

Uji Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas Ekstrak Etanol Daun Mangkokan (*Nothopanax scutellarium* (Burm.f) Merr.) Menggunakan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) dengan Variasi Suhu Pengeringan

DPPH Free Radical Scavenging Activity Of Ethanolic Mangkokan Leaves (*Nothopanax scutellarium* (Burm.f) Merr.) Extract With Drying Temperature Variations

Fitri Farida, Any Guntarti

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta

Naskah diterima tanggal 7 Oktober 2017

ABSTRACT

Mangkokan leaves contains flavonoids that are known as natural antioxidant source. The aim of this study is to find the effect of drying temperature variations towards free radical scavenging activity of mangkokan leaves. Mangkokan leaves macerated with 96% ethanol and dried at 40°C, 50°C, and 60°C. Then were macerated with ethanol 96%. Antioxidant activity tested by DPPH method and quercetin was used as positive control. Dry shrinkage with temperatures at 40°C, 50°C, and 60°C were: (9.25 ± 0.276)%; (8.76 ± 0.348)% and (7.97 ± 0.372)%, respectively. Water content at 40°C, 50°C and 60°C were: (5.13 ± 0.575)%; (4.53 ± 0.512)% and (4.04 ± 0.575)%, respectively. The antioxidant potency of 96% ethanolic mangkokan leaves by ES₅₀ value at drying temperatures 40°C, 50°C, 60°C and quercetin were (1.75 ± 0.058); (2.39 ± 0,089); (5.38 ± 0,078) mg/ml and (9.16x10⁻⁴ ± 4.36x10⁻⁵) mg/ml. Ethanolic extract of mangkokan leaves which dried at 40°C has biggest radical DPPH scavenging activity but much weaker than quercetin.

Keywords: mangkokan leaf, temperature variatio, antioxidant, DPPH.

ABSTRAK

Daun mangkokan diketahui mempunyai kandungan flavonoid serta merupakan sumber antioksidan alami. Penelitian ini bertujuan mengetahui adanya pengaruh variasi suhu pengeringan simplisia terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas pada daun mangkokan. Daun mangkokan yang dikeringkan dengan suhu 40°C, 50°C, dan 60°C. Dan dimaserasi menggunakan etanol 96%. Potensi Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan kuersetin sebagai kontrol positif. Susut pengeringan pada suhu 40°C, 50°C, dan 60°C berturut-turut adalah (9,25 ± 0,276)%, (8,76 ± 0,348)% dan (7,97 ± 0,372)%. Kadar air pada suhu 40°C, 50°C dan 60°C berturut-turut sebesar (5,13±0,575)%, (4,53± 0,512)% dan (4,04 ± 0,575)%. Aktivitas antioksidan dengan nilai ES₅₀ pada suhu 40°C, 50°C, 60°C dan kuersetin berturut-turut sebesar (1,75 ± 0,058) mg/ml; (2,39 ± 0,089) mg/ml; (5,38 ± 0,078) mg/ml dan (9,16 x 10⁻⁴ ± 4,36 x 10⁻⁵) mg/ml. Ekstrak etanol daun mangkokan yang dikeringkan pada suhu 40°C memiliki kemampuan menangkap radikal bebas DPPH paling besar tetapi jauh lebih lemah dari kuersetin.

Kata kunci: daun mangkokan, variasi suhu, antioksidan, DPPH.

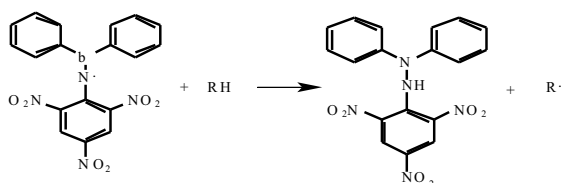
PENDAHULUAN

Radikal bebas menjadi penyebab utama timbulnya berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, atherosklerosis, diabetes melitus, jantung koroner (Winarti, 2010). Antioksidan adalah substansi yang dapat menetralkan atau meredakan radikal bebas melalui mekanisme penambahan gugus elektron kepada gugus elektron radikal bebas yang tidak berpasangan sehingga menjadi stabil (Mindasari, 2010). Antioksidan terbukti mampu menunda, memperlambat, atau menghambat reaksi oksidasi (Pokorny *et al.*, 2001).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Triguspita *et al.*, (2000), daun mangkoka mengandung tanin, flavonoid dan saponin. Flavonoid diketahui mampu berperan menangkap radikal bebas atau sebagai antioksidan alami (Handayani *et al.*, 2014).

