bongkok, Kecamatan Conggeang, Sumedang, Jawa Barat. Hasil penelitian Priyatno,⁷ ekstrak etil asetat, etanol, dan air daging buah salak bongkok mempunyai kandungan fitokimia, yaitu flavonoid, alkaloid, terpenoid, katekin, tanin, kuinon, dan asam askorbat 8,37 mg/100 g. Aktivitas biologis sebagai antioksidan yaitu menghambat proses pembentukan radikal bebas *diphenyl-I-pichrilhydrazin* (DPPH) pada konsentrasi ekstrak 200 µg/ml, 400 µg/ml, dan 2000 µg/ml serta menghambat pembentukan asam urat sebesar 27,24% pada konsentrasi 0,2 µg/ml.

Pengukuran peroksidasi lipid diukur melalui konsentrasi malondialdehida (MDA) sebagai

produk akhir reaksi tersebut. Menurut Tukozyan *et al.*,⁸ MDA adalah senyawa dialdehid atau berkarbon tiga yang reaktif sehingga menjadi penanda toksisitas sel, mutagenesis, dan penguraian lipid pada membran sel.¹ Konsentrasi MDA yang terakumulasi secara *in vivo* di dalam organ dan partikel subseuler dapat diukur menggunakan uji asam 2-tiobarbiturat (Uji TBA).⁹ Metode TBA dimulai sejak Berneheim *et al.*¹⁰ dan Wilbur *et al.*¹¹ menemukan adanya reaksi melalui penambahan nukleofilik karbon 1 MDA dengan karbon 5 TBA membentuk senyawa kompleks MDA-(TBA)₂ yang berwarna merah muda dan diukur dengan spektrofotometer atau HPLC pada panjang gelombang 532 nm.⁹ Warna merah yang terukur sebanding dengan tingkat peroksidasi lipid oleh radikal lipid, radikal lipid peroksil, dan radikal hidroksil.⁸ Penelitian ini akan membuktikan adanya proses penghambatan peroksidasi lipid pada sel khamir sebagai model percobaan oleh ekstrak daging buah salak bongkok.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan beberapa tahap, yaitu ekstraksi dan identifikasi ekstrak daging buah salak, penumbuhan dan pembuatan kurva pertumbuhan stok khamir sebagai media uji, pembuatan kurva standar MDA (TMP), dan pengujian aktivitas antioksidasi ekstrak daging

buah salak terhadap peroksidasi lipid yang dibandingkan dengan vitamin C.

Persiapan sampel ekstrak daging buah salak bongkok dilakukan dengan metode Harbone¹² dengan senyawa yang diidentifikasi adalah alkaloid, saponin, flavonoid, senyawa fenolik, dan tanin. Pembuatan media tumbuh, stok khamir, dan kurva pertumbuhan khamir dilakukan berdasarkan metode yang dikembangkan di laboratorium *Application of Microbiology*-Puslit Biologi LIPI. Pembuatan kurva standar MDA (TMP), dan aplikasi aktivitas antioksidasi ekstrak 200 ppm daging buah salak terhadap peroksidasi lipid yang dibandingkan dengan vitamin C mengacu pada metode Li *et al.*¹³ yang telah dimodifikasi. Pembuatan kurva standar TMP dari larutan pereaksi 1,1,3,3 tetra metoksi propana (TMP) 6 M dan dibuat larutan stok TMP 60 µM. Lalu rancangan percobaannya dilakukan seperti dalam Tabel 1.

Pengukuran aktivitas antioksidasi ekstrak salak bongkok konsentrasi 200 ppm, dilakukan dengan cara sebanyak 400 ml biakan sel khamir dalam media cair gliserol umur dua hari disentrifus dengan kecepatan 5000 G selama 10 menit, temperatur 20–27°C, lalu diambil bagian peletnya dan dibilas dengan akuades, setelah itu disentrifus kembali dan peletnya diencerkan dengan akuades sampai 25 ml. Setelah itu dibuat rancangan percobaannya seperti dalam Tabel 2.

