

MODIFIKASI UKURAN PARTIKEL ENDOSPERMA BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) DAN IDENTIFIKASI KANDUNGAN SENYAWA FITOKIMIA

MODIFICATION PARTICLE SIZE OF ENDOSPERM MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) AND IDENTIFICATION OF PHYTOCHEMICAL COMPOUNDS

Eskarani Tri Pratiwi¹

¹Bagian Teknologi Farmasi dan Farmasetika, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran
Universitas Mataram

Jl. Majapahit No.62, Kecamatan Selaparang, Kota Mataram, Nusa Tenggara Barat 83125.

*Email: rani@unram.ac.id

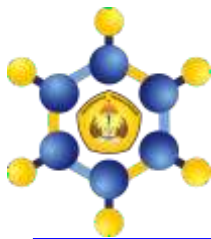
ABSTRAK

Melinjo (*Gnetum gnemon*) merupakan salah satu komoditas yang tumbuh hampir di seluruh provinsi di Indonesia. Endosperma biji melinjo memiliki kandungan senyawa aktif golongan stilbenoid diantaranya resveratrol dan dimer resveratrol yakni gnetin c. Penelitian ini bertujuan untuk memodifikasi ukuran partikel dan identifikasi kandungan senyawa aktif endosperma biji melinjo. Pembentukan serbuk submikron biji melinjo dengan penggilingan menggunakan *ball milling* dengan kecepatan 1000 rpm menggunakan 50 bola berukuran 9,22 mm selama 120 menit dan pengukuran ukuran partikel menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA). Identifikasi kandungan senyawa aktif diawali dengan penapisan fitokimia kemudian identifikasi menggunakan metode kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak kloroform, etil asetat, dan asam format (5:4:1), serta uji total fenol menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Hasil ukuran partikel yang diperoleh adalah 975.6 nm dengan nilai indeks polidispersitas 0.453, identifikasi kandungan senyawa aktif menunjukkan adanya kandungan senyawa fenol, flavonoid, saponin dan tannin, kemudian identifikasi menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan nilai R_f gnetin c dan resveratrol secara berturut-turut adalah 0.67 dan 0.72 serta hasil uji total fenol dengan nilai 4.319±0.065 µg/mL. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa endosperma biji melinjo dapat dimodifikasi hingga ukuran submikron dan mengandung senyawa fenol, flavonoid, saponin, tannin, resveratrol dan gnetin c.

Kata kunci: Melinjo, endosperm, submikron, fitokimia

ABSTRACT

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) is one of commodities growing throughout Indonesia. The seed of *gnetum gnemon* contains a group of stilbenoid bioactive compounds such as resveratrol and gnetin C. This study aims to modify the particle size and identify the active compounds contained in the endosperm of *gnetum gnemon* seeds. Formation of



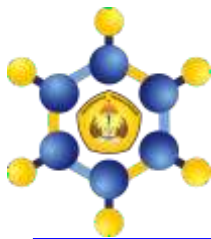
submicron gnetum gnemon seed powder by grinding using ball milling at 1000 rpm using 50 balls sized 9.22 mm for 120 minutes and measuring particle size using a particle size analyzer (PSA). Identification of the bioactive compound using phytochemical screening and then identification using the thin layer chromatography method with silica gel 60 F254 stationary phase and the mobile phases of chloroform, ethyl acetate, and formic acid (5:4:1), as well as the total phenol test using the Folin-Ciocalteu method. The resulting particle size obtained was 975.6 nm with a polydispersity index value of 0.453, identification of the bioactive compound content showed the presence of phenolic, flavonoids, saponins, and tannins, then identification using the thin layer chromatography (TLC) method showed the R_f gnetin c and resveratrol values respectively were 0.67 and 0.72 and the total phenol test results with a value of $4.319 \pm 0.065 \mu\text{g/mL}$. Based on these results the gnetum gnemon seed endosperm can be modified to submicron size and contains phenolic, flavonoids, saponins, tannins, resveratrol and gnetic c compounds.

