



REPUBLIK INDONESIA  
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

# SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan : EC00201816144, 21 Juni 2018

## Pencipta

Nama : **Yuvianti Dwi Franyoto, Ahmad Fuad Masduqi, , dkk**  
Alamat : **Jl Amposari Raya, RT 004 Rw 003, Kel. Kedung Mundu, Kec. Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, 50273**  
Kewarganegaraan : **Indonesia**

## Pemegang Hak Cipta

Nama : **Yuvianti Dwi Franyoto, Ahmad Fuad Masduqi, , dkk**  
Alamat : **Jl Amposari Raya, RT 004 Rw 003, Kel. Kedung Mundu, Kec. Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, 50273**  
Kewarganegaraan : **Indonesia**

Jenis Ciptaan : **Buku**  
Judul Ciptaan : **Ekstraksi Karotenoid Bakteri Simbion Karang Lunak Dan Potensinya Sebagai Antioksidan**

Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia : **5 Juni 2018, di Semarang**

Jangka waktu perlindungan : **Berlaku selama hidup Pencipta dan terus berlangsung selama 70 (tujuh puluh) tahun setelah Pencipta meninggal dunia, terhitung mulai tanggal 1 Januari tahun berikutnya.**

Nomor pencatatan : **000110281**

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.  
Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.

a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA  
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.  
NIP. 196611181994031001



**LAMPIRAN PENCIPTA**

No	Nama	Alamat
1	Yuvianti Dwi Franyoto	Jl Amposari Raya, RT 004 Rw 003, Kel. Kedung Mundu, Kec. Tembalang
2	Ahmad Fuad Masduqi	Jl. Purwomukti Timur III, RT 010 RW 001, Kel. Pedrungan Lor, Kec. Pedurungan.
3	Lia Kusmita	Kupang Pete, RT 006, RW 002, Kel. Kupang, Kec. Ambarawa
4	Sulistiyani	Jl. Tembalang Baru V/64, Perumda, Kel. Tembalang, Kec. Tembalang
5	Diah Permata Wijayanti	Perum Klaseman Hijau 24, RT 008 Rw. 002 Kel. Mangunsari Kec. Sidomukti

**LAMPIRAN PEMEGANG**

No	Nama	Alamat
1	Yuvianti Dwi Franyoto	Jl Amposari Raya, RT 004 Rw 003, Kel. Kedung Mundu, Kec. Tembalang
2	Ahmad Fuad Masduqi	Jl. Purwomukti Timur III, RT 010 RW 001, Kel. Pedrungan Lor, Kec. Pedurungan
3	Lia Kusmita	Kupang Pete, RT 006, RW 002, Kel. Kupang, Kec. Ambarawa
4	Sulistiyani	Jl. Tembalang Baru V/64 Perumda, Kel. Tembalang, Kec. Tembalang
5	Diah Permata Wijayanti	Perum Klaseman Hijau 24, RT 008 RW. 002, Kel. Mangunsari Kec., Sidomukti



# **EKSTRAKSI KAROTENOID BAKTERI SIMBION KARANG LUNAK DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

## **MODUL KARYA TEKNOLOGI**



Penyusun :

**Yuvianti Dwi Franyoto, M.Sc., Apt.**

**Ahmad Fuad Masduqi., M.Si.**

**Lia Kusmita, M.Si.**

**Dr.Dra. Sulistiyani, M.Kes**

**Dr. Ir. Diah Permata Wijayanti, M.Sc.**

**SEKOLAH TINGGI ILMU FARMASI  
“YAYASAN PHARMASI SEMARANG”  
DAN  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
MEI 2018**