Tabel 1. Pembuatan Kurva Standar 1,1,3,3 Tetra Metoksi Propana (TMP)

Perlakuan	Akuades (µl)	Larutan stok TMP 60 µM (µl)				
STD 10	1590	10	-	-	-	-
STD 20	1580	-	20	-	-	-
STD 30	1570	-	-	30	-	-
STD 40	1560	-	-	-	40	-
STD 50	1550	-	-	-	-	50

Tabel 2. Pengukuran Aktivitas Antioksidasi Ekstrak Salak Berdasarkan Penghambatan Peroksidasi Lipid

Perlakuan	Suspensi sel khamir (ml)	Akuades (ml)	Parasetamol 1.6% (ml)	Vitamin C 1,2 mg/ml (ml)	Ekstrak etil asetat daging buah salak 200 ppm
Kontrol normal	1	0,6	-	-	-
Kontrol positif	1	0,3	0,3	-	-
Vit. C normal	1	0,3	-	0,3	-
Vit.C stres parasetamol	1	-	0,3	0,3	-
Ekstrak salak normal	1	0,3	-	-	0,3
Ekstrak salak stres parasetamol	1	-	0,3	-	0,3

Semua campuran yang dirancang dalam Tabel 1 dan 2 diinkubasi dengan pengadukan pada kecepatan 100 rpm selama 2 jam. Pengukuran MDA dilakukan dengan cara campuran suspensi sel ($\pm 1,6$ ml) ditambah 0,4 ml TCA 75% (b/v) dan campurkan dengan vorteks. Setelah itu, ditambahkan 0,75 ml TBA 0,67% (b/v) dicampurkan dengan vorteks, ditutup rapat dan dipanaskan dalam penangas air dengan temperatur 95°C selama 1 jam, lalu didinginkan dalam suhu ruang. Setelah dingin, sebanyak + 1,5 ml campuran dimasukkan ke dalam mikrotube 2 ml lalu disentrifus pada 8.200 G selama 5 menit, supernatannya diambil sebanyak 0,9 ml kemudian masing-masing larutan tersebut disaring dengan penyaring Whatman 0,45 μ m dan diukur dengan HPLC dengan panjang gelombang 532 nm.

Konsentrasi MDA ditentukan dengan membandingkan luas area terhadap kurva standar dan hasilnya dinyatakan dalam satuan konsentrasi nM MDA/ 10^6 CFU. Spesifikasi HPLC yang digunakan yaitu HPLC shim-pack CLC – Kolom C8, ukuran kolom 6.0 mm ID x 150 mm, detektor UV-VIS panjang gelombang 532 nm, detektor seri SPD-20AV, fase gerak potasium fosfat (0,025 mol/l, pH 6,2) dan metanol dengan perbandingan 58% : 42% (v/v). Waktu alirnya yaitu 0,8 ml/menit. Larutan bufer potasium fosfat dibuat dengan cara melarutkan 3,4 g KH_2PO_4 dengan 800 ml air akuabides steril dan ditepatkan pHnya dengan pH meter sampai 6,2. Larutan bufer ditambah volumenya sampai 1 l dengan akuabides steril. Larutan fase gerak dan sampel disaring menggunakan penyaring Whatman 0.45 μ m.

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu metode rancangan acak lengkap (RAL). Analisis data dilakukan dengan peranti lunak SPSS 14.0 *for Windows Evaluation Version* metode ANOVA. Jika pengaruh perlakuan berbeda nyata dilakukan analisis lanjut dengan uji Duncan, selang kepercayaan 95%.¹⁴

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Uji Fitokimia Daging Buah Salak Bongkok

Bagian salak yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging buah berbentuk simplisia kering. Daging buah salak yang sudah dalam bentuk serbuk simplisia kering diekstrak dengan metode maserasi. Kelebihan metode maserasi yaitu sederhana dan dapat mengekstrak senyawa aktif dalam tanaman yang relatif kurang tahan terhadap panas.¹⁵

Rendemen hasil ekstraksi daging salak muda sebesar 41,67% lebih kecil dibandingkan salak tua sebesar 56,67%. Perbedaan ini disebabkan kadar air yang lebih besar pada daging buah salak tua dibandingkan daging buah salak muda. Kadar air yang tinggi dapat melarutkan senyawa-senyawa larut air seperti karbohidrat, resin, dan gum sehingga senyawa ini ikut terekstrak.¹⁶ Jumlah rendemen hasil ekstraksi juga dipengaruhi oleh perbandingan bahan dan jumlah pelarut.