Salah satu metode pengukuran aktivitas antioksidan adalah DPPH. Uji peredaman radikal DPPH merupakan uji dekolorisasi untuk mengukur kemampuan antioksidan yang secara langsung bereaksi dengan (meredakan) radikal DPPH dengan memantau absorbansinya pada 517 nm dengan spektrofotometer. (Boer, 2000; Borah *et al.*, 2011). Reaksi antara radikal dengan senyawa penangkap radikal dapat dilihat pada Gambar 1.

Pemanfaatan daun mangkoka belum maksimal, maka perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan variasi suhu pengeringan simplisia. Dengan variasi suhu pengeringan ini dimaksudkan untuk mendapatkan suhu optimal yang dapat digunakan untuk mengeringkan daun mangkoka sebagai antioksidan dengan kadar yang paling tinggi. Pada penelitian ini akan dilakukan penelitian tentang pengaruh pengeringan simplisia pada suhu 40°C, 50°C dan 60°C terhadap aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun mangkoka dengan metode DPPH, selain itu dalam penelitian dilakukan juga penetapan susut pengeringan dan kadar air.



Gambar 1. Reaksi Penangkapan Radikal DPPH oleh antioksidan (Yamaguchi *et al.*, 1998)

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan adalah almari pengering, alat-alat gelas, neraca analitik, Halogen Moisture Analyzer (Mettler Toledo), rotary evaporator, dan spektrofotometer UV-Visibel (Shimadzu UV PharmaSpec 1800).

Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun mangkoka yang diambil dari desa Banjurmukadan, kabupaten Kebumen, standar kuersetin, etanol 96%, etil asetat, etanol p.a, FeCl₃, Toluena, HCl p., Serbuk Mg, Asam formiat, Aquadest dan DPPH.

Metode Penelitian

1. Persiapan Sampel

Daun mangkoka diperoleh dari desa Banjurmukadan, kecamatan Buluspesantren, Kabupaten Kebumen, Jawa Tengah pada bulan Februari tahun 2015.

2. Pembuatan ekstrak etanol daun mangkoka

Daun mangkoka yang telah dibersihkan, dikeringkan dan diayak pada berbagai variasi suhu pengeringan ditimbang sebanyak 250 gram. Daun mangkoka dimaserasi dengan perbandingan simplisia dan pelarut 1:4 yaitu menggunakan 1 liter etanol 96%, diaduk dengan pengaduk elektrik dengan kecepatan 500 rpm selama 3 jam. Maserasi didiamkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, maserat disaring dan dipisahkan dari ampasnya menggunakan corong Buchner. dan filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian diuapkan di atas penangas air dengan suhu 50°C. Ekstrak kental didiamkan dalam suhu kamar. Maserasi dilakukan hingga 3 kali sampai ampas tidak memberikan warna hijau-biru, hitam pekat dengan FeCl₃.

3. Uji standarisasi

Uji kadar air dengan destilasi toluena dan uji kadar abu total (Warsi and Guntarti, 2017).

4. Uji kualitatif kandungan ekstrak

Uji kandungan polifenol dengan pereaksi FeCl₃, Uji kandungan flavonoid dengan uap amoniak (Robinson, 1991), uji kandungan kuersetin dengan KLT (fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak toluena : etil asetat : asam formiat (5 : 4 : 1) (Markam, 1988).

5. Uji Pendahuluan Aktivitas Antioksidan

Uji adanya aktivitas antioksidan dengan menggunakan larutan DPPH 0,15 mM.

6. Pembuatan larutan kontrol positif kuersetin

Kontrol positif dibuat dengan membuat larutan seri konsentrasi 0,25; 0,5; 0,75; 1,00, dan 1,25 µg/ml standar kuersetin.

Uji aktivitas antioksidan terdiri dari :

- 1. Penentuan panjang gelombang serapan maksimal**
- 2. Pengukuran absorbansi penangkapan radikal bebas DPPH**

Masing-masing 1,0 ml larutan sampel dan larutan kontrol positif dengan berbagai konsentrasi dikocok kuat dengan 1,0 ml larutan DPPH 0,15 mM. Campuran larutan tersebut disimpan ditempat gelap selama operating time. Kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang serapan maksimal DPPH yang telah ditetapkan terlebih dahulu dengan spektrofotometri UV-Vis. Dilakukan 5 kali replikasi pada tiap konsentrasi larutan. Larutan blanko digunakan adalah etanol p.a.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Persiapan Sampel

Pengeringan bertujuan untuk menjaga suhu yang tidak terlalu tinggi supaya zat aktif yang dibutuhkan tidak rusak sehingga bisa diamati suhu optimum untuk mengeringkan daun mangkoka, selain itu dapat juga mengurangi kadar air pada bahan uji sehingga didapatkan bahan uji yang tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Hasil rendemen ekstrak etanol daun mangkoka disajikan pada Tabel 1.

