

**AKTIVITAS PENANGKAPAN RADIKAL EKSTRAK ETANOL DAUN
LEMPUYANG EMPRIT (*Zingiber amaricans* Bl.) DAN FRAKSI-
FRAKSINYA DENGAN METODE DPPH SERTA PENETAPAN
KADAR FENOLIK TOTALNYA**

NASKAH PUBLIKASI



Oleh:

**MISS AFNAN MADENG
K100100130**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2015**

PENGESAHAN NASKAH PUBLIKASI

Berjudul:
AKTIVITAS PENANGKAPAN RADIKAL EKSTRAK ETANOL DAUN
LEMPUYANG EMPRIT (*Zingiber amaricans* Bl.) DAN FRAKSI-
FRAKSINYA DENGAN METODE DPPH SERTA PENETAPAN
KADAR FENOLIK TOTALNYA

Oleh:
MISS AFNAN MADENG
K100100130

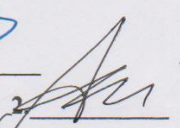
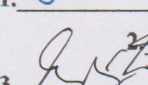
Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
Pada tanggal : 18 Desember 2014

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Dekan,


Azis Saifudin, Ph.D., Apt.

Penguji:

1. Broto Santoso, M.Sc., Apt
2. Azis Saifudin, Ph.D., Apt
3. Dedi Hanwar, M.Si., Apt

1. 
2. 
3. 

**AKTIVITAS PENANGKAPAN RADIKAL EKSTRAK ETANOL DAUN
LEMPUYANG EMPRIT (*Zingiber amaricans* Bl.) DAN FRAKSI-FRAKSINYA
DENGAN METODE DPPH SERTA PENETAPAN KADAR FENOLIK
TOTALNYA**

***RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF ETANOLIC EXTRAC AND FRACTIONS
OF LEMPUYANG EMPRIT (*Zingiber amaricans* Bl.) LEAVES BY DPPH METHOD
AND DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT***

Miss. Afnan Madeng[#], Dedi Hanwar

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jalan Ahmad Yani Tromol Pos I, Pabelan Kartasura, Surakarta 57102
Email: afnan.rx@gmail.com

ABSTRAK

Zerumbon merupakan salah satu kandungan kimia yang ada didalam tanaman alam, senyawa ini berfungsi sebagai agen kemopreventif melawan kanker usus besar dan kanker kulit, sebagai anti proliferasi dan menginduksi apoptosis. Zerumbon merupakan konstituen utama yang terdapat dalam lempuyang emprit. Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas penangkapan radikal serta penetapan kadar fenolik total pada ekstrak etanol daun lempuyang emprit dan fraksi-fraksinya. Ekstrak diperoleh dari metode maserasi dengan pelarut etanol. Ekstrak difraksinasi dengan metode sonikasi menggunakan 3 pelarut yaitu: n-heksan, etil asetat dan etanol. Ekstrak dan hasil fraksinasi dilakukan uji aktivitas penangkapan radikal dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil) serta penetapan kadar fenolik total menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Hasil penelitian menunjukkan kadar fenolik total (GAE) yang diperoleh berturut-turut adalah 38,51 mg/g, 17,83 mg/g, 38,51 mg/g, dan 20,78 mg/g. Aktivitas penangkapan radikal dengan nilai IC₅₀ pada ekstrak sebesar 398,85 µg/mL, fraksi n-heksan 485,23 µg/mL, fraksi etil asetat 412,45 µg/mL dan fraksi etanol 494,65 µg/mL. Zerumbon merupakan kandungan kimia yang terbesar dalam lempuyang emprit dan bukan golongan fenolik, sehingga kandungan fenolik total yang didapat kecil, dan ini ditunjukkan aktivitas penangkapan radikal semua fraksi sama.

Kata kunci : Lempuyang emprit (*Zingiber americans* Bl), penangkapan radikal, fenolik, DPPH.