# **EKSTRAKSI KAROTENOID BAKTERI SIMBION KARANG LUNAK DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

## **1. Latar Belakang**

Karotenoid merupakan pigmen yang berwarna kuning, merah sampai orange (Gross 1991; Stahl and Sies 2003). Bauernfeind (1981) serta Britton dan Goodwin (1982) telah memanfaatkan karotenoid dalam bidang kesehatan. Salah satu manfaat yang paling potensial adalah antioksidan (Dutta et al. 2005; Rao and Rao 2007; Fiedor and Burda 2014). Pigmen tersebut merupakan salah satu pigmen yang dapat dihasilkan oleh organisme termasuk organisme yang ada di laut yang merupakan potensi alam luar biasa di Indonesia. Pigmen karotenoid adalah contoh senyawa bioaktif yang banyak ditemukan pada organisme laut seperti alga, sponge, karang lunak, dan lain – lain (Britton, 1991).

Karang lunak adalah salah satu organisme laut yang memiliki kandungan karotenoid yang beragam jenisnya. Karotenoid tersebut banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang, misalnya farmasi. Namun, kalau terus – menerus dimanfaatkan ini akan menyebabkan eksploitasi berlebihan yang mengancam keberadaan terumbu karang ini. Maka perlu adanya inovasi dengan memanfaatkan mikrobia yang dominan sebagai simbion pada terumbu tersebut. Mikroba memiliki kelebihan yaitu pertumbuhannya yang sangat cepat jadi tidak merusak ekosistem yang ada di laut. Untuk menarik karotenoid dari bakteri membutuhkan modifikasi metode ekstraksi yang dilakukan karena dinding selnya yang tebal. Sifat dari karotenoid juga mudah rusak karena cahaya, udara, dan panas (Bonnie dan Choo, 1999). Karotenoid juga terdiri dari 2 golongan yaitu karoten dan xantofil (Gross, 1991). Jenis karoten bersifat lebih non polar, dan jenis xantofil bersifat lebih polar dibandingkan karoten. Berdasarkan sifat tersebut maka perlu dicari pelarut yang cocok dalam menarik karotenoid berdasarkan jenisnya. Penelitian ini perlu dilakukan untuk mencari metode ekstraksi karotenoid yang berasal dari bakteri simbion karang lunak. Metode ekstraksi ini sangat penting dalam mendapatkan karotenoid secara maksimal dan tidak rusak.

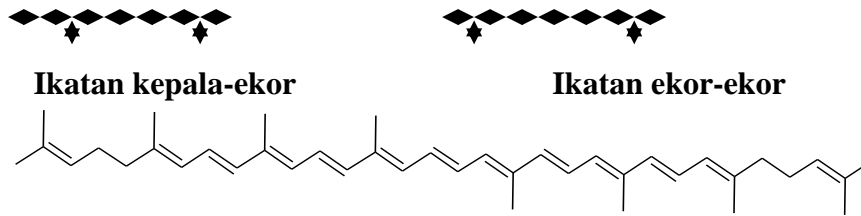
## 2. Tinjauan

### 2.1. Karang Lunak

Karang lunak termasuk filum Coelenterata, kelas Anthozoa, yaitu hewan dengan bentuk seperti bunga yang disebut polip. Organisme tersebut merupakan sumber yang kaya akan senyawa kimia yang bersifat bioaktif. Senyawa kimia ini dihasilkan secara alamiah melalui proses metabolisme tubuh (Radhika 2006). Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh karang lunak memiliki keragaman yang tinggi dan struktur kimia yang unik. Muniarsih (2005) berpendapat bahwa hal tersebut dipengaruhi oleh tingginya keanekaragaman organisme laut dan pengaruh lingkungan laut, seperti kadar garam, rendahnya intensitas cahaya, adanya arus maupun kompetisi yang kuat sehingga mendorong organisme laut menghasilkan metabolit sekunder yang mempunyai struktur kimia relatif berbeda dengan organisme darat. Karang lunak menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berfungsi untuk menghadapi serangan predator, media kompetisi, mencegah infeksi bakteri, membantu proses reproduksi, dan mencegah sengatan sinar ultra violet (Harper, dkk 2001). Karang lunak menghasilkan beberapa golongan senyawa hasil metabolit sekunder, seperti alkaloid, terpenoid, steroid, flavonoid, fenol, saponin (Hardiningtyas, 2009). Beberapa komponen bioaktif yang dihasilkan karang lunak memiliki bioaktivitas, seperti antioksidan. Salah satu senyawa yang potensial sebagai antioksidan ditemukan pada karang lunak adalah terpenoid. Salah satu jenis terpenoid adalah karotenoid yang masuk dalam golongan tetraterpenoid.