Nilai rendemen ini menunjukkan keefektifan proses ekstraksi. Keefektifan proses ekstraksi dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan sebagai penyari, ukuran partikel simplisia, metode dan lamanya ekstraksi. Hasil rendemen ini dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah simplisia yang diperlukan untuk mendapatkan ekstrak sejumlah yang diinginkan (Sharma and Bhat, 2009).

2. Susut Pengeringan

Penetapan susut pengeringan dilakukan untuk mengetahui banyaknya kandungan air dan minyak yang menguap dibawah suhu 105° C yang ada dalam serbuk setelah mengalami proses pengeringan. Standar susut pengeringan serbuk daun mangkoka adalah kurang dari 10% (Warsi and Guntarti, 2013). Hasil perhitungan susut pengeringan serbuk daun mangkoka dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Daun Mangkoka

Kelompok perlakuan	Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Suhu 40° C	251	56,90	22,67
Suhu 50° C	252	58,75	23,31
Suhu 60° C	251	61,50	24,50

Tabel 2. Hasil Penetapan Susut Pengeringan Serbuk Daun Mangkoka

Kelompok Perlakuan	Replikasi	Rata-rata ± LE (%)	CV (%)
Suhu 40°C	3	9,25 ± 0,276	0,01
Suhu 50°C	3	8,76 ± 0,348	0,02
Suhu 60°C	3	7,97 ± 0,372	0,02

Ket. LE = *Limit of Error*, CV = *Coevisien Variasi*

Dari Tabel 2 diatas, dapat dilihat bahwa semakin tinggi suhu pengeringan simplisia, semakin kecil kandungan air dan minyak yang menguap. Ini dikarenakan pada suhu 60° C, air dan minyak yang terkandung di dalam daun mangkoka lebih mudah untuk menguap pada saat proses pengeringan simplisia dibandingkan pada suhu 40°C dan 50°C. Hasil uji susut pengeringan menunjukkan bahwa serbuk daun mangkoka memenuhi persyaratan yaitu tidak ada satupun yang lebih dari 10%.

3. Uji Kadar Air Ekstrak Etanol Daun Mangkoka

Ekstrak etanol daun mangkoka yang didapat diuji kadar air untuk mengetahui jumlah kandungan air yang terkandung didalam ekstrak apakah memenuhi persyaratan atau tidak. Ekstrak kental yang baik mempunyai persyaratan kadar air tidak lebih dari 10%. Hasil penetapan kadar air ekstrak etanol daun mangkoka dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil yang didapat pada tabel diatas menunjukkan bahwa kadar air yang terkandung dalam ekstrak etanol daun mangkoka memenuhi persyaratan dengan tidak ada satu pun yang lebih dari 10%. Semakin tinggi suhu kadar air ekstrak etanol daun mangkoka semakin kecil.

4. Uji Kadar Abu Total Ekstrak Etanol Daun Mangkoka

Kadar abu total perlu diuji untuk mengetahui gambaran kandungan mineral internal dan eksternal termasuk kandungan senyawa anorganik yang terkandung di dalam

Tabel 3. Hasil Kadar Air Ekstrak Etanol Daun Mangkoka

Sampel variasi suhu pengeringan	Kadar Rata-rata (%)	CV (%)
40°C	5,13	1,24
50°C	4,53	1,25
60°C	4,04	1,58

Tabel 4. Hasil Uji Kadar Abu Total Ekstrak Etanol Daun Mangkokan

Sampel variasi suhu pengeringan	Replikasi	Kadar Rata-rata ± LE (%)	CV (%)
40°C	3	0,43 ± 0,01	1,33
50°C	3	0,34 ± 0,08	5,09
60°C	3	0,34 ± 0,05	5,88