Hasil penapisan fitokimia secara kualitatif dengan metode Harborne¹² yang telah dimodifikasi menunjukkan senyawa aktif dalam ekstrak muda tidak menghasilkan uji positif untuk flavonoid dan senyawa fenolik (Tabel 3). Hal ini diduga kadarnya sangat sedikit sehingga tidak

Tabel 3. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daging Buah Salak Bongkok

Uji	Hasil	
	Ekstrak Salak Muda	Ekstrak Salak Tua
Alkaloid	++	+++
Saponin	++	++
Flavonoid	-	+
Fenolik	-	+
Tanin	+++	+++

Keterangan: (-) : tidak terdeteksi, (+) : intensitas reaksi positif

Alkaloid: Sedikit endapan (+) – banyak endapan (+++), Saponin: sedikit busa (+) – banyak busa (+++), Flavonoid: merah (+) – merah tua (+++), Fenolik: merah (+) – merah tua (+++), Tanin: hijau (+) – hijau kehitaman (+++)

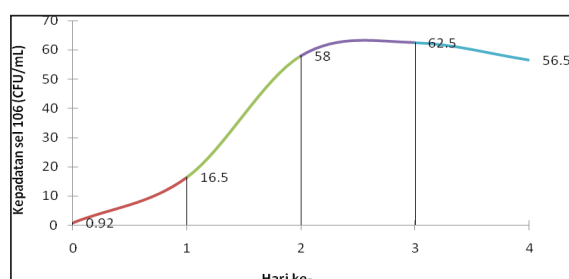
terukur pada pengukuran secara kualitatif. Seperti halnya penelitian Sahputra,¹³ ekstrak daging buah salak muda varietas kalimantan dan pondoh memiliki kadar flavonoid yang sedikit.

Mekanisme penghambatan peroksidasi lipid oleh ekstrak salak bongkok diperkirakan karena adanya senyawa saponin, flavonoid, alkaloid, fenolik, dan tanin yang berperan sebagai antioksidan. Antioksidan flavonoid berfungsi sebagai pencegahan radikal bebas dengan mendonorkan hidrogen yang akan menghasilkan radikal flavonoid. Saponin digunakan sebagai antikanker, antitumor, antiperadangan, antivirus, antidiabetes, dan antifungal.¹⁷ Larson¹⁸ melaporkan bahwa senyawa fenolik memegang peranan penting dalam mencegah secara preventif kerusakan hati, kanker, dan kerusakan akibat proses penuaan.

Kurva Pertumbuhan Sel Khamir *Candida* sp. Y390

Pengukuran jumlah sel khamir *Candida* sp. Y390 dilakukan untuk melihat populasi yang tumbuh dan waktu inkubasi biakan khamir mulai mengalami fase stasioner. Rataan total sel khamir yang tumbuh yaitu sebesar $48,6 \times 10^6$ CFU/ml.

Sel khamir mengalami beberapa fase tumbuh berdasarkan kurva pertumbuhannya, yaitu fase lag, log, shift diauksik, post-diauksik, dan stationer. Fase lag sebagai awal pertumbuhan khamir secara eksponensial. Lama dan pola fase ini dipengaruhi oleh strain khamir, umur sel khamir dalam stok awal, dan komposisi médium tumbuhnya. Sel khamir mulai melakukan adaptasi dan mempersiapkan diri untuk melakukan pembelahan. Fase lag terjadi mulai hari ke-0 sampai hari kesatu (Gambar 1).



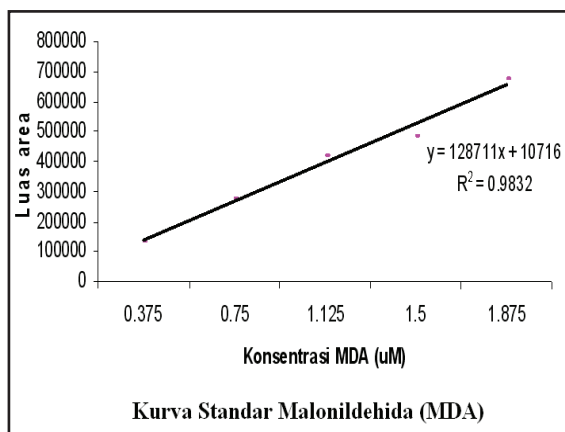
Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Sel Khamir *Candida* sp. Y390