ABSTRACT

Zerumbon is one of the chemical constituents present in natural plants, these compounds act as a chemopreventive agent against colon cancer and skin cancer, as an anti-proliferation and induce apoptosis. Zerumbon is the main constituent contained in lempuyang emprit. This study aims to the radical scavenging activity and determine total phenolic content assay on ethanol extract of Zingiber amaricans leaves and fractions. The extract obtained from the maceration method by ethanol. The extract was fractionated by sonication method using three solvents, namely: n-hexane, ethyl acetate and ethanol. Extract and test results of fractionation radical scavenging activity by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method and the determination of total phenolic content by Folin-Ciocalteu method. The results showed the total phenolic content (GAE) obtained are

respectively 38.51 mg / g, 17.83 mg / g, 38.51 mg / g, and 20.78 mg / g. Radical scavenging activity with IC₅₀ values in the extract of 398.85 mg / mL, n-hexane fraction of 485.23 mg / mL, ethyl acetate fraction of 412.45 mg / mL and fractions of ethanol 494.65 mg / mL. Zerumbon is the largest chemical constituents in lempuyang emprit and not the phenolic group, so that the total phenolic content were obtained small, and this is indicated radical scavenging activity of all fractions together.

Keywords: *Lempuyang emprit (Zingiber americans Bl), Radical scavenging, phenolic, DPPH.*

PENDAHULUAN

Suatu atom atau gugus atom memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan sehingga bersifat sangat reaktif dapat disebutkan radikal bebas dinyatakan oleh Fessenden dan Fressenden (1986). Senyawa kimia ini diduga sebagai penyebab kerusakan sel yang mendasari timbulnya berbagai penyakit seperti kanker, jantung koroner, rematik arthritis, serta berperan utama pada proses penuaan dini. Senyawa radikal penyebab penyakit tersebut dapat dicegah oleh adanya senyawa antiradikal. Produk samping proses metabolisme dapat terbentuk dari radikal bebas dalam tubuh, selain itu dapat berasal dari luar tubuh yang terserap melalui pernafasan atau kulit (Bast *et al.*, 1991).

Zerumbon adalah suatu senyawa sesquiterpen yang memiliki struktur yang unik terdiri dari 11 atom karbon dengan gugus keton, kandungan sesquiterpennya berkhasiat sebagai antioksidan yang berfungsi mencegah kerusakan gen. Minyak atsiri merupakan suatu kandungan yang terdapat dalam lempuyang emprit, minyak atsiri yang terdiri dari senyawa terpenoid berpotensi sebagai antioksidan. Menurut Wahyuni dan Bermawie (2010) zerumbon merupakan sesquiterpen yang berfungsi sebagai agen kemopreventif melawan kanker usus besar dan kanker kulit, sebagai anti proliferasi dan menginduksi apoptosis.

Golongan senyawa monoterpen hidrokarbon memiliki aktivitas yang tinggi karena dipengaruhi oleh metilen aktif seperti α -pinene dan β -pinene. Sesquiterpen hidrokarbon seperti transcaryophyllen dan α -humulene mempunyai aktivitas rendah, sesquiterpen teroksigenasi seperti linalol justru berpotensi sebagai pro-oksidan yang membentuk radikal baru yang lebih kuat. (Halimah dan Zetra, 2011).

Muklas (2013) menemukan kadar zerumbon ekstrak etanol rimpang lempuyang emprit sebesar 31,07% b/b. Penelitian Wicaksono (2013) telah menemukan bahwa daun lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* Sm.) memiliki aktivitas penangkapan radikal yang lemah dengan nilai IC₅₀ yang diperoleh menggunakan alat *Elisa Reader* 255,35 ($\pm$ 7,30) μ g/mL dan dengan menggunakan spektrofotometri 228,49 ($\pm$ 18,97) μ g/mL. Aktivitas

penangkapan radikal daun lempuyang emprit belum diteliti, oleh karena lempuyang emprit dan lempuyang gajah mempunyai karakteristik yang hamper sama, beberapa kandungan kimia yang sama dan kedua tanaman ini termasuk dalam suku yang sama yaitu Zingiberaceae.

METODE PENELITIAN

Bahan

Daun lempuyang emprit dari Merapi Farma Yogyakarta, DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), etanol p.a, etanol 96%, aquades, *Folin Ciocalteu*, Na karbonat, asam galat, Vitamin E, n-heksan, etil asetat.