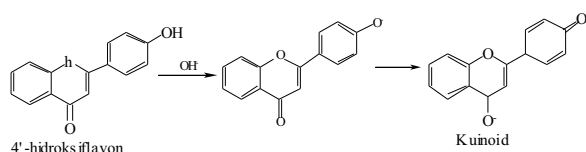
ekstrak. Dilakukan dengan pengabuan ekstrak dalam krus porselin di dalam tanur pada suhu 600° C. Jumlah dan komposisi abu dalam mineral tergantung pada jenis bahan serta metode analisis yang digunakan. Kadar abu yang tinggi menunjukkan kandungan logam yang tinggi akan menurunkan aktivitas antioksidan karena selain menangkap radikal bebas, antioksidan juga mengkhelat logam (Sibuea, 2004). Kadar abu total dikatakan memenuhi persyaratan apabila kurang dari 10% (Sharma and Bhat, 2009). Hasil penetapan kadar abu total ekstrak etanol daun mangkokan dapat dilihat pada Tabel 4.

Semua hasil penetapan kadar abu total kurang dari 0,5%, ini menunjukkan bahwa ekstrak yang digunakan kandungan kadar abu total memenuhi batas yang disyaratkan. Kandungan kadar abu total tertinggi terdapat pada suhu 40° C.

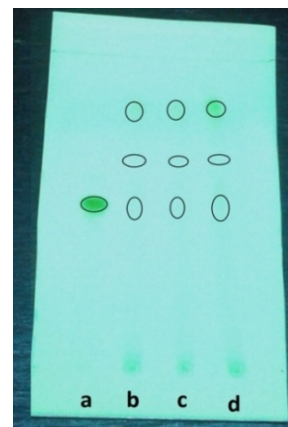
5. Uji kualitatif kandungan ekstrak

a. Uji kandungan polifenol dilakukan dengan menggunakan pereaksi FeCl₃. Warna yang terbentuk merupakan hasil reaksi antara senyawa polifenol dan feri klorida membentuk kompleks Fe³⁺ - polifenol yang berwarna hijau-biru. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun mangkokan positif mengandung polifenol (Mandal *et al.*, 2009). Reaksi yang terjadi pada saat sampel diuapi uap amoniak dapat dilihat pada Gambar 2.

b. Uji kandungan kuersetin dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Gupta *et*



Gambar 2. Reaksi Pembentukan Struktur Kuinoid pada Flavonoid (Robinson, 1995)



Gambar 3. Hasil Uji KLT kuersetin. Keterangan a (kuersetin), b (sampel suhu 40°C), c (sampel suhu 50°C), dan d (sampel suhu 60°C)

et al., 2011). Ekstrak etanol daun mangkokan positif mengandung kuersetin ditunjukkan dengan harga Rf ekstrak etanol daun mangkokan yang hampir mendekati Rf standar (Sangi *et al.*, 213). Hasil elusi KLT disajikan pada Gambar 3.

6. Uji Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas DPPH

a. Penentuan panjang gelombang serapan maksimal

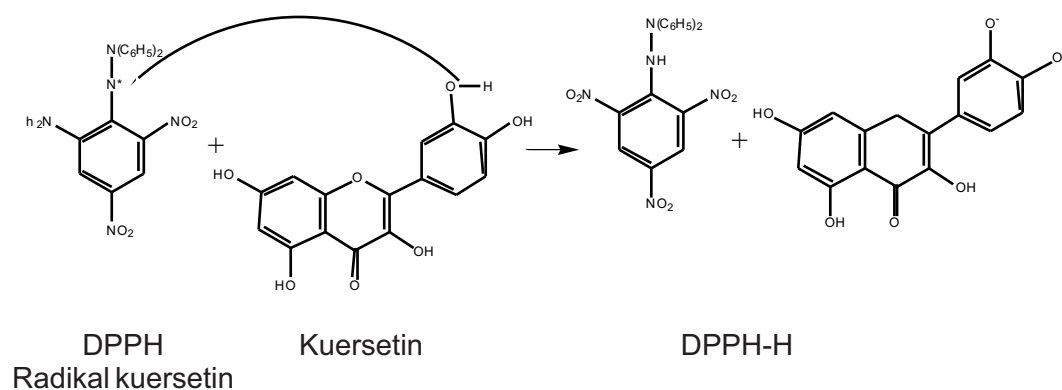
Hasil pengukuran panjang gelombang serapan maksimal pada ekstrak etanol suhu 40°C adalah 516,2 nm, ekstrak etanol suhu 50° C, dan ekstrak etanol suhu 60° C adalah 516,4 nm.