Setelah itu, sel khamir akan mengalami fase log. Lama fase log dipengaruhi oleh komposisi medium, suhu, dan jumlah sel per unit volume. Fase log terjadi mulai hari kesatu sampai hari kedua. Peningkatan jumlah sel pada fase ini sangat cepat dengan penggunaan nutrisi yang semakin banyak. Sel khamir akan mengalami fase shift diauksik (fase sesaat sebelum fase stasioner) dan fase stasioner mulai hari kedua sampai hari ketiga. Pada fase tersebut proses fermentasi mulai berkurang dengan habisnya glukosa dan berlanjut ke proses respirasi. Populasi sel akan meningkat sedikit dan akan relatif stabil sampai fase stasioner. Pada fase stasioner, sel khamir akan menyekresikan metabolit sekunder untuk mempertahankan diri dari stres oksidatif akibat akumulasi produk metabolisme yang bersifat toksik.¹⁹

Hasil uji Duncan memperlihatkan bahwa populasi hari kedua, ketiga, dan keempat memiliki perbedaan yang tidak signifikan pada selang kepercayaan 0,05. Oleh karena itu, sel khamir akan diinkubasi selama dua hari (fase stasioner) sebelum diberi perlakuan stres oksidatif oleh parasetamol dan diukur konsentrasi lipid peroksidasinya. Pengukuran peroksidasi lipid dilakukan pada awal fase stasioner karena fase tersebut proses metabolisme sel mulai menurun sehingga hasil pengukuran peroksidasi lipid tidak dipengaruhi oleh aktivitas metabolisme laju pertumbuhan sel khamir.⁷

Kurva Standar 1,1,3,3 Tetra Metoksi Propana (TMP)

Konsentrasi MDA diukur berdasarkan kurva standar kompleks TMP-(TBA)₂. TMP digunakan sebagai pengganti MDA karena memiliki struktur yang mirip dan lebih stabil dibandingkan MDA murni sebagai hasil akhir peroksidasi lipid.^{20,7} Prinsip kurva standar TMP yaitu semakin tinggi konsentrasi kompleks TMP-(TBA)₂ maka semakin tinggi jumlah lipid yang teroksidasi yaitu senyawa TMP. Persamaan kurva standar TMP yang didapatkan yaitu $y = 128711x + 10716$; $R^2 = 0.9832$ (Gambar 2). Nilai Regresi linear (R^2) persamaannya sedikit lebih besar dari hasil penelitian yang sudah dilakukan oleh Lykkesfeldt²⁰ dengan nilai R^2 yaitu 0,96.

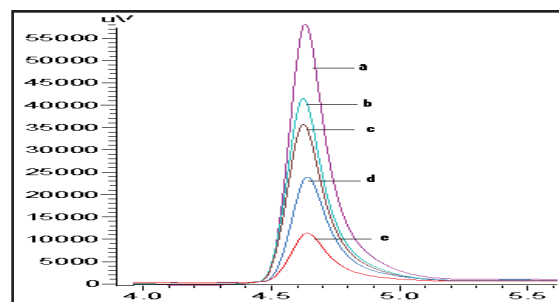


Gambar 2. Kurva Standar MDA

Waktu retensi kompleks TMP-(TBA)₂ mempunyai rentang waktu antara menit ke- 04,45 sampai menit ke- 05,02. Luas area dan waktu retensi setiap puncak kromatogram dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu konsentrasi dan pH fase gerak, laju alir sampel setiap menit, proses penyaringan sampel dan fase gerak, serta kondisi kolom HPLC.²¹ Gambar 3 menunjukkan bahwa konsentrasi kompleks TMP-(TBA)₂ akan berpengaruh terhadap luas area kromatogram dengan waktu retensi yang sama. Semakin kecil konsentrasinya bentuk puncak kromatogramnya semakin runcing dan menyempit (garis a).