Alat

Spektrofotometer UV-Vis (UV Mini SHIMADZU), corong bunchner, *vaccum rotary evaporator*, *waterbath*, kuvet, vortex, pipet volume, mikropipet, neraca analitik, dan oven.

Jalan Penelitian

A. Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 1 kg serbuk kering daun lempuyang emprit ditambah 10 L etanol 96% dicampur homogen sambil sekali diaduk. Campuran didiamkan selama 72 jam dan selanjutnya filtrat disaring menggunakan corong *Buchner* dan diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dan diuapkan kembali di *waterbath* untuk menghilangkan sisa penyarinya hingga diperoleh ekstrak kental. Setelah maserasi pertama dilakukan remaserasi kembali dengan pelarut yang sama.

B. Fraksinasi

Timbang 3 g ekstrak etanol daun lempuyang emprit kemudian disonikasi 7 kali dengan menggunakan pelarut n-heksan selama 10 menit hingga diperoleh fraksi n-heksan. Ampas disaring kembali dengan 5 kali menggunakan etil asetat hingga diperoleh fraksi etil asetat. Selanjutnya ampas disaring kembali menggunakan etanol 96% dengan 3 kali hingga diperoleh fraksi etanol. Masing-masing fraksi dipekatkan menggunakan *evaporator*. Fraksinasi diulang sebanyak 3 kali.

C. Penentuan aktivitas antioksidan metode DPPH

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun lempuyang emprit ditentukan dengan metode DPPH. Sebanyak 1,0 mL ekstrak dan fraksi-fraksinya dengan berbagai konsentrasi (2, 4, 6, 8, dan 10 ppm) ditambah 1,0 mL DPPH 0,4 μ M. Kemudian larutan ini diinkubasi 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Larutan ini selanjutnya diukur

absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan vitamin E.

D. Penetapan kadar fenolik total

1. Kurva baku asam galat

Penentuan kurva baku dilakukan dengan mengambil larutan standar asam galat 0,04% dengan konsentrasi yang berbeda (40,0 µl; 60,0 µl; 80,0 µl; 100,0 µl; 120,0 µl; 140,0 µl dan 160,0 µl) Selanjutnya seri konsentrasi tersebut dibaca absorbansinya pada λ_{maks} . Penentuan dilakukan dengan 3 kali replikasi.

2. Penetapan kadar fenolik total

Larutan ekstrak 0,2% dengan konsentrasi 100 µg/mL ditambah dengan 7,5 mL aquades dan 0,5 mL reagen *Folin Ciocalteu* dicampur dalam labu takar, diamkan pada suhu ruangan selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 1,5 mL Na karbonat 7% ditambah aquades sampai tanda pada labu takar 10 mL. Jika sudah tercampur semua, didiamkan selama 84 menit. Absorbansi diukur pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 750 nm. Kandungan total fenolat dinyatakan dalam GAE (*gallic acid equivalent*) per gram ekstrak. Standar kurva dipersiapkan menggunakan asam galat pada 7 konsentrasi yang berbeda (1.6 µg/mL; 2.4 µg/mL; 3.2 µg/mL; 4.0 µg/mL; 4.8 µg/mL; 5.6 µg/mL dan 6.4 µg/mL).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi diperoleh ekstrak kental sebanyak 30,32 g yang berwarna gelap cenderung hitam sedikit kehijauan dari daun lempuyang emprit kering sebanyak 256,27 g dengan rendemen 11,83% b/b, ekstrak kental agak susah dituang. Pelarut yang digunakan pada proses penyarian adalah etanol 96%. Etanol dipilih sebagai penyari karena dapat melarutkan hampir seluruh dari komponen atau kandungan senyawa dari tanaman seperti senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, steroid, antrakinon, damar, dan klorofil, sedangkan lemak, malam, saponin, tannin, hanya sedikit larut dalam etanol 96%.