b. Pengukuran aktivitas antioksidan

Nilai aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persen aktivitas penangkapan radikal bebas yang diperoleh dengan membandingkan selisih absorbansi larutan kontrol negatif dengan larutan uji terhadap absorbansi larutan kontrol positif (Kumar dan Pandey, 2013). Kemampuan larutan ekstrak daun mangkokan dalam menangkap radikal bebas DPPH dapat dilihat dari berkurangnya intensitas warna ungu dari larutan DPPH setelah ditambahkan larutan uji (Gandhimathi *et al.*, 2012). Reaksi penangkapan radikal bebas oleh flavonoid (kuersetin) dapat dilihat pada Gambar 4.

Parameter yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan adalah nilai ES₅₀. Parameter ES₅₀ digunakan untuk menggambarkan penangkapan radikal bebas oleh sampel yang mengandung polifenol (contoh kuersetin). Sedangkan parameter IC₅₀ diartikan penghambatan 50% oleh sampel yang mengandung polifenol. Hasil uji aktivitas dengan parameter ES₅₀ disajikan pada Tabel 5.

Standar kuersetin sebagai kontrol positif mempunyai nilai ES₅₀ sebesar (9,16x10⁻⁴ ± 4,36x10⁻⁵) mg/ml, nilai ES₅₀ ekstrak etanol daun



Gambar 4. Reaksi Antara Antioksidan (Flavonoid) dengan Radikal DPPH (Windono, 2001)

mangkokan berturut-turut adalah suhu 60° C > suhu 50° C > suhu 40° C > kuersetin. Nilai ES₅₀ kuersetin yang paling kecil. Semakin besar persen penangkapan radikal bebas maka semakin kecil ES₅₀. Potensi antioksidan ekstrak etanol daun mangkogan yang dikeringkan pada suhu 60°C lebih rendah daripada potensi antioksidan kuersetin, suhu 40°C dan 50°C. Hal ini dikarenakan pada daun mangkogan yang dikeringkan pada suhu 60°C mengalami proses pemanasan yang paling tinggi, sedangkan flavonoid dan polifenol yang terkandung di dalam daun mangkogan memiliki sifat yang tidak tahan terhadap pemanasan. Gambar 5 disajikan histogram hasil ES₅₀ pada perbedaan variasi suhu pengeringan.

Pada Gambar 5 terlihat ES₅₀ dari masing-masing perlakuan suhu pengeringan memberikan hasil yang berbeda. Hasil uji statistik dengan Kruskal Wallis diperoleh hasil yang berbeda signifikan, yang berarti bahwa suhu pengeringan sangat mempengaruhi aktivitas antioksidan dan nilai ES₅₀. Semakin tinggi suhu pengeringan, semakin tinggi nilai ES₅₀, berarti

potensi sebagai antioksidan semakin kurang baik.

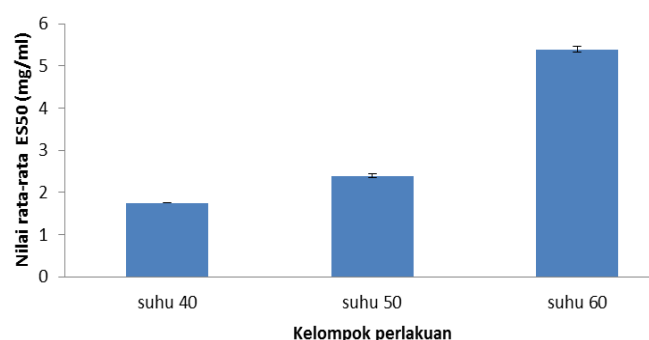
KESIMPULAN

Hasil penelitian nilai ES₅₀ ekstrak etanol daun mangkogan yang dikeringkan pada suhu 40°C, 50°C dan 60°C memiliki perbedaan yang bermakna. Nilai ES₅₀ rata-rata dari ekstrak etanol daun mangkogan yang dikeringkan pada suhu 40°C, 50°C dan 60°C berturut-turut (1,75 ± 0,058); (2,39 ± 0,089), dan (5,38 ± 0,078) mg/ml. Standar kuersetin mempunyai nilai ES₅₀ sebesar (9,16x10⁻⁴ ± 4,36x10⁻⁵) mg/ml. Aktivitas antioksidan pada daun mangkogan paling tinggi pada pada suhu pengeringan 40°C. Namun demikian potensi sebagai antioksidan sangat lemah jika dibandingkan dengan kuersetin.

Tabel 5. Nilai ES₅₀ dari ekstrak etanol daun mangkogan pada variasi suhu pengeringan

Sampel variasi suhu pengeringan	replikasi	Kadar Rata-rata ± LE (%)	CV (%)
40° C	5	1,75 ± 0,058	2,64
50° C	5	2,39 ± 0,089	3,01
60° C	5	5,39 ± 0,078	1,17
Quersetin	5	9,16x10 ⁻⁴ ± 4,36x10 ⁻⁵	1,56

Ket. LE = *Limit of Error*, CV = *Coevisien Variasi*



Gambar 5. Grafik Nilai Rata-rata ES₅₀ Ekstrak Etanol Daun Mangkogan pada Berbagai Suhu Pengeringan

DAFTAR PUSTAKA

- Boer, Y. 2000. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Kandis (*Garcinia parvifolia* Miq). *Jurnal Matematika dan IPA*. 1 (1): 26-33.
- Borah, A., Yadav, R.N.S., and Unni, B.G. 2011. In Vitro Antioxidant And Free Radical Scavenging Activity Of *Alternanthera Sessilis*. *IJPSR*. 2 (6): 1502-1506.
- Gandhimathi, R., Vijayaraj S., and Jyothirmaie M.P. 2012. Analytical Process Of Drugs by Ultraviolet (UV) Spectroscopy-A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis*. 2 (2): 72-78.
- Gupta, Rajiv, Sakshi Sehgal, and Shubhini A.S. 2011. Quantitative Estimation of Quercetin in *Mimusops elengi* L. (Bakul) Leaves by HPTLC. *Der Pharmacia Lettre*. 3(5): 12-19.
- Handayani, D., Mun'im, A., and Ranti, A.S. 2014. Optimization Of Green Tea Waste Axtraction Using Microwave Assisted Extraction To Yield Green Tea Extract. *Traditional Medicine Journal*. 19(1): 29-35.
- Kumar, S., and Pandey, A.K. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. Article ID 162750.
- Mandal, S., Yadav, S., Yadav, Sunita, and Nema, R.K. 2009. Antioxidants: A Review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Researc*. 1 (1): 102-104.
- Mindasari, R. 2010. Antioksidan Pada Pembuatan Tempe Dari Kedelai, Jagung dan Dedak Padi. *Skripsi*. Fakultas Pertanian Universitas Sumatra Utara. Medan.
- Pokorny, J, Yanishlieva, N., and Gordon, M. 2001. *Antioxidant in Food : Practical Application*. CRC Press Cambridge. New York.
- Pujimulyani, D. 2003. Pengaruh Bleaching Terhadap Sifat Antioksidan Sirup Kunir Putih (*Curcuma mangga*, Val.). *Agritech*. 23 (3): 137-141.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, Edisi VI. diterjemahkan Padmawinata. Institut Teknik Bandung. Bandung: 57.
- Sangi, M., Sastrawan, I.N., and Kamu, V. 2013. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Adas (*Foeniculum vulgare*) Menggunakan Metode DPPH. *Jurnal Ilmiah Sains*. 13 (2)
- Sharma, O.P., and Bhat, T.K. 2009. DPPH Antioxidant Assay Revisited. *Food Chemistry*. 113 : 1202–1205.
- Sibuea, P. 2004. Kuersetin Senjata Pemusuh Radikal Bebas. <http://Kompas.com/Kompascetak/0402/10/humaniora/840926.htm>. Diakses pada tanggal 10 Desember 2014.
- Triguspita, A., Subarnas, and Supriyatna. 2000. Efek analgesik dan penapisan fitokimia ekstrak metanol daun kayu putih, kecubung, mangkokan, pohpohan, dan turi dengan metode geliat pada mencit. Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XVII.
- Warsi dan Guntarti, A. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Paprika Hijau (*Capsicum annum* L.). *Pharmacia*, Jurnal Ilmiah Kefarmasian. Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan. 3(1).
- Windono, T. 2001. Uji Peredam Radikal Bebas Terhadap 1,1-Diphenyl-2-picrylhidrazil (DPPH) dari Ekstrak Kulit Buah dan Biji Anggur (*Vitis vinifera*) Probolinggo biru dan Bali. Artikel Hasil Penelitian. 1 (1). Fakultas Farmasi UNAIR, Surabaya.
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., and Terao, J. 1998. HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazy., *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 62. 1201-1202.