Aktivitas Antioksidasi Ekstrak Daging Buah Salak Bongkok

Ekstrak daging buah salak bongkok umur tua dengan konsentrasi 200 ppm dipilih untuk uji aktivitas antioksidan. Hal ini disebabkan kandungan senyawa aktif dalam ekstrak salak tua lebih banyak menghasilkan nilai uji positif kandungan senyawa fitokimianya dibandingkan ekstrak salak muda. Selain itu, berdasarkan uji lanjut konsentrasi 200 ppm tidak berbeda nyata dengan konsentrasi ekstrak 50 ppm dan 100 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak 200 ppm dengan pengenceran yang tidak terlalu besar dapat menghasilkan aktivitas antioksidasi yang tidak berbeda nyata dengan pengenceran 100 ppm dan 50 ppm. Aktivitas senyawa aktif dengan pengenceran sangat besar untuk konsentrasi 50 ppm dan 100 ppm menghasilkan pengukuran lipid peroksida yang tidak stabil. Hal ini dikarenakan banyak faktor yang mempengaruhi selama proses



Gambar 3. Kromatogram pengukuran kompleks TMP-(TBA)₂ dengan HPLC (a=konsentrasi std 10 µL, b= konsentrasi std 20 µL, c= konsentrasi std 30 µL, d= konsentrasi std 40 µL, dan e= konsentrasi std 50 µL)

pengukuran, seperti penguapan senyawa selama pemanasan, aktivitas senyawa yang sangat kecil, dan pengaruh akurasi alat sampai pengenceran sangat kecil.

Berdasarkan hasil uji statistik pada taraf kepercayaan 0,05, pemberian parasetamol 0,3% dalam campuran menaikkan konsentrasi lipid peroksida yang signifikan dibandingkan kontrol normal dan perlakuan yang lain (Gambar 4). Konsentrasi lipid peroksida sel yang diberi vitamin C 0,225 mg/ml dan kontrol normal tidak saling berbeda nyata, tetapi berbeda nyata dengan sel khamir yang diberi ekstrak salak dan parasetamol 0,3% dan vitamin C 0,225 mg/ml dan parasetamol 0,3%.

Konsentrasi lipid peroksida sel khamir yang diberi ekstrak salak 200 ppm tidak berbeda nyata dengan sel khamir yang diberi ekstrak salak dan parasetamol 0,3%, vitamin C 0,225 mg/ml dan parasetamol 0,3%, dan vitamin C 0,225 mg/ml. Adanya kenaikan yang cukup besar pada penambahan parasetamol 0,3% memperkuat hasil penelitian Risnawati¹⁵ bahwa pemberian parasetamol 0,3% memberikan efek stres oksidatif yang signifikan, namun tidak mematikan sel khamir dibandingkan dengan pemberian parasetamol konsentrasi 0,2% dan 0,1% .

Ekstrak salak 200 ppm dan vitamin C 0,225 mg/ml menaikkan konsentrasi lipid peroksida dibandingkan kontrol normal sebesar 41,70% dan 23,99%. Berdasarkan uji lanjut pada taraf kepercayaan 0,05, kenaikan lipid peroksida oleh ekstrak salak 200 ppm dan vitamin C 0,225 mg/ml tidak berbeda nyata secara signifikan dengan

kontrol normal sehingga adanya kenaikan lipid peroksida bukan disebabkan sebagai aktivitas prooksidasi tetapi sebagai respons normal sel khamir terhadap senyawa asing. Meskipun demikian, sifat prooksidan ekstrak salak tidak terlalu berbahaya jika dibandingkan vitamin C karena sifat senyawa flavonoid pada ekstrak salak cenderung menstabilkan radikal hidroksil dengan cara memberikan atom hidrogen kepada radikal bebas membentuk senyawa stabil.²² Adanya kenaikan konsentrasi lipid peroksida sel khamir yang diberi vitamin C 0,225 mg/ml sama seperti yang dilaporkan oleh Yomes²³ bahwa vitamin C 0,225 mg/ml dapat menimbulkan stres oksidatif pada suspensi sel khamir yaitu sebesar 18,48%. Kenaikan peroksidasi lipid yang diberi parasetamol dan ekstrak salak secara bersamaan dapat menaikkan konsentrasi lipid peroksida dibanding kontrol normal, namun masih di bawah kenaikan konsentrasi yang disebabkan oleh parasetamol 0,3%.