Keywords: *gnetum gnemon, endosperm, submicron, phytochemical*

A. Pendahuluan

Melinjo (*Gnetum gnemon*) merupakan salah satu komoditas yang tumbuh hampir di seluruh provinsi di Indonesia. Pada tahun 2011, sebanyak 31 provinsi dari total 33 provinsi di Indonesia menghasilkan 213.025 ton melinjo/tahun. Dalam upaya meningkatkan nilai jual dari melinjo maka perlu adanya inovasi bentuk olahan melinjo selain sebagai bahan olahan pangan, salah satunya sebagai bahan baku dalam pengembangan produk-produk di industri farmasi. Kandungan zat aktif dari biji melinjo tersebut memiliki karakteristik farmasetik yang kurang baik yang menyebabkan efektivitasnya tidak bisa maksimal jika pendekatan formula dan sistem penghantarannya tidak tepat. Salah satu strategi untuk mengatasi masalah utama senyawa aktif yang terkandung dalam biji melinjo adalah melalui manipulasi fisik dengan penurunan ukuran partikel material pada tingkat submikron (Mohanty dkk., 2012). Manipulasi fisika dari aspek ukuran partikel merupakan cara yang sangat mungkin direalisasikan untuk mendesain produk-produk farmasi yang inovatif di

Indonesia, pada aspek tertentu praktis dan sederhana namun berdampak luar biasa jika ukuran material sampai pada skala submikron, pengecilan ukuran partikel dapat dilakukan dengan metode penggilingan. Hampir semua sifat fisik menjadi lebih unggul jika material tersebut berada pada tingkat submikron, dapat meningkatkan kelarutan (Loh dkk., 2015; Murdande dkk., 2010) dan permeabilitas berdampak akhir pada peningkatan efektivitas sesuai indikasi yang diklaim (Abbas dkk., 2018). Selain itu, dukungan data ilmiah untuk meningkatkan nilai guna farmasetik bagian endosperma biji melinjo yang diketahui memiliki kandungan senyawa stilbenoid sebagai kandidat anti penuaan dini (*anti aging*) alam (Barua dkk., 2015). Hasil penelitian sebelumnya berhasil mengeksplorasi kandungan senyawa aktif golongan stilbenoid yang terdapat pada semua bagian biji melinjo: bagian kulit luar, bagian cangkang biji, serta bagian endosperma biji, dengan aktivitas utama sebagai antioksidan (Bhat dan Yahya, 2014). Berbasis dari potensinya sebagai antioksidan, senyawa stilbenoid (antara lain resveratrol, gnetin c, gnetol) yang terkandung dalam biji melinjo



diturunkan menjadi berbagai efek farmakologi yang penting di antaranya sebagai antimikroba, antihiperurisemia, anti inflamasi, dan anti penuaan dini (Parvez dkk., 2006; Hiroyuki dkk., 2013). Resveratrol diketahui mampu merespon terjadinya stress, dan hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa ini menyerupai CR (*caloric restriction*) (Christovam dkk., 2019). Oleh karena itu perlu di lakukan eksplorasi potensi endosperma biji melinjo dengan memodifikasi sifat fisik (ukuran partikel) melalui proses penggilingan hingga diperoleh partikel berukuran <5 μm untuk meningkatkan kelarutan zat aktif dengan semakin tinggi luas permukaan partikel serta mengidentifikasi kandungan senyawa aktif tersebut.

B. Metode Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, gelas beaker, labu erlenmeyer, pipet tetes, tabung reaksi, batang pengaduk, pipet tetes, mikropipet, tip, labu takar, desikator, labu takar, vial, Spektrofotometer UV-Visible (Beckman DU 7599i), ayakan bertingkat (Retsch), Ball milling (Prolabo), neraca analitik (Mettler Toledo [®] XS205), pengaduk magnetic, stirrer, alat analisis ukuran partikel (Delsa TM Nano C Particle Analyzer, Beckman Coulter), Vortex Mixer (IKA [®] MS 3 digital), shieve shaker, kuvet disposable, dan alat gelas lain yang umum digunakan di laboratorium

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah endosperma melinjo kulit hijau, gnetin C (Merck), resveratrol (Merck), aquades, methanol pro analisis (p.a) (Merck), etanol 96%, kloroform p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), asam format

p.a (Merck), asam klorida teknis, sodium hidroksida p.a (Brataco), pelat silika gel 60 F₂₅₄, etanol 50%, pereaksi dragendorff, natrium hidroksida (Brataco), ferri klorida, larutan benzene p.a (Merck), toluene p.a (Merck), asam asetat glasial p.a (Merck), asam sulfat p.a (Merck).

3. Langkah Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Sampel simplisia biji melinjo (*Gnetum gnetum* L.) diambil dari Perkebunan Bumi Langitan Imogiri, Daerah Istimewa Yogyakarta.

b. Persiapan Simplisia

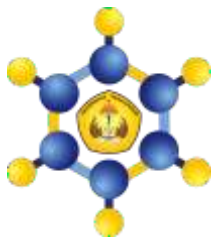
Simplisia diperoleh dengan mengupas kulit melinjo, mulai dari kulit terluar, cangkang, kulit ari dari biji melinjo tersebut. Dilakukan pengeringan selama ± 48 jam hingga diperoleh endosperma melinjo yang kering. Dilakukan pengecilan ukuran partikel dengan cara diblender dan diayak menggunakan *shieve shaker* hingga nomor ayakan 120, dilanjutkan dengan penggilingan menggunakan *ball milling* hingga diperoleh ukuran submikron (pengukuran menggunakan *Particle Size Analyzer*).

c. Pembuatan Serbuk Submikron Endosperma Biji Melinjo (SEBM)

Tepung endosperma biji melinjo dihaluskan dengan cara diblender hingga halus lalu diayak menggunakan *shieve shaker*. Kemudian dilakukan pengecilan ukuran partikel dengan teknik ball milling dengan kecepatan 1000 rpm menggunakan 50 bola berukuran 9,22 mm selama 120 menit.

d. Uji Kadar Air Sampel

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen.



Toluen yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu. Kemudian ditimbang seksama ekstrak sebanyak 1 g dan dimasukkan kedalam labu alas bulat dan ditambahkan toluen yang telah dijenuhkan. Dilakukan pemanasan hingga memisah sempurna. Volume air dibaca sesudah toluen dan air memisah sempurna. Lakukan replikasi sebanyak tiga kali kemudian dihitung persentasenya (Depkes RI, 1989).

e. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, kuinon, dan steroid/terpenoid dilakukan berdasarkan protokol oleh Farnsworth (1966) yang telah dimodifikasi.

- Deteksi Alkaloid

Sebanyak 1 g ekstrak ditambahkan 2,5 mL amonia 25 % dan 10 mL kloroform. Setelah itu ditambahkan 5 mL HCl 10%. Diambil lapisan atas. Filtrat direaksikan dengan pereaksi Dragendroff. Pembentukan endapan merah bata menunjukkan adanya alkaloid. Filtrat direaksikan dengan pereaksi Mayer. Pembentukan endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

- Deteksi Flavonoid

Ekstrak ditambahkan 0,1 g MgCl, 1 mL HCl dan 2 mL amil alkohol. Kemudian dikocok dan dibiarkan memisah. Hasil positif menunjukkan terbentuknya warna jingga.

- Deteksi Tanin

Untuk ekstrak, larutan gelatin 1% Pembentukan endapan putih menunjukkan adanya

tanin. Ekstrak ditambahkan larutan FeCl₃ 10%. Terbentuknya warna biru menunjukkan adanya tanin.

- Deteksi Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak dikocok dengan 2 mL air. Ditambahkan HCl 2 N. Jika busa yang dihasilkan tetap ada selama sepuluh menit, ini menunjukkan adanya saponin.

- Deteksi Steroid/Triterpenoid

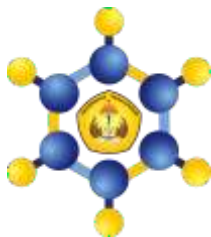
Ekstrak direndam dengan menggunakan eter selama 2 jam kemudian diambil filtratnya. Filtrat diuapkan hingga diperoleh residu. Jika terbentuk warna biru hingga hijau menunjukkan adanya steroid. Jika terbentuk warna jingga menunjukkan adanya triterpenoid.

f. Identifikasi Menggunakan KLT

Penentuan pola kromatografi dilakukan dengan menggunakan pelat KLT silika gel 60 F254. Sampel dan senyawa markernya, yaitu gnetin C dan resveratrol ditotolkan pada pelat. Fase gerak yang digunakan yaitu kloroform, etil asetat, dan asam format (5:4:1). Pelat yang telah ditotolkan kemudian dimasukkan ke dalam bejana yang telah jenuh oleh larutan fasa gerak. Hasil elusi dilihat di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm (Imran dkk., 2019).