### 2.2. Karotenoid

Karotenoid merupakan pigmen yang berwarna kuning, orange hingga merah (Gross, 1991). Pigmen tersebut banyak ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan (Gebhardt dkk., 1977; Wills, Nurdin dan Wootton, 1988; Ong dan Tee, 1992; Zeb dan Mehmood, 2004), serta ditemukan juga pada jamur, bakteri, hewan dan manusia (Gross, 1991). Struktur karotenoid berasal dari 8 unit isopren  $C_5$  yang akan berikatan kepala-ekor, kecuali pada pusat molekulnya akan berikatan ekor-ekor (Gambar 1.).



**Gambar 1. Struktur karotenoid (likopen)**

Karotenoid akan membentuk hidrokarbon rantai panjang, yang dapat dibedakan menjadi 2 golongan utama yaitu: (1) karoten yang merupakan kelompok hidrokarbon tidak jenuh rantai panjang ( $C_{40}H_{56}$ ), meliputi:  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, dan  $\gamma$ -karoten dan (2) xantofil yang merupakan turunan karoten teroksidasi meliputi: lutein, zeaxantin, violaksantin dan lain-lain.

### 2.3. Antioksidan Karotenoid

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat proses reaksi oksidasi radikal bebas (Haila 1999; Chang *et al.* 2002), sehingga senyawa tersebut dapat berperan dalam mencegah timbulnya penyakit kanker, mencegah proses penuaan dini, dan mengurangi terjadinya penyakit degeneratif lainnya (Haila, 1999; Rahmat dkk., 2003; Rao, 2003; Lila, 2004; Zhao dkk., 2004). Salah satu penyebab timbulnya penyakit kanker adalah terjadinya mutasi sel yang diduga disebabkan oleh adanya radikal bebas. Karotenoid dapat bertindak sebagai antioksidan sehingga dapat melindungi sel-sel dan organisme dari kerusakan oksidatif.

Karotenoid merupakan salah satu senyawa antioksidan alami (Britton, 1995; Rao, 2003), sebagai antioksidan senyawa ini dapat berfungsi sebagai *quencher* singlet oksigen dan penangkal radikal bebas (Packer, 1992; Haila, 1999; Dutta dkk., 2005). Singlet oksigen adalah tingkat tenaga molekul  $O_2$  yang sangat reaktif. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa singlet oksigen yang berbahaya ini dapat dinonaktifkan oleh  $\beta$ -karoten. Selain berfungsi sebagai *quencher* singlet oksigen,  $\beta$ -karoten juga mampu bereaksi dengan radikal bebas dengan proses transfer muatan (elektron). Pada reaksi ini akan diperoleh radikal bebas dari  $\beta$ -karoten yang lebih stabil. Reaksi karotenoid dengan radikal bebas ( $R^*$ ) dapat dituliskan dalam bentuk persamaan reaksi berikut:



Radikal-radikal karotenoid yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lain membentuk radikal baru (Gordon, 1990).

#### 2.4. Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif terdapat di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya. Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Dalam proses ekstraksi suatu bahan, banyak faktor yang dapat mempengaruhi kandungan senyawa hasil ekstraksi diantaranya : jenis pelarut, konsentrasi pelarut, metode ekstraksi dan suhu yang digunakan untuk ekstraksi.