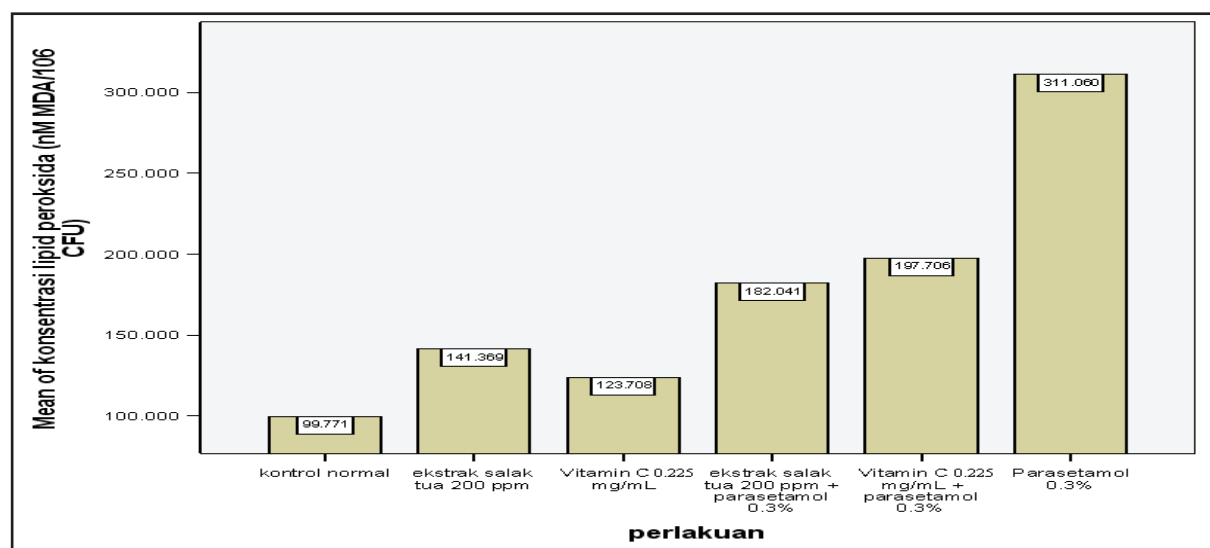
Penghambatan peroksidasi lipid oleh ekstrak salak berbeda nyata dibandingkan kontrol positif yaitu sebesar 61,06%. Mekanisme penghambatan peroksidasi lipid oleh ekstrak salak yaitu adanya gugus hidroksil bersifat reduktor yang akan mendonorkan hidrogen untuk senyawa *Nasetil-p-benzokuinonimin* (NAPQI) dan metabolit elektrofilik. Flavonoid dan saponin berperan dalam menangkap radikal lipid peroksil, oksigen tunggal, radikal hidroksil, dan anion superoksida yang

tergantung pada ion logam, Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan atau prooksidan bergantung pada potensial redoks lingkungan biologi sel, ketersediaan ion logam, dan konsentrasi flavonoid. Senyawa NAPQI dan metabolit elektrofilik yang sudah terikat oleh senyawa aktif dalam ekstrak salak akan stabil sehingga tidak akan menyerang lipid membran atau protein membran.

Pemberian parasetamol 0,3% dan vitamin C 0,225 mg/ml secara bersamaan dapat menaikkan konsentrasi lipid peroksida dibandingkan kontrol normal. Namun, masih di bawah kenaikan konsentrasi lipid peroksida yang diberi parasetamol 0,3%. Hasil ini menunjukkan ada penghambatan peroksidasi lipid pada sel khamir sebesar 53,65%. Berdasarkan hasil yang didapatkan, penghambatan peroksidasi lipid pada sel khamir lebih tinggi dilakukan oleh ekstrak salak 200 ppm dibandingkan vitamin C 0,225 mg/ml. Hal ini diduga karena adanya beberapa senyawa aktif dalam ekstrak yang berperan lebih besar dalam menetralkan aktivitas radikal bebas akibat metabolisme parasetamol dibandingkan vitamin C.

KESIMPULAN

Ekstrak daging buah salak bongkok mengandung senyawa aktif senyawa fenolik, alkaloid, saponin, flavonoid, dan tanin. Konsentrasi ekstrak salak tua 200 ppm dapat menghambat peroksidasi lipid sel khamir yang diberi parasetamol 0,3%



Gambar 4. Grafik konsentrasi lipid peroksida suspensi sel khamir yang diberi perlakuan.

lebih tinggi yaitu sebesar 61,06% dibandingkan vitamin C 0,225 mg/ml yaitu sebesar 53,65%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Anna P. Roswiem, Bapak Eman Kustaman dan Bapak Heddy Julistiono yang membantu selama penelitian. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Tarzan Sembiring yang telah membimbing dalam penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Hsu C.Y., Y.P. Chan, J. Chang. 2007. Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biol Res*, 40: 13–21
- ²Risnawati A. 2007. *Efek pro-oksidasi dan anti-oksidasi teh hijau (camellia sinensis) pada khamir Candida sp. Y390 yang diperlakukan dengan parasetamol berdasarkan peroksidasi lipid*. Skripsi. FMIPA ISTN, Jakarta.
- ³Manon S. 2004. Utilization of yeast to investigate the role of lipid oxidation in cell death. *Antiox redox signal*, 6: 259–267.
- ⁴Moradas F.P., V. Costa, P. Piper, W. Mager. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol Microbiol*, 19: 651–658.
- ⁵Barnet J.A., R.W. Payne, D. Yarrow. 1982. *Yeast : Characteristic and Identification*. Ed. Ke-3. Chambridge : United Kingdom Univ.
- ⁶Badan Pengembangan Pembangunan Nasional. 2000. Salak (*Salacca edulis* Reinw.) www.ristek.go.id, diakses tanggal 5 Maret 2008.
- ⁷Priyatno L.H.A., S. Ibrahim, IK. Adnyana, E.Y. Sukandar. 2006. Aktivitas antioksidan ekstrak daging buah salak varietas Bongkok (*Salacca edulis* Reinw.). *Acta Phar Indonesia*, 1: 24–27.
- ⁸Tukozkan N., H. Erdamar, I. Seven. 2006. Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissue by high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid assay. *Firat tip Dergisi*, 11 : 88–92.
- ⁹Ohkawa H., N. Ohishi, K. Yagi. 1978. Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *J Lipid Res*, 19: 1053–1057.
- ¹⁰Berneheim F., M.L.C. Berneheim, K.M. Wilbur. 1948. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation product of certain lipids. *J Biol chem*, 174 : 257–264.
- ¹¹Wilbur K.M., F. Bernheim, O.W. Shapiro. 1949. The thiobarbituric acid reagent as a test for oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Arch Biochem*, 24: 305–313.
- ¹²Harbone J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah; Niksolihin S, Editor. Bandung : ITB Press. Terjemahan dari : *Phytochemical Methode*.
- ¹³Li. K., X. Shang, Y. Chen. 2004. High performance liquid chromatography detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility. *Clin Chim Acta*, 340 : 199–203.
- ¹⁴Mattjik A.A. 2002. *Rancangan Percobaan*. Bogor, IPB Pr.
- ¹⁵Alawiah L. 2007. *Ekstrak etanol rumput mutiara (Hedyotis corymbosa (L.) Lam.) sebagai antihepatotoksik pada tikus putih yang diinduksi parasetamol*. Skripsi. FMIPA IPB, Bogor.
- ¹⁶Sahputra F.M. 2008. *Potensi ekstrak kulit dan daging buah salak sebagai antidiabetik*. Skripsi. FMIPA IPB, Bogor.
- ¹⁷Hariyatmi. 2004. Kemampuan Vitamin E sebagai antioksidan terhadap radikal bebas pada lanjut usia. *MIPA*, 1: 52–60.
- ¹⁸Larson R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27: 969–978.
- ¹⁹Lisnawati Y. 2004. *Aktivitas antioksidan Vitamin C dan teh hijau berdasarkan resistensi etanol pada sel khamir Candida sp*. Skripsi. FMIPA IPB, Bogor.
- ²⁰Lykkesfeldt J. 2001. Determination of malondialdehyde as thiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection : comparison with ultraviolet visible spectrophotometry. *Clin Chem*, 47: 1725–1727.
- ²¹Carbonneau M.A., E. Peuchant, D.P. Canioni, M. Clerc. 1991. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin Chem*, 37 (8) : 1423–1429.
- ²²Cotelle N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Med Chem*, 1: 569–590.
- ²³Yomes T. 2000. *Sifat prooksidan dan antioksidan vitamin C dan teh hijau pada sel Khamir Candida sp. Y390 berdasarkan peroksidasi lipid*. Skripsi. FMIPA IPB, Bogor.