B. Fraksinasi

Hasil fraksinasi yang menggunakan metode sonikasi diperoleh 3 fraksi dengan pelarut yang berbeda. Fraksi n-heksan (non polar) diperoleh larutan warna hijau kehitaman. Hasil penguapan fraksi ini diperoleh fraksi kental sebanyak 957,43 mg (rendemen 31,91% b/b.) dari larutan fraksi 55 mL. Fraksi etil asetat (semipolar) didapatkan

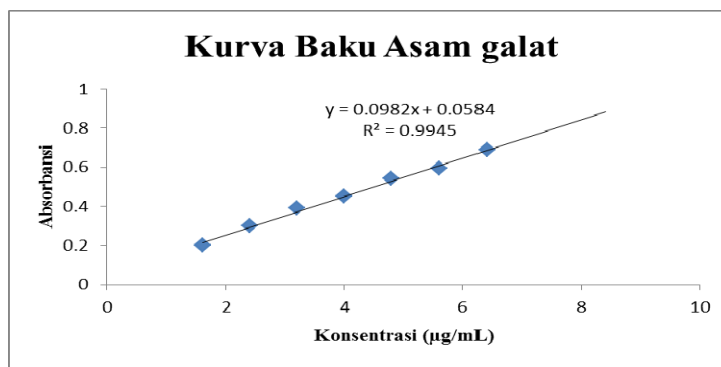
larutan 42 mL, berwarna hijau muda dan setelah dipekatkan diperoleh fraksi kental sebesar 39,19 mg dengan rendemen 1,31% b/b. Terakhir fraksi etanol (polar) memiliki volume 38 mL, berwarna hijau kecolatan, dengan rendemen yang diperoleh sebesar 26,48% b/b. dan berat fraksi kental 805,19 mg.

C. Penetapan Kadar Fenolik Total

Kandungan fenolik total ditentukan dengan menggunakan pereaksi *Folin-Ciocalteu*. Mekanisme dari metode ini berdasarkan kekuatan mereduksi dari gugus hidroksi fenolik. Adanya inti aromatis pada senyawa fenol (gugus hidroksi fenolik) dapat mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat menjadi molibdenum yang berwarna biru (Sudjadi dan Rohman, 2004).

Semua fenolik termasuk fenol sederhana dapat bereaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu* (Huang *et al.*, 2005). Kandungan fenolik total ditetapkan dengan kurva baku asam galat. Kandungan fenolik dalam tumbuhan dinyatakan dalam GAE (*gallic acid equivalent*) yaitu jumlah kesetaraan milligram asam galat dalam 1 gram sampel (Lee *et al.*, 2003).

Hasil penetapan kadar fenolik total berdasarkan kurva baku diperoleh dari pembacaan absorbansi asam galat pada konsentrasi 1,6 µg/mL – 6,4 µg/mL, sehingga terdapat persamaan regresi kurva baku asam galat $Y = 0,0982X + 0,0584$ dengan R^2 sebesar 0,9945 melalui persamaan tersebut dapat ditentukan kandungan senyawa fenolik dari nilai absorbansi yang diperoleh dari pembacaan spektrofotometer.



Gambar 1. Kurva baku asam galat

Hasil penelitian kandungan fenolik total yang ditentukan dengan menggunakan pereaksi *Folin-Ciocalteu* hasil yang diperoleh sebagai berikut pada tabel 1 :

Tabel 1. Kadar fenolik total (GAE) tiap 10 mg sampel

Sampel	Rerata GAE(mg/g) ± SD
Ekstrak	38,516 ± 1,956
Fraksi n- heksan	17,835 ± 1,728
Fraksi etil asetat	52,721 ± 1,467
Fraksi etanol	21,782 ± 0,417

Hasil penetapan kadar fenolik (tabel 1) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki senyawa fenolik lebih besar dibandingkan sampel ekstrak dan fraksi lain, hal ini dikarenakan senyawa yang terkandung dalam daun lempuyang emprit memiliki sifat semipolar yang efektif tertarik pada fraksi etil asetat yang memiliki sifat semipolar.

D. Penentuan Aktivitas Penangkapan Radikal Dengan Metode DPPH

Aktivitas penangkapan radikal ditentukan dari kemampuan senyawa yang terdapat dalam ekstrak untuk menurunkan intensitas warna ungu senyawa radikal DPPH pada panjang gelombang maksimum (Rohman dan Riyanto, 2006). Penurunan intensitas warna ungu DPPH disebabkan oleh berkurangnya kromofor atau ikatan rangkap terkonjugasi pada senyawa DPPH, yang disebabkan oleh adanya ekstrak sebagai penangkapan radikal akan mendonorkan atom H pada DPPH menjadi tereduksi yang menjadi berwarna kuning (Huang *et al.*, 2005). Parameter yang digunakan untuk menentukan aktivitas penangkap radikal adalah IC_{50} (*Inhibitory Concentration*).