g. Uji Total Fenol (menggunakan Metode Folin-Ciocalteu)

Menggunakan Asam gallat sebagai standar dan membuat kurva kalibrasi dengan konsentrasi 10, 30, 50, 70, 100, 150 µg/mL yang dilarutkan dalam metanol. sampel dengan konsentrasi (0,8 g/L). Mengambil



1 mL dan di campurkan dengan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu (7,5% dalam air) sebanyak 5 mL dan di amkan selama 8 menit. Melakukan penambahan natrium carbonat (1%) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit, mengukur serapan pada panjang gelombang 730 nm (Kunarto dkk., 2019).

C. Hasil dan Pembahasan

1. Hasil Determinasi Tanaman

Berdasarkan hasil determinasi tanaman yang telah dilakukan di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (No. 674/I1.CO2.2/PL/2019), tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis *Gnetum gnemon* L. dengan suku *Gnetaceae*.



Gambar 1. Sampel Biji Melinjo

2. Karakteristik Fisik Serbuk Submikron Endosperma Biji Melinjo

Pembentukan serbuk submikron endosperma biji melinjo dilakukan pada serbuk yang telah melewati ayakan no 120. Ukuran partikel

tepung tersebut adalah kurang dari 125 μm , di mana partikel terlihat halus tetapi masih sedikit terasa kasar ketika menyentuh kulit. Pengecilan ukuran partikel menggunakan teknik *ball milling* menghasilkan serbuk yang sangat halus dan sudah tidak terasa kasar lagi, menghasilkan serbuk yang berukuran 700-2000 nm (Thakur dkk, 2012). Hasil pengukuran ukuran partikel menggunakan *particle size analyzer* (PSA) dapat dilihat pada tabel 1.

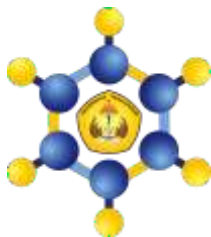
Tabel 1. Hasil Pengukuran Ukuran Partikel

Sampel	Ukuran Partikel (nm)	Indeks Polidispersitas
SEBM	975.6	0.453

Analisis menggunakan PSA dapat mengukur ukuran partikel dan distribusi ukuran partikel yang dinyatakan sebagai indeks polidispersitas. Rentang nilai indeks polidispersitas yang dapat diterima adalah 0 (partikel monodispersi) sampai 0,5 (distribusi ukuran partikel lebar), nilai Indeks polidispersitas dapat memberikan informasi mengenai kestabilan fisik suatu sistem dispersi. Nilai indeks polidispersitas yang rendah menunjukkan bahwa sistem dispersi yang terbentuk bersifat lebih stabil untuk jangka panjang (Gao dkk., 2008; Parakash dkk., 2014).

3. Karakteristik Kimia Serbuk Endosperma Biji Melinjo

Karakterisasi serbuk pada endosperma biji melinjo yang dilakukan meliputi penetapan kadar air, penentuan bobot jenis, penapisan fitokimia, identifikasi menggunakan pelat KLT dan uji total fenol.



Penetapan Kadar Air dan Bobot Jenis

Tabel 2. Hasil Penetapan Kadar Air dan Bobot Jenis

Sampel	Bobot Jenis	
	Kadar Air (%)	Bobot Jenis (%)
Serbuk Melinjo	7,9±0,1	0,841±0,04

Penetapan persen kadar air dilakukan dengan metode destilasi toluene. Penentuan kadar air ini menggunakan metode destilasi toluen, di mana prinsip penentuan kadar air dengan destilasi adalah menguapkan air dengan pembawa cairan kimia yang mempunyai titik didih lebih tinggi dari pada air dan tidak dapat dicampur dengan air serta mempunyai berat jenis lebih rendah dari pada air, salah satu zat kimia yang dapat digunakan adalah toluene (Winarno, 2014). Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa kadar air dalam serbuk biji melinjo memenuhi syarat karena kurang dari 10% (Voight, 1994).

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui golongan metabolit sekunder yang terkandung di dalam sampel tersebut meliputi penapisan golongan fenol, flavonoid, tanin, kuinon, saponin, alkaloid dan steroid/terpenoid. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Penapisan Fitokimia

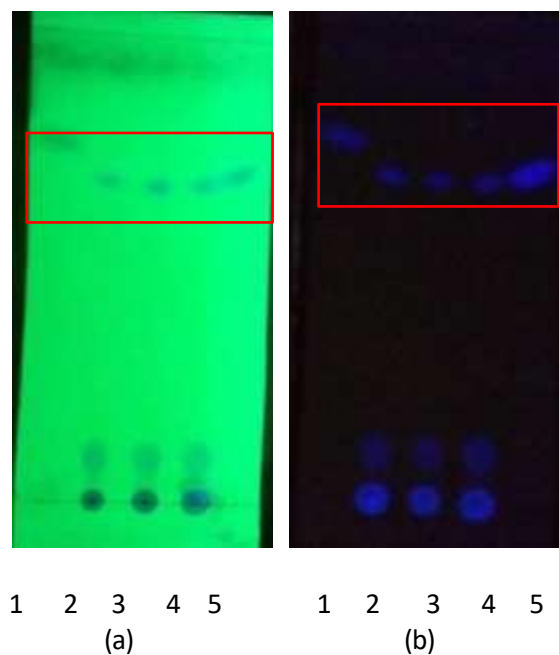
Golongan Senyawa	Hasil
	SEBM
Alkaloid	-
Fenol	+
Flavonoid	+
Kuinon	-
Saponin	+
Steroid/Triterpenoid	-
Tanin	+

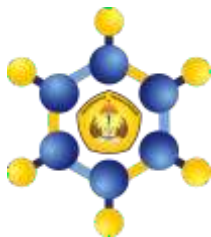
Keterangan: (+) terdeteksi, (-) tidak terdeteksi

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia, diketahui bahwa baik serbuk endosperma biji melinjo hijau mengandung fenol, flavonoid, saponin dan tanin. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Barua dkk (2015) dimana senyawa aktif yang ditemukan pada biji melinjo diantaranya ialah saponin, tanin, flavonoid, dan fenol.

Identifikasi menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil identifikasi menggunakan KLT diketahui bahwa serbuk dan ekstrak endosperma biji melinjo mengandung senyawa gnetin c dan juga resveratrol. Dengan nilai Rf resveratrol 0,72 dan Rf gnetin C 0,67, hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kato dkk (2009) bahwa endosperma biji melinjo mengandung senyawa stilbenoid. Hasil elusi dapat dilihat pada gambar 2.





Gambar 2. Hasil Identifikasi kromatografi lapis tipis (a) UV254 nm dan (b) 366 nm fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak kloroform, etil asetat dan asam format (5:4:1). Bercak meliputi (1) resveratrol, (2-4) SEBM (5) gnetin C.

Uji Total Fenol

Hasil pengujian total fenol dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji total fenol sampel (µg/mL)

SEBM	4,319±0,065
------	-------------

Uji total fenol sebagai salah satu uji untuk menentukan jumlah kandungan senyawa fenolik yang terkandung dalam senyawa SEBM (Villaba dan Alcain, 2012). Penelitian selanjutnya dapat dilakukan penentuan kadar senyawa resveratrol dan gnetin c dalam SEBM.

D. Kesimpulan

Modifikasi ukuran endosperma biji melinjo (SEBM) dapat metode *ball milling* memiliki kadar air 7,9±0,1 % dan bobot jenis 0,841±0,04% dengan ukuran partikel 975.6 nm (submikron) dan indeks polidispersitas 0.453, memiliki kandungan senyawa stilbenoid yakni resveratrol dan gnetin c dan senyawa fitokimia lainnya berupa fenol, flavonoid, saponin, serta tannin dengan nilai total fenol 4,319±0,065 µg/mL.

E. Acknowledgement

Terima kasih kepada seluruh staf Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Mataram dan Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung.

F. Referensi

Abbas R, Kazemi S, Askari F. Pluronic as nano-Carier for Drug Delivery System. *Nanomedicine Research Journal*. 2018. 25: 31. doi:

10.22034/NMRJ.2018.04.001

Barua C P, Haloi C, Barua I. Gnetum gnemon Linn: A Comprehensive Review on its Biological, Pharmacological and Pharmacognostical Potentials. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2015. 7(3): 531-539. ISSN: 0975-4873

Bhat R, Yahya N B. Evaluating belinjaw (Gnetum gnemon L.) seed flour quality as a base for development of novel food products and food formulations. *Food Chemistry*. 2014. 156: 42-29.

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.food>

chem.2014.01.063

Christovam A C, Theodor V, Mendonca F A. Activators of SIRT1 in wound repair: an animal model study. *Archives of Dermatology Research*. 2019. 311(3):193-201. doi:10.1007/s00403-019-01901-4

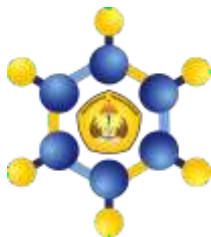
Departemen kesehatan RI. *Materia Medika Indonesia jilid V*. Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 1989. 549-553.

Farnsworth N R. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1996.55 (3): 243 – 268. doi: 10.1002/jps.2600550302

Gao L, Zhang D, Chen M. Drug nanocrystals for formulation of poorly soluble drugs and its application as potential drug delivery system. *Journal Nanoparticle*. 2008. 10: 845 –862. doi: 10.1007/s11051-008-9357-4

Hiroyuki K, Katagiri M, Watanabe T, Kanai Y, Melinjo (Gnetum gnemon L.) Seed Extract Decrease Serum Acid Levels in Nonobese Japanese Males: A Randomized Controlled Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013. 4: 1-9. doi: 10.1155/2013/589169

Imran M, Iqbal M K, Ahmad S, Ali J, baboota S. Stability- Indicating High-Performance Thin-Layer Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Quercetin and Resveratrol in the Lipid-Based Nanoformulation. *Journal of Planar Chromatography*. 2019. 32 (5): 393-400. doi:<https://doi.org/10.1556/1006.20>



-
- 19.32.5.7
- Kato E, Tokunaga Y, Sakan F. Stilbenoids isolated from the seeds of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) and their biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. 57:2544-2549. doi: 10.1021/jf803077p
- Kunarto B, Sutardi S, Supriyanto, Anwar C com. Antioxidant activity of melinjo ketan (*Gnetum gnemon* L., 'Ketan') seed extract at various ripening stages and ethanol solvent concentration. *Int J Adv Sci Eng Inf Technol*. 2019; 9(4):1344–1351.
- Loh Z H, Samanta A K, Heng P WS. Overview of Milling Techniques for Improving the Solubility of Poorly Water- Soluble Drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical Science*. 2015.10 (4): 255-274. doi: 10.1016/j.ajps.2014.12.006.
- Mohanty C, Das M, Sahoo S K. Emerging role of nanocarriers to increase the solubility and bioavailability of curcumin. *Expert Opinion Drug Delivery*. 2012. 9 (11), 1347–1364. doi:10.1517/17425247.2012.724676
- Murdande S B, Pikal M J, Shanker R M, Bonger R H. Solubility Advantage of Amorphous Pharmaceuticals: I. A thermodynamic analysis. *Journal of Pharmaceuticals Science*. 2010. 99 (3): 1254-1264. Doi: 10.1002/jps.21903
- Parvez S, Kang S A A, Malik K, Kim H Y. Probiotics and Their Fermented Food Product are Beneficial for Health. *Journal of Applied Microbiology*. 2006. 100(6):1171-85. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x
- Prakash K, Jieun R, Hyeongmin K, Iksoo K, Jeong Tae K, Hyunil K, Jae M C, Gyiae Y, Jaehwi L. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal Pharmacology*. 2014. 9: 304-416. doi:10.1016/j.ajps.2014.05.005
- Thakur P Y, Ram M Y, Dinesh P S. Mechanical Milling: a Top Down Approach for the Synthesis of Nanomaterials and Nanocomposites. *Nanoscience and Nanotechnology*. 2012. 2(3): 22-48. doi: 10.5923/j.nn.20120203.01
- Villalba J M, Alcain F J. Sirtuin Activator and Inhibitors. *Biofactors*. 2012. 38(5): 349-359. Doi: 10.1002/biof.1032
- Voight, R., 1994, *Buku Ajar Teknologi Farmas*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Winarno F.G., 2004, *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.