### 3. Metode

#### 3.1. Isolasi bakteri simbiosis karang lunak

Isolasi bakteri dilakukan dengan metoda sebaran (Radjasa et al, 2007a,b). Sampel karang lunak tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang sebagian berisi air laut steril. Selanjutnya dilakukan pemotongan terhadap permukaan jaringan dan hanya bagian dalam dari sampel yang akan digunakan.

Selanjutnya dilakukan seri pengenceran terhadap sampel tersebut. Dari masing-masing cawan petri tersebut diambil 10 ml sampel dengan pipet steril, kemudian dimasukkan ke dalam labu erlemeyer berisi 90 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran sampel sebesar  $10^{-1}$ . Dari pengenceran  $10^{-1}$  tersebut diambil 1 ml sampel dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran  $10^{-2}$ . Demikian selanjutnya sehingga akan diperoleh pengenceran sampel  $10^{-3}$ ;  $10^{-4}$ ; dan  $10^{-5}$ .

Dari masing-masing seri pengenceran tersebut, selanjutnya diambil 1 ml sampel dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang dituangi media agar Zobell 2216E. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasikan pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 2 hari. Koloni bakteri berwarna yang

tumbuh pada permukaan agar tersebut, kemudian dipisahkan dengan teknik goresan (*streak method*) sehingga diperoleh isolat bakteri berwarna yang berasosiasi dengan karang lunak.

### 3.2. Ekstraksi karotenoid

Isolat bakteri yang berwarna kuning, merah, sampai orange diambil. Ekstraksi dilakukan dalam ruangan yang berlampu merah. Bakteri yang berwarna tersebut dilarutkan dengan pelarut heksana, aseton, dan metanol. Masukkan dalam sonikasi untuk memecah dinding sel bakteri tersebut. Setelah pigmen terangkat dari bakteri kemudian disentrifuge untuk mendapatkan pigmen dari bakteri tersebut. Pelet diambil untuk kemudian diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut sampai pelet tidak berwarna. Ekstrak yang diperoleh disaring dengan kertas saring dan pigmen yang diperoleh dikeringkan dengan Hasil endapan sentrifuge/pelet dilarutkan dengan metanol, setelah pigmen terangkat dari bakteri kemudian disentrifuge kembali untuk mendapatkan pigmen dari bakteri tersebut. Pelet siap ekstraksi didapatkan dengan mengkultur bakteri target ke dalam media zobell cair. Pelet diambil untuk kemudian masing – masing diekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksan, aseton dan metanol. Ekstrak yang diperoleh disaring dengan kertas saring dan pigmen yang diperoleh dievaporasi pada suhu rendah dan dikeringkan dengan menggunakan gas N<sub>2</sub>.

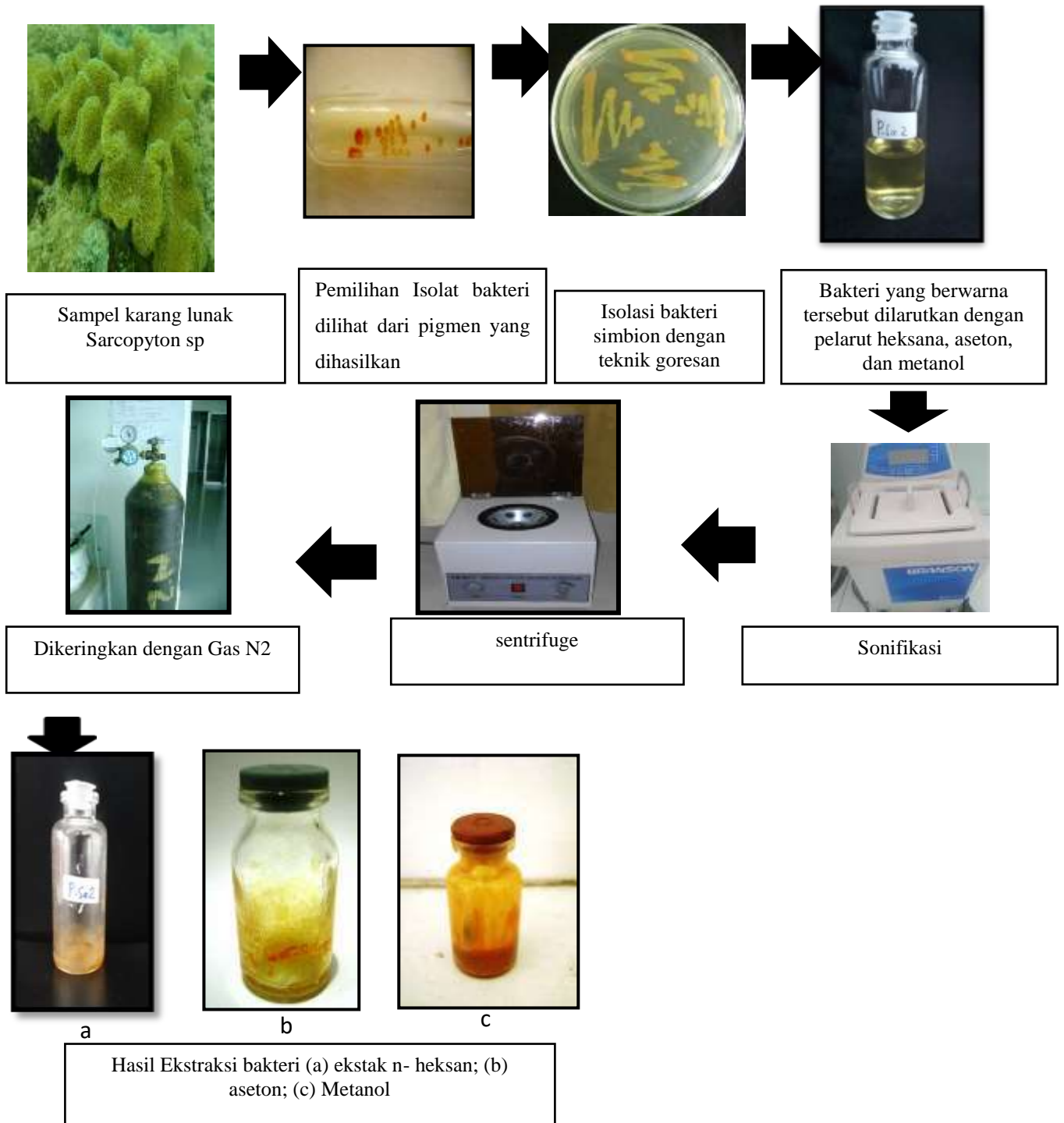
### 3.3. Uji aktivitas antioksidan

Satu gram pelet bakteri dilarutkan dalam heksana, aseton, dan metanol. Blanko berupa campuran 4 ml metanol 95% ditambah 1 ml ekstrak, sedangkan larutan sampel terdiri dari 4 ml DPPH ditambah 1 ml ekstrak. Blanko maupun sampel diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Tampak berkas tunggal Shimadzu 1240. Aktivitas penghambatan dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{[DPPH]_0 - [DPPH]_s}{[DPPH]_0} \times 100\%$$

#### 4. Hasil dan pembahasan

Berikut ini adalah gambar proses ekstraksi senyawa bakteri simbiosis karang lunak:



Gambar 1. proses ekstraksi senyawa bakteri simbiosis karang lunak

Bakteri simbion merupakan bakteri hidup yang bersimbiosis dengan organisme hidup lainnya. Sebagai contohnya, banyak karang yang ditemukan bersimbiosis dengan bakteri pemfikasi nitrogen yang ada di perairan di dunia. Oleh karena itu, karang sendiri harus membentuk suatu simbiosis dengan bakteri pemfikasi nitrogen tersebut (Beard *et al.*, 2001).

Dalam simbiosis tidak lepas dari simbion, yaitu makhluk hidup yang melakukan simbiosis dengan inangnya. Simbion adalah makhluk hidup yang hidupnya bergantung dengan makhluk hidup lain, gen dari simbion-simbion ini ditransfer ke organisme pembawa (vektor). Menurut Osinga *et al.* (2001) fungsi simbion yang lain yaitu memproduksi bahan-bahan kimia yang sangat potensial sebagai antibiotik, bahan antijamur, dan bahan-bahan dapat mencegah predator. Simbiosis yang dilakukan oleh inang dengan mikroba khususnya bakteri adalah hubungan yang bersifat endosimbiotik.

Karang lunak dipilih sebagai sampel karena karang lunak merupakan organisme allelopatik, dimana dia akan mengeluarkan zat tertentu dari tubuhnya sebagai alat pertahanan diri yang berupa senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif ini dapat berupa terpenoid, steroid dan steroid glikosida yang dapat dijadikan sebagai antioksidan. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Harpeni & Hasani (2005), tentang asosiasi antara bakteri dan karang lunak penghasil senyawa bioaktif diketahui bahwa bakteri yang berasosiasi dengan karang lunak memiliki potensi menghasilkan senyawa bioaktif yang sama. Diduga pada karang lunak *Sarcophyton* sp. juga terdapat bakteri simbion yang dapat memproduksi senyawa bioaktif yang sama dengan inangnya.

Pada umumnya senyawa antioksidan alami dapat diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut. Perbedaan posisi gugus fungsi suatu senyawa dapat mempengaruhi kepolaran suatu senyawa, sehingga ekstraksi menggunakan pelarut dengan kepolaran yang berbeda lebih efektif untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder dengan kepolaran yang

berbeda. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksana, aseton dan metanol pada bakteri simbiosis karang lunak memberikan hasil yang berbeda terhadap aktivitas antioksidan. Hasil uji aktivitas antioksidan berupa persen penghambatan untuk ekstrak n heksan sebesar 6,95%; aseton 8,59%; dan metanol 12,83%

## 5. Kesimpulan

Pelarut yang cocok digunakan dalam proses ekstraksi karotenoid dari bakteri simbiosis karang lunak adalah metanol. Dapat dilihat dari nilai rendemen yang dihasilkan dari pelarut n heksan sebesar 2,1%; aseton sebesar 3,5%; dan metanol sebesar 4,4%. Hasil uji aktivitas antioksidan berupa persen penghambatan untuk ekstrak n heksan sebesar 6,95%; aseton 8,59%; dan metanol 12,83%

## 6. Daftar Pustaka

- Anand, T. P. Et al. 2006. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. [www.elsevier.de/micres](http://www.elsevier.de/micres). Microbiological Research. 161 : 252—262
- Beard, C.B., Dotson, E.M., Pennington, P.M., Eichler, S., Cordon-Rosales, and C., Durvasula, R.V. 2001. Bacterial Symbiosis and Paratransgenic Control of Vectorborne Chagas Disease. *Int. J. Parasitol.* 31 : 621 – 627.
- Bonnie, T.Y.P. dan Choo, Y.M. 2000. *Practical Guide to Establishing Palm Carotenoids Profiles by HPLC with Three Dimensional Diode Array Detector*. Palm Oil Development **33**, 13-17.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. dan Pfander, H. 1995. *Carotenoids Volume 1A: Isolation and Analysis*. Birkhäuser Verlag. Basel. Boston. Berlin.
- Chang LW, Yen WJ, Huang SC, Duh P Der. 2002. Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chem* 78:347–354. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00119-X