Inhibitory Concentration adalah konsentrasi substrat yang memberikan % aktivitas penangkapan radikal sebesar 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linier antara kadar terhadap % penangkapan radikal (Rohman dan Riyanto, 2006). Aktivitas penangkapan radikal pada daun lempuyang emprit diperoleh nilai IC_{50} yang dapat terlihat pada tabel 2:

Tabel 2. Nilai IC_{50} dari Ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, fraksi etanol, dan vitamin E (pembanding)

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Persamaan ($y = bx+a$)	R^2
Ekstrak	389,83	$Y = 0,1647X - 15,69$	0,965
Fraksi n- heksan	485,23	$Y = 0,0810X + 9,543$	0,991
Fraksi etil asetat	412,45	$Y = 0,1120X + 4,086$	0,988
Fraksi etanol	494,51	$Y = 0,0682X + 15,68$	0,974
Vitamin E	6,488	$Y = 8,1100X - 2,621$	0,985

Hasil uji aktivitas penangkapan radikal daun lempuyang emprit ekstrak dan semua fraksi (tabel 2) menunjukkan nilai IC_{50} atas dari 200 $\mu\text{g/mL}$. sehingga dapat disimpulkan bahwa daun lempuyang emprit memiliki aktivitas penangkapan radikal tidak aktif (lebih dari 200 $\mu\text{g/mL}$). Kandungan utama lempuyang emprit adalah zerumbon (yaitu suatu sesquiterpen). Zerumbon yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi daun lempuyang emprit tidak bersifat penangkapan radikal, selain itu hasil fenolik yang terdapat kecil, sehingga tidak berkorelasi dengan nilai IC_{50} .

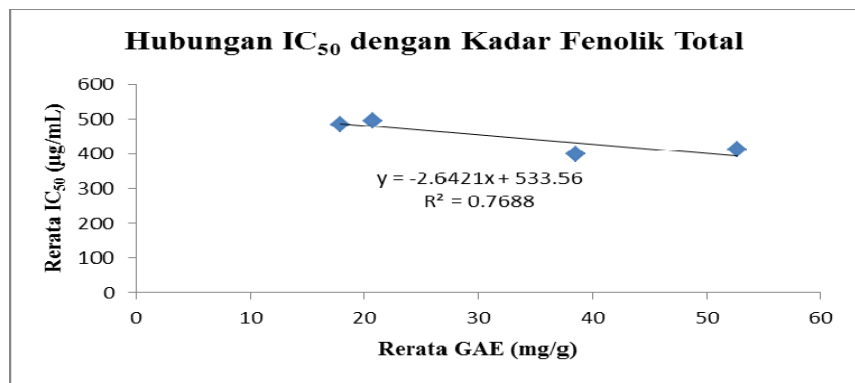
E. Hubungan Antara Aktivitas Pengakapan Radikal dengan Kadar Fenolik Total

Senyawa fenolik telah diketahui mempunyai aktivitas antioksidan, maka dari itu perlu dilakukan penetapan kadar fenolik total untuk mengetahui korelasi antara aktivitas antioksidan dan kadar fenolik total. Korelasi kadar fenolik dengan aktivitas antioksidan

yang terdapat dalam sampel, diketahui dari koefisien korelasi (R^2) persamaan regresi linier antara aktivitas antioksidan dengan kadar fenolik totalnya.

