

**VALIDASI METODA PENENTUAN ANTIOKSIDAN TOTAL
(DIHITUNG SEBAGAI ASAM SITRAT) DALAM SAMPEL JERUK SECARA
SPEKTOFOTOMETRI DENGAN MENGGUNAKAN OKSIDATOR FeCl_3
DAN PENGOMPLEKS ORTO-FENANTROLIN**

Yefrida, Mega Ulfaningsih, Umiati Loekman

Laboratorium Kimia Analitik, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas

e-mail: yefanwar@yahoo.com

ABSTRACT

Antioxidant is a compound that can be used to obstruct species oxygen reactive, species nitrogen, and other free radicals so it can be used degenerative illnesses inhibition. Citric acid is a natural antioxidant that can be found in some kind of oranges. There are some methode that usually used to determination the antioxidant, such as CUPRAC, DPPH, and FRAP. Objective of this research is studied about alternative method to determine total antioxidant that is counted as citric acid by using FeCl_3 as an oxidator and *o*-phenantroline as a complexant reagent. In studied of appropriateness of this method, validation has been done with parameter linearity, LoD, LoQ, SDR, and recovery with samples orange, kaffir lime, and lime. Base on the research, the regression equation is $Y = 0,066 + 117.35 X$ and $R^2 = 0.990$ with value of LoD is 1.15×10^{-3} M and LoQ is 3.86×10^{-3} M. The value of SDR and recovery in samples orange, kaffir lime, and lime are 1.64%, 0.53% 2.14%, and 100.47%, 93.58%, 93.78%, respectively. Base on validation method data, can be concluded that this method appropriate to be used to determination of total antioxidant for samples orange, kaffir lime, and lime.

Keywords : *Antioxidant, Validation Method, Spectrophotometry*

PENDAHULUAN

Antioksidan adalah zat yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah terjadinya proses oksidasi. Antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan dan berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan. Manfaat antioksidan bagi kesehatan dan kecantikan, misalnya untuk mencegah penyakit kanker dan tumor, penyempitan pembuluh darah, penuaan dini, dan lain-lain. Dalam produk pangan, antioksidan dapat digunakan untuk mencegah terjadinya proses oksidasi yang dapat menyebabkan kerusakan, seperti ketengikan, perubahan warna dan aroma, serta kerusakan fisik lainnya. Penggunaan antioksidan sebagai obat makin berkembang seiring dengan makin

bertambahnya pengetahuan tentang aktifitas radikal bebas terhadap beberapa penyakit degeneratif seperti penyakit jantung dan kanker karena dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas sehingga radikal tersebut dapat diredam^[1,2]

Antioksidan ada yang didapat dari bahan alam dan ada yang sintetik. Seiring meningkatnya kesadaran orang tentang efek samping dari antioksidan sintetik seperti kerusakan hati dan bersifat karsinogenik, maka peneliti banyak melakukan penelitian-penelitian untuk mendapatkan bahan alam dengan kandungan antioksidan yang tinggi. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menentukan kandungan antioksidan dalam bahan alam antara lain dalam hazelnut^[3], tumbuhan obat^[4], madu, mint dan bit^[5],

beras^[6], anggur merah^[7], alga^[8], gandum^[9], ampas jeruk^[10], coklat^[11], daun katuk^[12] serta banyak bahan alam lainnya.

Para ahli selalu berusaha mengembangkan metoda yang sederhana, praktis dan selektif untuk analisis kuantitatif, baik yang berdasarkan sifat fisika maupun sifat kimia yang dimiliki senyawa tersebut. Pemilihan metode merupakan masalah yang terpenting di dalam setiap analisis, karena metode yang akan dipilih itu merupakan pencerminan dari beberapa faktor. Faktor – faktor tersebut antara lain: tujuan analisis, jenis bahan yang digunakan, jumlah bahan yang akan dianalisis, ketepatan dan ketelitian yang diinginkan, lamanya waktu yang diperlukan untuk analisis serta peralatan yang tersedia.

Metoda pengujian kandungan antioksidan dapat dilakukan secara spektrofotometri^[7,13], voltametri^[14,16], dan kromatografi^[7,8,15]. Metoda yang paling sering digunakan adalah metoda spektrofotometri, hal ini disebabkan karena harga alat, zat dan biaya operasionalnya yang tidak terlalu mahal. Beberapa metoda pengujian antioksidan secara spektrofotometri yang sering digunakan antara lain metoda DPPH, CUPRAC dan FRAP. Pengujian dengan metoda DPPH dilakukan dengan menggunakan metoda efek penangkapan radikal bebas DPPH (diphenyl picryl hidrazil) yang prinsipnya adalah penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas. Dalam hal ini DPPH menjadi sumber radikal bebas. Penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas, akan menyebabkan terjadinya perubahan warna yang akan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm.

Metoda CUPRAC dilakukan dengan menggunakan senyawa kompleks tembaga(II) bis-neokuproin yang akan mengoksidasi senyawa antioksidan dan mengalami reduksi membentuk senyawa kompleks tembaga(I) bis-neokuproin. Secara visual hal ini dapat dilihat dari perubahan warna kompleks larutan dari biru toska menjadi kuning. Metoda yang ketiga adalah

metoda FRAP, penentuan antioksidan dengan metoda ini dilakukan dengan menggunakan senyawa kompleks $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$ sebagai pereaksi. Kompleks biru $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$ akan berfungsi sebagai zat pengoksidasi yang akan mengoksidasi antioksidan, sedangkan kompleks ini sendiri akan mengalami reduksi menjadi $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{2+}$ yang berwarna kuning^[7,13].

Kekurangan utama ketiga metoda ini adalah sulitnya mendapatkan zat-zat yang dibutuhkan dalam analisisnya serta harganya yang relatif mahal. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan modifikasi metoda FRAP yaitu dengan mengganti senyawa kompleks $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$ yang dibutuhkan dengan FeCl_3 , yang fungsinya untuk mengoksidasi senyawa antioksidan. FeCl_3 merupakan zat yang mudah didapatkan dan harganya relatif murah.

Antioksidan merupakan reduktor yang dapat mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Fe^{2+} yang tereduksi ini dikomplekkan dengan pengomplek*orto*-fenantrolin. Pengompleksan besi dengan menggunakan *orto*-fenantrolin akan menghasilkan larutan yang berwarna merah jingga, karena terbentuknya kompleks $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$. Warna merah jingga dari kompleks yang dihasilkan ini stabil pada kisaran pH 2-9. Oleh karena itu penelitian dapat dilakukan pada range pH asam maupun basa. Kompleks $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$ yang terbentuk ini akan setara dengan kandungan antioksidan yang terdapat pada sampel. Kompleks $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$ ini dapat dianalisis dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

Pada penelitian ini digunakan asam sitrat sebagai standar antioksidan. Asam sitrat adalah salah satu antioksidan yang sangat larut dalam air. Asam sitrat secara alami banyak terdapat pada buah-buahan seperti jeruk, nenas, dan lain-lain.

Untuk menguji keakuratan hasil analisis, maka dilakukan validasi metoda dengan parameter uji antara lain linearitas, presisi, recoveri, LoD (*Limit of Detection*) serta LoQ (*Limit of Quantification*).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan diantaranya spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 20), neraca analitik, dan alat-alat gelas.

Bahan yang digunakan diantaranya besi (III) klorida heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a (Merck), asamsitrat monohidrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) p.a (Merck), *orto*-fenantrolin monohidrat ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) p.a (Merck), akuabides, jeruk madu, jeruk purut, dan jeruk nipis.

Pengambilan sampel

Sampel yang akan dianalisis berupa jeruk madu, jeruk nipis, dan jeruk purut yang dibeli secara acak di pasar Raya Padang.

Larutan besi klorida 1 M

Ditimbang 13,5192 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Diencerkan sampai tanda batas dengan akuabides.

Larutan *o*-fenantrolin 0,2%

Ditimbang 0,2 g *o*-fenantrolin monohidrat. Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan akuabides.

Penentuan Panjang Gelombang Optimum pada Pengukuran Kompleks Fe-fenantrolin

Ke dalam labu ukur 25 mL dimasukkan 2 mL asam sitrat 0,001 M; 1 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,20 M; 2 mL *o*-fenantrolin 0,2% diencerkan hingga tanda batas dengan akuabides. Didiamkan selama 35 menit. Absorban diukur pada rentang panjang gelombang 475-575 nm.

Pengaruh Konsentrasi FeCl_3 terhadap Serapan kompleks Fe-fenantrolin

Dicampurkan larutan sesuai kondisi diatas, namun konsentrasi FeCl_3 divariasikan yaitu (0,05; 0,1; 0,02; 0,03; 0,04; dan 0,05) M.

Absorban diukur pada panjang gelombang maksimum.

Pengaruh Waktu terhadap Kesetabilan Kompleks Fe-fenantrolin

Dicampurkan larutan sesuai kondisi diatas, namun waktu pengukuran divariasikan yaitu (5; 15; 25; 35; 45; dan 55) menit. Absorban diukur pada panjang gelombang maksimum.

Penentuan Linearitas

Dicampurkan larutan sesuai kondisi optimum diatas, tetapi konsentrasi asam sitrat divariasikan (0; 0,001; 0,003; 0,005; 0,007 dan 0,009)M. Absorban diukur pada panjang gelombang maksimum. Dibuat kurva kalibrasi standar asam sitrat dengan memplotkan konsentrasi dengan absorban.

Penentuan Nilai Presisi

Ke dalam 5 buah labu ukur 25 mL masing-masing dimasukkan 1 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M, 2 mL sampel dan 2 mL *o*-fenantrolin 0,2%. Diencerkan sampai tanda batas dengan akuabides. Absorban diukur pada panjang gelombang maksimum. Presisi dapat ditentukan berdasarkan nilai simpangan baku relatif (SDR) dari hasil-hasil yang diperoleh.

Preparasi Sampel

Sampel jeruk diperas. Air perasan tersebut disaring. Kemudian filtrat dipipet 5 mL dan diencerkan dengan akuabides dalam labu ukur 100 mL. Dilakukan perlakuan yang sama untuk sampel jeruk nipis dan purut.

Pengukuran Sampel

Ke dalam labu ukur 25 mL dimasukkan 1 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M, 2 mL sampel dan 2 mL *o*-fenantrolin 0,2%. Diencerkan sampai tanda batas dengan akuabides. Absorban diukur pada panjang gelombang maksimum.

Pengukuran Sampel Ditambah Standar

Ke dalam labu ukur 25 mL dimasukkan 1 mL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M; 2 mL asam sitrat 0,001 M; 2 mL sampel dan 2 mL *o*-fenantrolin 0,2%. Diencerkan sampai tanda batas dengan akuabides. Absorban diukur pada panjang gelombang maksimum. Dilakukan duplo.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Kondisi Optimum Pengukuran

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum ditentukan untuk mengetahui nilai panjang gelombang dimana komponen menyerap maksimum terhadap sinar monokromatis yang digunakan. Bila cahaya jatuh pada senyawa, maka sebagian cahaya diserap oleh molekul-molekul yang sesuai dengan struktur dari molekul senyawa tersebut. Karena perbedaan energi antara tingkat dasar dengan tingkat tereksitasi spesifik untuk tiap-tiap senyawa, maka frekuensi yang diserap juga tertentu (panjang gelombang tertentu). Hasil penentuan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Gambar 1.

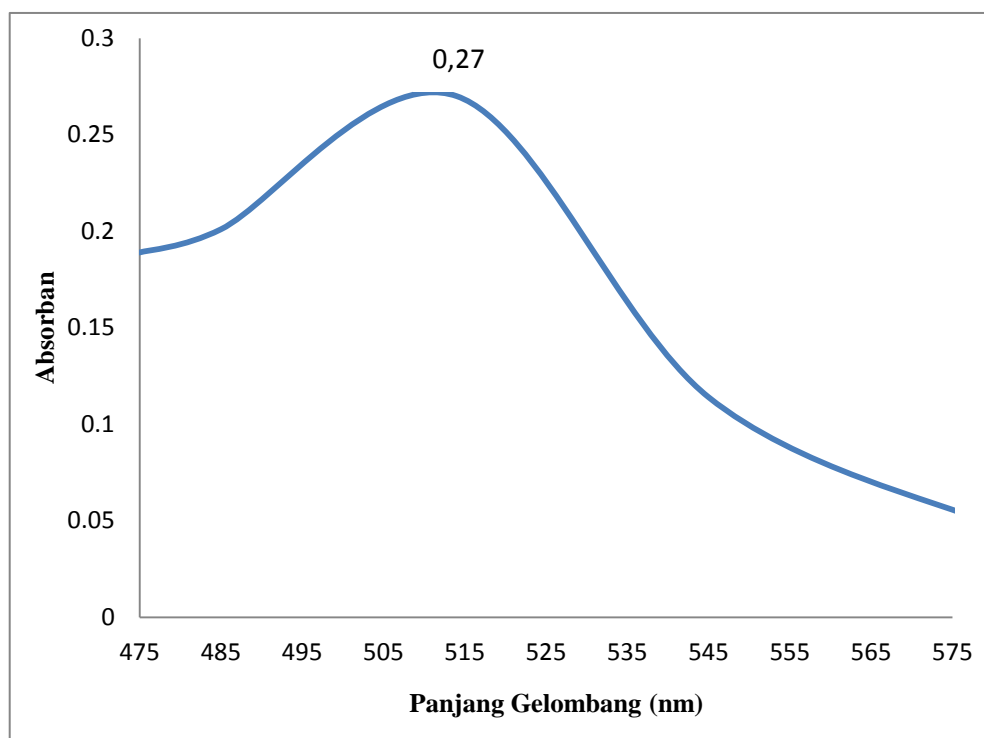
Dari Gambar 1 diatas terlihat bahwa absorban meningkat dengan bertambahnya panjang gelombang pengukuran dan mencapai absorban optimum pada panjang gelombang 514 nm. Sedangkan pada panjang

gelombang yang besar dari 514 nm terjadi penurunan absorban.

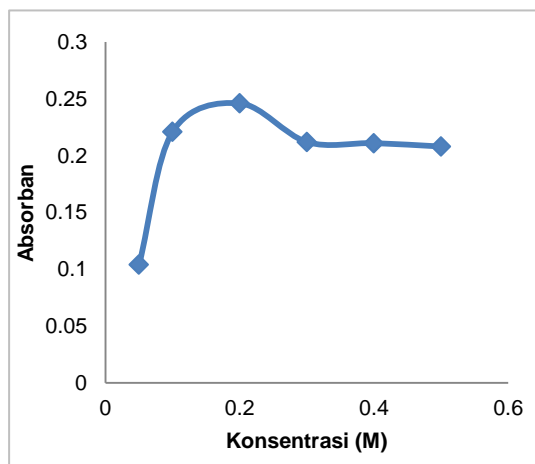
Pengaruh Konsentrasi FeCl_3

Besi (III) merupakan sumber dari besi (II) dimana besi (III) direduksi oleh asam sitrat menghasilkan besi (II) dan bereaksi dengan *ortho*-fenantrolin membentuk senyawa kompleks. Mol besi (III) yang ditambahkan harus berlebih dari mol asam sitrat yang digunakan. Hasil pengukuran konsentrasi Fe^{3+} terhadap absorban dapat dilihat pada Gambar 2.

Dari Gambar 2 terlihat bahwa absorban meningkat dengan bertambahnya konsentrasi Fe^{3+} dan mencapai optimum pada konsentrasi 0,2 M, sedangkan penambahan Fe^{3+} dengan konsentrasi besar dari 0,2 M, absorban terlihat turun. Berarti kelebihan Fe^{3+} yang terlalu besar akan memberikan gangguan dalam pengukuran, yang kemungkinan disebabkan oleh warna kuning dari Fe^{3+} akan mengganggu serapan warna kompleks $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$.



Gambar 1. Spektrum absorpsi dari senyawa kompleks $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$.

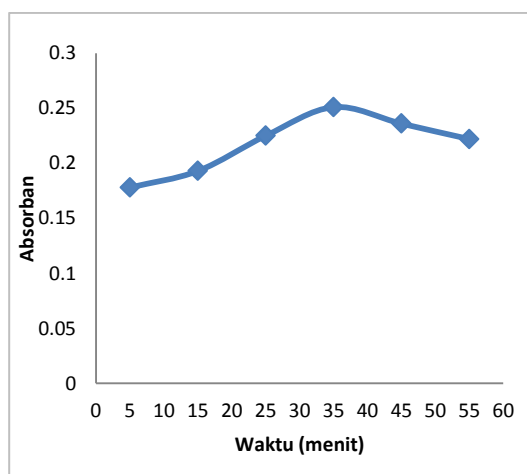


Gambar 2. Pengaruh konsentrasi Fe^{3+} .

Pengaruh Waktu Terhadap Kestabilan Kompleks $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$

Penentuan waktu kestabilan kompleks dalam metoda ini bertujuan untuk mengetahui selang waktu dimana warna kompleks yang terbentuk stabil dan baik digunakan untuk analisa. Setiap kompleks akan memiliki waktu kestabilan yang berbeda. Hasil penentuan waktu kestabilan dapat dilihat pada Gambar 3.

Dalam suatu reaksi kimia, ada waktu optimum untuk tercapainya reaksi yang sempurna, pada analisa ini waktu pengukuran serapan kompleks $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$ optimum adalah pada waktu 35 menit.



Gambar 3. Pengaruh waktu kestabilan senyawa kompleks $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$.

Validasi Metoda

Validasi metoda ini dilakukan untuk menguji dan membuktikan bahwa metoda ini bisa digunakan untuk penentuan antioksidan total dalam sampel jeruk, karena metoda ini baru dikembangkan. Parameter dari validasi metoda yang digunakan adalah: Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metoda yang digunakan untuk mendapatkan hasil uji yang secara langsung sebanding dengan konsentrasi analit dalam rentang kerja yang diberikan. Linearitas dapat ditentukan melalui kurva kalibrasi standar.

Dari kurva kalibrasi standar asam sitrat, konsentrasi asam sitrat sebanding dengan absorban (Gbr. 4). Dari kurva kalibrasi standar didapatkan persamaan regresi : $Y = 0,066 + 117,35X$, koefisien korelasi ($r = 0,995$), dan koefisien determinasi ($R^2 = 0,990$). Syarat linearitas dapat ditentukan dari koefisien korelasi dan koefisien determinasi yang mendekati = 1. Artinya kurva ini memiliki linearitas yang baik karena memiliki koefisien korelasi dan koefisien determinasi yang mendekati 1 sehingga dapat digunakan sebagai standar untuk penentuan kandungan antioksidan total.

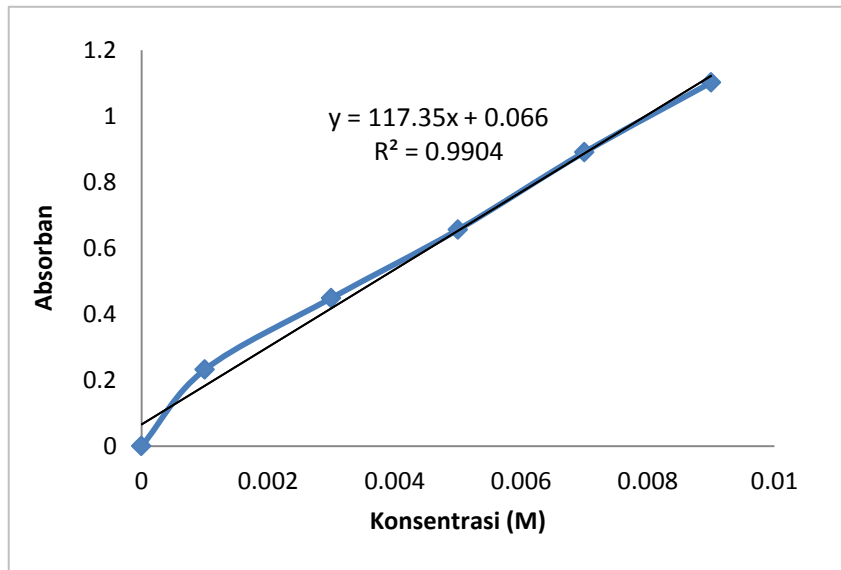
Batas Deteksi (LoD) dan Batas Kuantitasi (LoQ)

Batas deteksi (LoD) dan batas kuantitasi (LoQ) didasarkan pada persamaan regresi kurva kalibrasi standar. Konsentrasi terkecil analit yang dapat diukur adalah $1,15 \times 10^{-3} \text{M}$. Sedangkan batas kuantitas terkecil analit dalam sampel adalah $3,83 \times 10^{-3} \text{M}$.

Presisi

Presisi digunakan untuk mengetahui ketepatan ulang metoda yang digunakan. Semakin kecil harga yang diperoleh menunjukkan semakin baik metoda yang digunakan. Nilai presisi pada jeruk madu, dan jeruk purut, dan jeruk nipis adalah 1,6 %, 0,53% dan 2,15%.

Berdasarkan nilai presisi yang didapatkan maka metode ini dapat digunakan untuk menganalisis antioksidan total karena memiliki ketepatan ulangan yang baik.



Gambar 4. Kurva kalibrasi standar asam sitrat.

Aplikasi Metoda

Dari kondisi-kondisi optimum yang didapatkan, metoda ini dicoba diaplikasikan pada sampel jeruk madu, purut, dan nipis. Hasil pengukuran antioksidan total yang dihitung sebagai asam sitrat pada sampel jeruk madu, purut, dan jeruk nipis dapat dilihat pada Tabel 1.

perhitungan rekoverti dapat dilihat pada Tabel 2. Dari hasil perhitungan rekoverti rata-rata untuk setiap jenis adalah jeruk madu = 100,47 %, jeruk purut = 93,58 %, dan jeruk nipis = 93,78 %. Nilai rekoverti yang diperoleh menunjukkan bahwa ketepatan metoda pada penentuan konsentrasi antioksidan total dalam sampel cukup tinggi karena rekoverti yang baik adalah 100 ± 10%.

Recoveri ditujukan untuk membuktikan keakurasion metoda yang digunakan. Hasil

Tabel 1. Konsentrasi antioksidan total (dihitung sebagai asam sitrat) pada jeruk madu, purut dan nipis

No	Konsentrasi (M)		
	Jeruk madu	Jeruk purut	Jeruk nipis
1	1,832 x 10 ⁻³	1,823 x 10 ⁻³	1,772 x 10 ⁻³
2	1,823 x 10 ⁻³	1,283 x 10 ⁻³	1,789 x 10 ⁻³
3	1,849 x 10 ⁻³	1,840 x 10 ⁻³	1,811 x 10 ⁻³
4	1,883 x 10 ⁻³	1,815 x 10 ⁻³	1,738 x 10 ⁻³
5	1,891 x 10 ⁻³	1,832 x 10 ⁻³	1,721 x 10 ⁻³
Jumlah	9,278 x 10 ⁻³	9,134 x 10 ⁻³	8,835 x 10 ⁻³
Rata-rata	1,856 x 10 ⁻³	1,827 x 10 ⁻³	1,767 x 10 ⁻³

Tabel 2. Nilai Rekoveri penentuan antioksidan total pada sampel

No	% Perolehan kembali (Recovery)		
	Jeruk Madu	Jeruk Purut	Jeruk Nipis
1	101,28	94,79	95,61
2	99,66	92,37	91,96
Rata - rata	100,47	93,58	93,78

KESIMPULAN

Berdasarkan nilai yang didapatkan, dapat disimpulkan bahwa metode yang dikembangkan ini dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk penentuan antioksidan total pada sampel jeruk madu, purut, dan nipis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Dirjen Dikti yang telah memberikan bantuan dana melalui program PKM-P sehingga penelitian ini bisa terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. S. R. Tamat, Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau (*Ulva Reticulata Forsskal*), *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, Hal. 31-36, (2007)
2. E. Hanani, Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callyspongia* Sp Dari Kepulauan Seribu, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. II, No. 3, 127 – 133, (2005)
3. M. Contini, S. Baccelloni, R. Massantini, G. Anelli, Extraction of

Natural Antioxidant from Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Shell and Skin Wastes by Long Maceration at Room Temperature, *Food Chemistry*, 110, 659-669, (2008)

4. H. B. Li, C. C. Wong, K. Cheng, F. Chen, Antioxidant Properties in vitro and Total Phenolic Contents in Methanol Extract from Medicinal Plants, *LWT*, 41, 385-390, (2008)
5. M. Bandyopadhyay, M. R. Chakraborty, U. Raychaudhuri, Antioxidant Activity of Natural Plant Sources in Dairy Dessert (Sandesh) under Thermal Treatment, *LWT*, 41, 816-825, (2008)
6. J. Vichapong, M. Sookserm, P. Swatsitang, V. Srijesdauk, Prasan, S. Srijaranai, High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Phenolic Compounds and their Antioxidant Activities in Rice Varieties, *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1325-1330, (2010)
7. E. Porgal, E. Büyüktuncel, Determination of Phenolic Composition and Antioxidant Capacity of Native Red Wines by High Performance Liquid Chromatography and Spectrophotometric Methods, *Food Research International*, 45, 145–154, (2012)
8. M. Herrero, E. Ibáñez, J. Señorans, A. Cifuentes, Pressurized Liquid Extracts from *Spirulina platensis* Microalga, Determination of their Antioxidant Activity and Preliminary Analysis by Micellar Electrokinetic Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1047, 195–203, (2004)
9. S. Iqbal, M. I. Bharger, F. Anwar, Antioxidant Properties and Components of Bran Extracts from Selected Wheat Varieties Commercially Available in Pakistan, *LWT*, 40 : 361-367 (2007).
10. M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernandez-Lopez, E. Sendra, E. Sagas-Barbera, J. A. Perez-Alvarez, Antioxidant Properties (Punica

- Granatum L.) Bagases obtained as Co-Product in The Juice Extraction, *LWT*, 44 : 1217-1223, (2011).
11. R. Martinez, P. Torres, M. A. Maneses, J. G. Figueroa, J. A. Perez-Alvarez, M. Viuda-Martos, Chemical, Technological and In Vitro Antioxidant Properties of Cocoa (*Theobroma Cacao* L.) Co-Product, *LWT*, 48 : 39-45, (2012).
 12. C. F. Zuhra, J. Br. Tarigan, H. Sihotang, Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L) Merr.), *Jurnal Biologi Sumatera*, 3(1), 7-10, 2008
 13. F. T. C. Moreira, J. R. L. Guerreiro, R. Barros, M. G. F. Sales, The Effect of Method, Standard and Sample Components on The Total Antioxidant Capacity of Commercial Waters Assessed by Optical Conventional Assays, *Food Chemistry*, 134, 564–571, (2012)
 14. M. D. S. Raymundo, M. M. d. S. Paula, C. Franco, R. Fetta, Quantitative Determination of The Phenolic Antioxidants Using Voltammetric Techniques, *LWT*, 40, 1133–1139, (2007)
 15. T. Grindberg, K. Williams, Vitamin C quantification using reversed-phase ion-pairing HPLC. *Concordia College Journal of Analytical Chemistry*. 1 : 19-23 (2010).
 16. R. P. Caramit, A. G. F. Andrade, J. B. G. Souza, A New Voltammetric for The Simultaneous Determination of The Antioxidants TBHQ and BHA in Biodiesel using Multi-Walled Carbon Nanotube Screen-Printed Electrodes, *LWT*, 105 : 306-313, (2013).