- Dutta D, Chaudhuri U, Chakraborty R. 2005. Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African J Food, Agric Nutr Dev* 4:1510–1520. doi: 10.4314/ajfand.v4i13.71773
- Fiedor J, Burda K. 2014. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 6:466–488. doi: 10.3390/nu6020466
- Hardiningtyas, S.D. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak Sarcophyton sp. yang Difragmentasi dan Tidak Difragmentasi di Perairan Pulau Pramuka Kepulauan Seribu. *Skripsi*. Bogor: Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB.
- Harper M.K., Bugni T.S., Copp B. R., James J. D., Lindsay B.S., Richardson A. D., Schnabel P.C., Tasdemir D., Van Wagoner F.M., Verbitski S.M., Ireland dan CN. 2001. *Introduction to the Chemical Ecology Of Marine Natural Products*, di dalam McClintock J.B., Baker B.J. editor Marine Chemical Ecology USA: CRC Press.
- Harpeni, E dan Hasani, Q. 2005. Eksplorasi Bakteri yang Bersimbiosis dengan Karang Lunak sebagai Alternatif Sumber Senyawa Bioaktif (Uji Bioassay Antibakteri). *Jurnal Penelitian*. Bandar Lampung : Universitas Lampung.
- Lila, M. A., 2004. Plant Pigments And Human Health. Davis/*Plant Pigments and Their Manipulation*. 248-274
- Murnarsih, T. 2005. Potensi Mikroorganisme Sebagai Sumber Bahan Obat-obatan dari Laut yang Dapat Dibudidayakan. Oseana, Volume XXIX, Nomor 1 : 1-7. *Puslitbang Oseanologi-LIPI*.
- Ong, A. S. H. dan Tee, E. S., 1992. *Natural Sources of Carotenoid from Plants and Oil. Method in Enzymology* Vol 213, Cars.
- Osinga, R., E. Armstrong., J.G. Burgess., F. Hoffman., J. Reitner and G.Schumann-Kindel. 2001. *Sponge-microbe Associations and Their Importance for Sponge Bioprocess Engineering. Hydrobiologia*, 461 : 55 – 62.
- Packer, L. 1992. *Carotenoid Part A Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation*. Departement of Molecular and Cell Biology University of Calofornia, Berkeley, California.

- Pringgienis, Delianis. 2014. Bakteri Simbion Gastropoda *Pleuroploca trapesium* Dari Perairan Ternate, Sebagai Alternatif Antibakteri MDR. *Indonesian Journal Of Marine Science*. Vol 19(1) : 55-62.
- Radhika P. 2006. Chemical Constituents and Biological Activities of the Soft Coral of Genus *Cladrella*: A Review *Biochemical Systematic and Ecological*. 34: 781 – 789
- Radjasa, O.K., A. Sabdono, Junaidi and E. Zocchi. 2007. Richness of secondary metabolite-producing marine bacteria associated with sponge *Haliclona* sp. *Int. J. Pharmacol.* 3(3):275-279.
- Radjasa, O.K., SIO. Salasia., A. Sabdono., J. Weise, J.F. Imhoff., C. Lämmler and M.J. Risk. 2007. Antibacterial activity of marine bacterium *Pseudomonas* sp. associated with soft coral *Sinulariapolydactyla* against *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Int. J. Pharmacol.* 3(2):170-174.
- Rahmat, A., Kumar, V., Fong, L. M., Endrini, S. dan Sani, H. A. 2003. Determination of Total Antioxidant Activity in Three Types of Local Vegetables Shoots and The Cytotoxic Effect of Their Ethanolic Extracts Againsts Different Cancer Cell Lines. *Asia Pasific J Clin Nutr*, 12(3): 292-295
- Rao A., Rao L. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res* 55:1–331. doi: 10.1007/978-1-62703-203-2
- Stahl W, and Sies H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* 24:345–351. doi: 10.1016/S0098-2997(03)00030-X
- Zeb, A. dan Mehmood, S. 2004. Carotenoid Contents from Various Sources and Their Potential Health Applications. *Pakistan Journal of Nutrition* 3(3): 199-204
- Zhao, B., Tham, Su-Yin, Lu Jia., Lai, M. H., Lee, L.K.H., dan Moochhala, S.M., 2004. Simultaneous Determination of Vitamin C, E, and  $\beta$ -caroten in Human Plasma by High-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. *J. Pharm Pharmaceut Sci* 7(2): 200-204