Tabel 3. Kolerasi antara aktivitas antioksidan (IC_{50}) dengan kadar fenolik total (GAE)

No.	Sampel	Rerata IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata GAE (mg/g)	
1	Ekstrak	398,85	38,51	$A = -2,6421$
2	Fraksi n-heksan	485,23	17,83	$B = 533,56$
3	Fraksi etil asetat	412,45	52,72	$R^2 = 0,7688$
4	Fraksi etanol	494,65	20,78	



Gambar 2. . Kurva hubungan IC_{50} dan kadra fenolik total

Berdasarkan hubungan antara aktivitas penangkapan radikal (IC_{50}) dengan kadar fenolik total (GAE) menggunakan regresi linier didapatkan $R^2 = 0,7688$ (Gambar 2) yang dapat diartikan tidak ada kolerasi antara kadar fenolik total dengan nilai IC_{50} . Hasil tersebut dimungkinkan terdapat dari senyawa selain fenolik yang terdapat dalam daun lempuyang emprit.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun lempuyang emprit (*Z. amaricans* Bl.) untuk ekstrak memiliki nilai IC_{50} 398,85 $\mu\text{g/mL}$, fraksi n-heksan 485,23 $\mu\text{g/mL}$, fraksi etil asetat 412,45 $\mu\text{g/mL}$, dan fraksi etanol 494,65 $\mu\text{g/mL}$. Dan nilai rerata kadar fenolik total (GAE) yang terdapat pada daun *Z. amaricans* Bl untuk ekstrak 38,51 mg/g, fraksi n-heksan 17,83 mg/g, fraksi etil asetat 52,72 mg/g, dan fraksi etanol 20,78 mg/g. Kadar fenolik total dalam ekstrak dan fraksi daun lempuyang emprit (*Zingiber amaricans* Bl.) kecil, sehingga tidak berkolerasi dengan aktivitas penangkapan radikal.

Saran

Dari penelitian ini, disarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan bagian lain dari tanaman lempuyang emprit dan menggunakan metode lain

yang lebih efektif agar mendapatkan senyawa yang lebih poten yang berperan sebagai aktivitas penangkapan radikal serta aktivitas selain penangkapan radikal

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada bapak Dedi Hanwar, M.Si., Apt selaku pembimbing skripsi dan seluruh laboran serta pihak-pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini.

DAFTAR ACUAN

- Bast, A.G.R.M.M. Haenen dan C.J.A. Doelman, 1991, Oxidants and Antioxidants: State of Art, *The American journal of Medicine*, Proceedings of a Symposium Oxidants and Antioxidats : Pathophysiologic Determinants and Therapeutic Agents
- Fessenden, R. J., & Fessenden, J. S., 1986, *Kimia Organik Edisi Ketiga*, Diterjemahkan oleh Pudjaatmakan, A. H., 223-224, Penerbit Erlangga, Jakarta
- Halimah Diana P. P., Zetra Y., 2011, Minyak Atsiri dari Tanaman Nilam (*Pogostemon cablin* Bent.) melalui Metode Fermentasi dan Hirodistilasi serta Uji Bioaktivitasnya, *Posiding Tugas Akhir Semester Genap 2010/201*, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh November
- Huang, D. Ou. B., and Prior, R.L, 2005, The Chemistry behind Antioxidant capacity Assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856
- Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY, 2003, Cocoa Has More Phenolic Phytochemical and A Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine, *J. Agric. Food Chem*, 51 (25), 7292-7295
- Mukhlas, A., 2013, Penentuan Profil Kromatogram Ekstrak Etanol Lempuyang Emprit (*Zingiber amaricans* Bl.) dan Penetapan Kadar Zerumbon-Nya Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Rohman, A., Riyanto, S., dan Uturi, D., 2006, Antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents of ethyl acetate extract of Mengkudu (*Morinda citrifolia*, L) fruit and its fractions, *Majalah Farmasi Indonesia* 17, 136-142
- Sudjadi dan Rohman, A., 2004, *Analisis Obat dan Makanan*, Yogyakarta, Pustaka Pelajar
- Wahyuni S. dan Bermawie N., 2010, *Evaluasi 15 Akses Lempuyang untuk Meningkatkan Produktivitas >20%*, Lapran Teknis Penelitian Tahun Anggaran 2010 Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik
- Wicaksono A. N., 2013, Perbandingan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Semipolar Ekstrak Daun Lempuyang Gajah (*Zigiber zerumbet* Smith.) dengan Metode Difenilpikril Hidrazil (DPPH) Menggunakan Elisa Reader dan Spektrofotometri UV-vis, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta