

Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum* L)

Regina Andayani^{1*}, Maimunah², dan Yovita Lisawati³

¹Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang

²STIFI Yayasan Perintis Padang

Diterima tanggal : 20 Januari 2008 disetujui tanggal : 21 Maret 2008

Abstract

Analytical method for the determination of antioxidant activity expressed as percentage of inhibition, concentration of total phenolic and lycopene in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L) by using spectrophotometry UV-Visible has been done. The examination of antioxidant activity was performed on tomato methanol extract with concentration of 10 ; 30 ; 50 ; 70 and 90 µg/ml respectively by using DPPH (2,2 - difenil - 1 - pikrilhidrazil) radical gave percentage of inhibition of : 18 ; 32,8 ; 60,8 ; 81,0 and 92,5 % respectively. Concentration of phenolic total in fresh tomato was 1859,2 mg/kg calculated as gallic acid equivalent while concentration of lycopene was 14,725 ± 0,0017 mg/kg.

Keywords : antioxidant activity, total phenolic, lycopene, *Solanum lycopersicum* L

Pendahuluan

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung terus-menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya. Oleh karena itu tubuh memerlukan suatu substansi penting yaitu antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas tersebut sehingga tidak dapat menginduksi suatu penyakit (Kikuzaki, *et al.*, 2002; Sibuea, 2003).

Di dalam tubuh kita terdapat senyawa yang disebut antioksidan yaitu senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas, seperti: enzim SOD (Superoksida Dismutase), glutathione, dan katalase. Antioksidan juga dapat diperoleh dari asupan makanan yang banyak mengandung vitamin C, vitamin E dan betakaroten serta senyawa fenolik. Bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami, seperti rempah-rempah, coklat, biji-bijian, buah-buahan, sayur-sayuran seperti buah tomat, pepaya, jeruk dan sebagainya (Prakash, 2001; Trevor, 1995).

Disamping warnanya yang merah mempesona, ternyata tomat banyak mengandung vitamin A, vitamin C, mineral, serat, senyawa-senyawa fenolik dan karotenoid (Soehardi, 2004; Tugiyono, 2006).

Jenis senyawa karotenoid pada tomat adalah likopen yang merupakan pigmen yang menyebabkan warna merah. Potensi likopen sebagai antioksidan dan penangkap radikal bebas merupakan efek yang sangat bermanfaat bagi kesehatan manusia. Likopen juga dapat berinteraksi dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti H₂O₂ dan NO₂ (Lu, *et al.*, 1995; Woodall, *et al.*, 1997).

Tomat juga mengandung senyawa-senyawa fenolat seperti : kuersetin, naringenin, rutin dan asam klorogenat. Senyawa-senyawa fenolat, dapat menangkap radikal-radikal peroksida dan dapat mengkelat logam besi yang mengkatalisa peroksida lemak (Velioglu, 1998). Berdasarkan hal diatas maka dilakukan penelitian ini, dengan tujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan, kadar fenolat total, dan likopen dari buah tomat Untuk menentukan kadar fenolat total digunakan metoda Folin-Ciocalteu dengan senyawa pembanding asam galat. Sedangkan pada pengujian aktivitas antioksidan dengan metoda serapan radikal bebas DPPH, senyawa pembanding yang digunakan adalah asam askorbat (vitamin C).

Metode Penelitian

Alat

Alat yang digunakan adalah : Blender, kertas saring Whatman no. 1, cawan penguap, rotary evaporator, timbangan digital, labu ukur, plat tetes, pipet ukur, pipet mikro, spatel, aluminium

foil, oven, desikator, Erlenmeyer, kaca arloji, vial, gelas ukur, corong pisah, tabung reaksi, magnetik stirer, seperangkat alat spektrofotometer UV – Vis (Shimadzu 265).

Bahan

Bahan yang digunakan antara lain : buah tomat, Air suling, metanol p.a (Merck), asam galat p.a (Merck), Reagen Folin – Ciocalteu, natrium karbonat p.a (Merck), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) p.a (Merck), heksan p.a (Merck), aseton (Merck), etanol p.a (Merck), etanol 96%, vitamin C

Pembuatan Reagen

- Pembuatan larutan induk asam galat (5 mg/ml) (Waterhouse, 1999)
Ditimbang 0,25 g asam galat tambahkan 5 ml etanol 96 % tambahkan aquadest sampai 50 ml.
- Na_2CO_3 20 % (Waterhouse,1999)
Ditimbang 5 g Na_2CO_3 dan tambahkan 20 ml aquadest lalu dididihkan kemudian diamlkan selama 24 jam, saring dan encerkan dengan aquabidest sampai 25 ml.
- Larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Molyneux, 2004)
Ditimbang sebanyak 1,97 mg DPPH dan dilarutkan dengan metanol di dalam labu sampai 100 ml sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 50 μM .

Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan adalah buah tomat, yang diambil di daerah Batu Plano Padang Panjang.

Persiapan Sampel

Ditimbang 250 g tomat segar diblender selama 3 menit kemudian dimaserasi dengan 250 ml metanol selama 15 menit, sambil dikocok. Dilakukan 3 kali pengulangan kemudian saring dengan menggunakan kertas saring Whatman no 1, gabungkan filtrat. Filtrat dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator, sehingga diperoleh ekstrak yang dapat dituang. (Berat ekstrak total = 7,65 gram).

Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat dengan Reagen Folin – Ciocalteu (Waterhouse, ,1999)

Pembuatan larutan induk asam galat (5 mg/ml)

Ditimbang 0,25 g asam galat tambahkan 5 ml etanol 96 % tambahkan aquadest sampai 50 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 5 mg/ml. Dari larutan induk dipipet 6, 8, 10, 12, 14 ml dan diencerkan dengan aquadest sampai volume 100 ml, sehingga dihasilkan

konsentrasi 300, 400, 500, 600, dan 700 mg/L asam galat.

Dari masing-masing konsentrasi diatas dipipet 0,2 ml tambah 15,8 ml aquadest ditambah 1 ml Reagen Folin Ciocalteu kocok. Diamlkan selama 8 menit tambah 3 ml larutan Na_2CO_3 kocok homogen. Diamlkan selama 2 jam pada suhu kamar. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm, lalu buat kurva kalibrasinya hubungan antara konsentrasi asam galat (mg/L) dengan absorbansi.

Penentuan Kandungan Fenol Total dengan Metoda Folin – Ciocalteu (Orak, 2006)

Ditimbang 0,3 gram ekstrak kemudian dilarutkan sampai 10 ml dengan metanol : air (1 : 1). Dipipet 0,2 ml larutan ekstrak dan tambahkan 15,8 ml aquadest tambahkan 1 ml reagen Folin – Ciocalteu kocok. Diamlkan selama 8 menit kemudian ditambahkan 3 ml Na_2CO_3 20 % kedalam campuran, diamlkan larutan selama 2 jam pada suhu kamar. Diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm yang akan memberikan kompleks biru. Lakukan 3 kali pengulangan sehingga kadar fenol yang diperoleh hasilnya didapat sebagai mg ekuivalen asam galat/g sampel segar.

Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH (Okawa, 2001)

Dipipet sebanyak 3,8 ml larutan DPPH 50 μM dan ditambahkan 0,2 ml metanol. Setelah dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 - 800 nm.

Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan (Hanani, 2005; Okawa, 2001)

Ditimbang ekstrak sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan 10 ml metanol dalam labu ukur ad 10 ml, maka didapatkan konsentrasi 1 mg/ml. Kemudian lakukan pengenceran dengan menambahkan metanol sehingga diperoleh sampel dengan konsentrasi (10, 30, 50, 70, 90 $\mu\text{g/ml}$) Untuk penentuan aktivitas antioksidan masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,2 ml larutan sampel dengan pipet mikro dan masukan ke dalam vial, kemudian tambahkan 3,8 ml larutan DPPH 50 μM . Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap, serapan diukur dengan spektrofotometer UV - Vis pada panjang gelombang 515 nm. Sebagai pembanding

digunakan asam askorbat (konsentrasi 2,3,4,5,6 µg/ml) dengan perlakuan yang sama dengan sampel uji.

Penentuan Kadar Likopen (Sharma, 1996)

Tomat segar dihaluskan dengan blender kemudian ditimbang 5 gram, masukkan ke dalam Erlenmeyer bertutup yang dilapisi dengan kertas aluminium foil pada bagian luar & terlindungi dari cahaya tambahkan 50 ml larutan (heksana : aseton : etanol = 2 : 1 : 1) %, dikocok selama 30 menit dengan magnetik stirer, pindahkan ke corong pisah kemudian tambahkan 10 ml air suling kemudian dikocok lagi selama 15 menit. Pisahkan lapisan polar dan lapisan non polar, ambil semua lapisan atas (non polar) masukkan dalam labu ukur 100 ml tambahkan pelarut organik sampai tanda batas. Kadar likopen total ditentukan dari lapisan non polar (bagian atas) dengan spektrofotometer UV – Vis pada panjang gelombang maksimum 471 nm, dimana $E_{1cm}^{1\%} = 3450$.

Pengolahan Data

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Abs.kontrol} - \text{Abs.Sampel}}{\text{Abs.kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

Abs kontrol : Serapan radikal DPPH 50 µM pada panjang gelombang 515 nm.

Abs Sampel: Serapan sampel dalam radikal DPPH 50 µM pada panjang gelombang 515 nm

Nilai IC 50 masing-masing konsentrasi sampel dihitung dengan menggunakan rumus persamaan regresi linier. Sedangkan kadar likopen dihitung

dengan menggunakan rumus berikut : $C = \frac{A}{E_{1cm}^{1\%} \times b}$

Keterangan:

C = konsentrasi (g/100 ml), A= absorben, b = tebal kuvet (cm), dan $E_{1cm}^{1\%} = 3450$.

Hasil dan Pembahasan

Metoda ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan metanol karena cara ini merupakan metoda yang mudah dilakukan dan menggunakan alat-alat sederhana cukup dengan merendam sampel dalam pelarut. Semua filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi diuapkan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 7,65 gram dari 250 gram tomat segar.

Metoda yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metoda serapan radikal DPPH karena merupakan metoda yang sederhana, mudah, dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat (Hanani, 2005). Pengukuran aktivitas antioksidan sampel dilakukan pada panjang gelombang 515 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum DPPH, dengan konsentrasi DPPH 50 µM. Adanya aktivitas antioksidan dari sampel mengakibatkan perubahan warna pada larutan DPPH dalam metanol yang semula berwarna violet pekat menjadi kuning pucat (Permana, 2003)

Aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol buah tomat ini dinyatakan dalam persentase inhibisinya terhadap radikal DPPH. Persentase inhibisi ini didapatkan dari perbedaan serapan antara absorbansi DPPH dengan absorbansi sampel yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis.

Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC 50, yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % radikal bebas DPPH. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH terhadap ekstrak metanol pada konsentrasi 10, 30, 50, 70 dan 90 µg/ml, diperoleh IC 50 sebesar 44,06 µg/ml lebih besar dari vitamin C yaitu 3,63 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak dan vitamin C mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat karena mempunyai IC 50 kurang dari 200 µg/ml (Blouis, 1958). Pengujian aktivitas antioksidan pada berbagai konsentrasi ternyata pada konsentrasi yang tertinggi menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi tetapi apabila dibandingkan dengan vitamin C, sampel mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih rendah. Hasil pengujian dapat dilihat dalam Tabel 3.

Dari sejumlah penelitian pada tanaman obat dilaporkan bahwa banyak tanaman obat yang mengandung antioksidan dalam jumlah besar. Efek antioksidan terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti flavonoid, asam fenolat. Biasanya senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi ortho dan para terhadap gugus -OH dan -OR. Setelah dilakukan pemeriksaan kandungan kimia ternyata tomat mengandung fenolat dan flavonoid, maka dilanjutkan dengan penentuan kandungan fenolat total.

Pada penentuan kadar senyawa fenolat total digunakan asam galat sebagai larutan standar. Serapan maksimum asam galat diperoleh pada panjang gelombang 765 nm. Sebelum dilakukan pemeriksaan kadar fenolat total, terlebih dahulu dibuat kurva kalibrasi larutan standar asam galat dengan konsentrasi 300; 400; 500; 600; 700 mg/L. Pembuatan kurva kalibrasi ini berguna untuk membantu menentukan kadar fenol dalam sampel melalui persamaan regresi dari kurva kalibrasi. Dari pemeriksaan larutan standar asam galat didapat kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $Y = 0,0385 + 0,000771x$ dan harga koefisien korelasi (r) yaitu 0,9990; simpangan baku (SB) = 0,00616; batas deteksi (BD) = 23,976 mg/L; dan batas kuantisasi = 79,919 mg/L. Nilai r yang mendekati 1 membuktikan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier dan simpangan baku yang kecil menunjukkan ketepatan yang cukup tinggi. Tabel dan kurva kalibrasi asam galat dapat dilihat pada Tabel 1, dan Gambar 1.

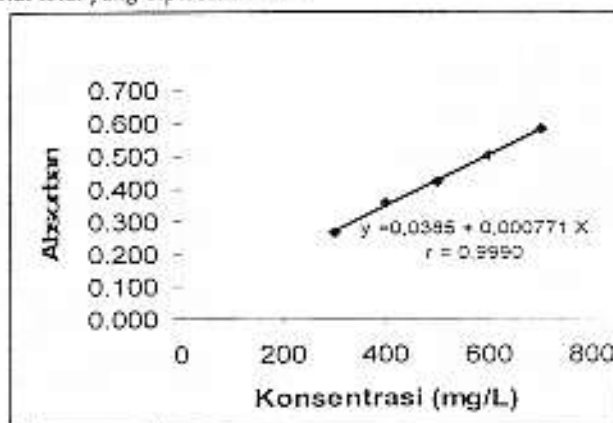
Konsentrasi larutan sampel dapat ditentukan dengan menggunakan kurva kalibrasi dengan cara mengukur absorbansi sampel kemudian kadar fenolat total dalam tomat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear. Kandungan fenolat total dalam ekstrak metanol buah tomat adalah 546,947 mg/L yang setara dengan 1859,46 mg/kg tomat segar (Tabel 2). Data-data yang diperoleh ini cukup akurat dan teliti dimana dapat dilihat dari nilai koefisien variansi yang kecil dari 2 % yaitu 0,759 % dan nilai batas kuantisasi 79.919 mg/L. Kadar fenolat total yang diperoleh dalam

ekstrak adalah 546,947 mg/L, jadi melebihi nilai batas kuantisasi. Dimana batas kuantisasi merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Miller, 1993; Riley, 1996)

Pada Gambar 3 adalah hasil spektrum serapan likopen dalam pelarut (heksana : etanol : aseton = 2 : 1 : 1) v/v; $\lambda_{max} = 471$ nm dan serapan = 0,542. Kadar likopen total dari lapisan non polar (bagian atas) dihitung dengan menggunakan nilai $E_{1\%}^{1cm}$ dari persamaan Lambert-Beer, sehingga diperoleh kadar likopen sebesar 14,725 mg/kg tomat segar.

Tabel 1. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar asam galat pada panjang gelombang 765 nm dengan spektrofotometer UV-Vis

No	Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi
1	300	0,267
2	400	0,355
3	500	0,418
4	600	0,500
5	700	0,580



Gambar 1. Kurva kalibrasi asam galat dalam reagen Folin-Ciocalteu pada panjang gelombang 765 nm, persamaan regresi linier $Y = 0,0385 + 0,000771 X$, $r = 0,9990$, SD = 0,00616, BD = 23,976 mg/L dan BK = 79,919 mg/L.

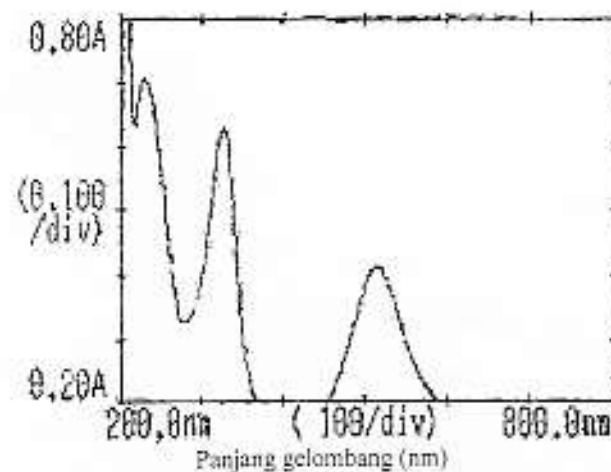
Keterangan: SD = standar deviasi, BD = batas deteksi, dan BK = batas kuantisasi

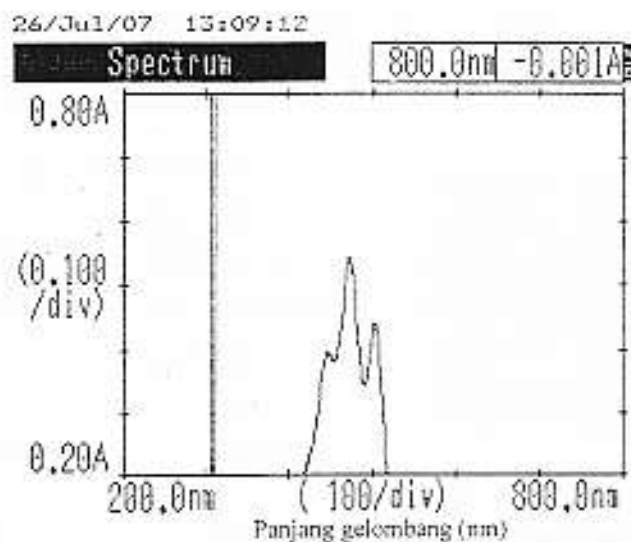
Tabel 2. Penentuan kadar fenolat total dalam sampel menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm

Pengulangan	A	C (mg/L)	\bar{C} (mg/L)	Kadar fenolat (mg/kg) Sampel segar	SD	KV (%)
I	0,451	535,019	536,217	1823,08	2,075	0,387
	0,453	538,613				
	0,451	535,019				
II	0,434	512,970	509,511	1732,30	8,339	1,637
	0,436	515,564				
	0,424	500,000				
III	0,498	595,979	595,114	2023,34	1,498	0,252
	0,496	593,385				
	0,498	595,979				
\bar{X}			546,947	1859,46	3,971	0,759

Tabel 3. Aktivitas antioksidan ekstrak metanol tomat dan vitamin C menggunakan metoda DPPH

Pembanding	Konsentrasi (ug/ml)	A	% Inhibisi	IC ₅₀ (ug/ml)
Tomat	10	0,337	18,0	44,06
	30	0,276	32,8	
	50	0,161	60,8	
	70	0,078	81,0	
	90	0,031	92,5	
Vitamin C	2	0,312	24,09	3,63
	3	0,235	42,82	
	4	0,189	54,01	
	5	0,123	70,07	
	6	0,065	84,18	

Gambar 2. Spektrum serapan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) 50 μ M dalam metanol, λ_{max} = 515 nm, serapan = 0,411



Gambar 3. Spektrum serapan likopen dalam pelarut (heksana : etanol : aseton = 2 : 1 : 1)
v/v. λ max = 471nm, serapan = 0,542

Tabel 4. Hasil pengukuran absorbansi dan kadar likopen dalam sampel menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 471 nm

Pengulangan	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{A}	SD
1	0,252	0,253	0,253	0,253	0,0006
2	0,257	0,253	0,253	0,254	0,0023
3	0,257	0,254	0,253	0,255	0,0021
X				0,254	0,0017

$$\text{Perhitungan kadar Likopen : } C = \frac{A}{E_{1\%}^{1\text{cm}} \times b}$$

Dimana :

$$A = 0,254, b = 1 \text{ cm dan } E_{1\%}^{1\text{cm}} = 3450$$

$$C = \frac{0,254}{3450 \times 1 \text{ cm}}$$

$$= 0,000073623 \text{ g/100 ml}$$

$$= 14,725 \text{ mg/kg sampel segar}$$

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak metanol buah tomat mempunyai kemampuan meredam radikal bebas DPPH (IC 50 = 44,06 $\mu\text{g/ml}$) lebih kecil dari pada kemampuan vitamin C (IC 50 = 3,63 $\mu\text{g/ml}$).
2. Kadar fenolat total yang terdapat pada tomat segar adalah setara dengan asam galat 1859,46 mg/kg tomat segar.
3. Kadar likopen adalah $14,725 \pm 0,0017$ mg/kg tomat segar.

Daftar Pustaka

- Bleuis, M.S., 1958, "Antioxidant Determinations By The Use Of a Stable Free Radical", *Nature*, 1199-1200.
- Hanani, E. A. Mun'im, R. Sekarini, 2005, "Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callispongia* SP Dari Kepulauan Seribu", *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol II, No 3, 127-133.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., and Taniguchi, H., 2002; "Antioxidants Properties of Ferulic Acid and Its Related Compound", *J. Agric. Food Chem.*, 50:2161-2168.
- Lu, Y., et al., 1995, "A New Carotenoid, Hydrogen Peroxide Oxidation Products from Lycopene", *BioScience of Biotechnology and Biochemistry*, 59: 2153-2155.
- Miller, J.C., and J.N. Miller, 1993, *Statistics for Analytical Chemistry*, 3rd ed., Ellis Horwood PTR Prentice Hall, New York.
- Molyneux, P., 2004, "The Use Of The Stable Free Radical Diphenyl Picrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity", *J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211-219.

- Okawa, M., J. Kinjo, T. Nohara and M.ono, 2001, "Modification Method DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radical Scavenging Activity Of Flavonoids Obtained From Some Medicinal Plants", *Biol. Pharm. Bull.*, 24 (10), 1202-1205
- Orak, H.H., 2006, "Total Antioxidant Activities, Phenolics, Anthocyanins, Polyphenoloxidase Activities In Red Grape Varieties", *Electronic Journal of Polish Agricultural University Food Science and Technology*, Volume 9, Issu - 118 htm.
- Permana, D.,N. Hj. Lujis, Faridah Abas, A. Ghafar othman, Rohaya Ahmad, Mariko Kitajama, Hiromitsu Takayama, Nario Aimi, Ci, 2003, "Antioxidative Constituents Of Hedotis Diffusa Wild", *Natural Product Sciences*, 9(1), 7-9.
- Prakash, A., 2001, " *Antioxidant Activity* " Medallion Laboratories : Analytical Progres Vol 19 No : 2. 1 - 4.
- Riley, C.M., and T.W. Rosanske, 1996, *Development and Validation of Analytical Methods*, 1st ed., Vol.3, Elsevier Science Ltd, United Kingdom
- Sharma SK, 1996, Sharma SK and Le Maguer M, "Lycopene in Tomatoes and Tomato Pulp Fractions", *Ital J Food Sci* 2 : 107 - 113.
- Sibuea, P., 2003, *Antioksidan Senyawa Ajaib Penangkal Penuaan Dini*, Sinar Harapan, Yogyakarta.
- Soehardi, S., 2004, *Memelihara Kesehatan Jasmani Melalui Makanan*, ITB, Bandung.
- Trevor R, 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Kosasih, Padmawinata, Edisi 6, ITB, Bandung.
- Tugiyono, H., 2006, *Bertanam Tomat*, Penebar Swadaya, Jakarta,
- Velioglo, YS, Mazza G, Gao L and Oomah, B.D, 1998, "Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables and Grain Product", *J. Agric. Food Chem.*, 46:4113 - 4117
- Waterhouse, A, 1999, *Folin - Ciocalteu Micro Method For Total Phenol In Wine*, Department Of Viticulture & Enology University Of California, Davis, 152-178.
- Woodall, A.A., S.W.Lee, R.J. Weesie, M.J. Jackson, and G.Britton, 1997, "Oxidation of Carotenoids by Free Radicals; Relationship between Structure and Reacivity". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336: 33-42.