

**VALIDASI PENENTUAN AKTIFITAS ANTIOKSIDAN
DENGAN METODE DPPH
(VALIDATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY DETERMINATION
BY DPPH METHODE)**

Nur Julizan^{1*}, Siti Maemunah¹, Dina Dwiyantri¹, Jamaludin Al Anshori^{1,2}

¹Laboratorium Aplikasi Kimia dan Pelayanan, PPBS Gedung D, Lt 3, FMIPA, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang KM 21 – Jatinangor, Kab. Sumedang 45363

²Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Sintesis, Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang KM 21 – Jatinangor, Kab. Sumedang 45363
E-mail: nur.julizan@unpad.ac.id

ABSTRACT

Nowadays, research topic about potential antioxidant activity in organic compound is widely conducted. IC₅₀ shows sample concentration that able inhibit 50% of free radical oxidation. A testing method has to have a quality assurance especially for unofficial method. Validation attribute will be determined is repeatability. Samples are ascorbic acid as control sample, ethanol extract of Citric leaves and Citric leaves. Ethanol extract of Citric leaves and Citric leaves are used as natural compound sample with wide different IC₅₀ value. Repeatability determined with 7 testing replication for each sample. Repeatability interpreted as (Horrat)r value. From this research, (Horrat)r for ascorbic acid is 0,567, for Citric leaves is 0,556 and for ethanol extract of Citric leaves is 1,250. From (Horrat)r values are determined can be concluded that the method of antioxidant Activity potential determination with DPPH has good value because (Horrat)r complies Horwitz requirements (less than 2). *pakan hasil copy paste dari kalimat yang ada dalam isi naskah. Isi abstrak bahasa inggris maksimal 250 kata.*

Key words: *method presicion, antioxidant, DPPH*

ABSTRAK

Dewasa ini, penelitian yang bertemakan aktifitas antioksidan dari bahan alam semakin marak. IC₅₀ menunjukkan konsentrasi suatu sampel yang dapat menghambat 50% proses oksidasi radikal bebas. Sebuah metode uji yang dilakukan perlu dipastikan jaminan mutunya terutama untuk metode yang tidak baku. Parameter validasi yang akan ditentukan pada penelitian ini adalah presisi. Sampel yang digunakan adalah asam askorbat sebagai sampel kontrol, ekstrak etanol daun jeruk nipis dan daun jeruk nipis. Ekstrak etanol daun jeruk nipis dan daun jeruk nipis berfungsi sebagai 2 variasi konsentrasi sampel bahan alam yang memiliki perbedaan nilai IC₅₀ yang cukup tinggi. Penentuan nilai presisi dilakukan dengan 7 ulangan untuk setiap sampelnya. Presisi ditunjukkan dengan nilai (HorRat)r. Dari penelitian ini, nilai (HorRat)r untuk pengujian pada asam askorbat adalah 0,567, pada ekstrak etanol daun jeruk (IC₅₀ rendah) adalah 0,556 dan pada daun jeruk (IC₅₀ tinggi) adalah 1,250. Dari nilai (HorRat)r yang telah ditentukan dapat disimpulkan bahwa metode uji Penentuan Potensi Aktifitas Antioksidan dengan Metode DPPH yang dilakukan dalam penelitian ini memiliki presisi yang baik, karena memiliki nilai (HorRat)r berada pada nilai yang dipersyaratkan, yaitu kurang dari 2.

Kata kunci: presisi metode, antioksidan, DPPH

PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan senyawa yang memiliki satu atau lebih electron yang tidak berpasangan yang secara normal dihasilkan dalam metabolisme sel. Untuk menghindari dampak negative dari radikal bebas maka diperlukan antioksidan. Antioksidan merupa-

kan senyawa yang dapat mendonorkan proton kepada senyawa radikal bebas, sehingga tidak terjadi reaksi leboh lanjut yang berbahaya. Senyawa fenolat atau senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman yang bertanggung jawab terhadap aktifitas antioksidan, antikanker, antiviral dan anti

inflamasi. Tanaman jeruk (*Citrus sp.*) merupakan salah satu tanaman budidaya yang sangat penting dalam perekonomian masyarakat Indonesia. Jeruk dapat dikonsumsi segar atau dibuat jus yang sangat penting sebagai sumber antioksidan karena kandungan vitamin C (asam askorbat), flavonoid dan senyawa fenolik.

Selain buah jeruk nipis, daun jeruk nipis juga sering digunakan sebagai obat oleh masyarakat. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa daun jeruk nipis memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai *medianinhibitory concentration* (IC_{50}). *Medianinhibitory concentration* (IC_{50}) adalah konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat aktivitas oksidasi radikal sebanyak 50 %. Adanya aktivitas antioksidan pada daun jeruk nipis karena kandungannya kaya akan alkaloid, fenol, saponin, tannin, steroid dan flavonoid.

Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan adalah metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Metode ini merupakan metode yang sering dipilih sebagai metode pengujian aktivitas antioksidan karena sederhana, mudah, cepat, peka dan memerlukan sedikit sampel. Metode ini hanya membutuhkan senyawa DPPH yang bersifat stabil dan senyawa perbandingan seperti vitamin A, vitamin C dan vitamin E. Selain itu, metode ini tidak memerlukan substrat karena radikal bebas sudah tersedia secara langsung untuk mengganti substrat.

Metode penentuan aktivitas antioksidan yang banyak dilakukan merupakan metode yang tidak baku. Validasi metode uji harus dilakukan

untuk metode yang tidak baku, metode yang dikembangkan laboratorium, metode baku yang digunakan di luar ruang lingkup yang dimaksud, metode yang dimodifikasi, metode baku untuk menegaskan dan mengkonfirmasi bahwa metode itu sesuai untuk penggunaan yang dimaksudkan. Validasi adalah konfirmasi melalui bukti-bukti pemeriksaan dan telah sesuai dengan tujuan pengujian. Laboratorium uji yang mengadopsi peraturan ISO/IEC 17025:2017 diwajibkan untuk melakukan validasi/ verifikasi metode uji. Laboratorium Aplikasi Kimia dan Pelayanan merupakan salah satu laboratorium yang terakreditasi ISO/IEC 17025:2008 oleh KAN BSN. Laboratorium pengujian wajib melakukan validasi metode uji bila menggunakan metode tidak baku, yaitu metode yang didesain atau dikembangkan oleh laboratorium. Metode baku yang digunakan di luar ruang lingkup yang dimaksud adalah, metode baku yang dimodifikasi dan metode baku untuk menegaskan dan mengkonfirmasi bahwa metode itu telah sesuai untuk penggunaannya. Parameter utama yang harus divalidasi dari suatu metode uji mencakup akurasi (ketepatan), presisi (repeatability dan reproducibility), perolehan kembali (recovery), linieritas, limit deteksi, limit kuantisasi, sensitifitas, selektifitas, ruggedness/robustness, dan ketidakpastian (uncertainty). Parameter validasi yang dapat ditentukan dalam sebuah metode tergantung pada jenis dan karakteristik metode uji. Berikut karakteristik metode uji dan parameter validasi yang dapat ditentukan

Parameter Validasi	Karakteristik Metode Uji		
	Pengujian aktifitas suatu komponen kompleks (bulk components)	Pengujian kuantitas analit penting dalam komponen kompleks	Pengujian aktifitas suatu komponen dari sebuah produk kimia atau produk kimia sederhana
Spesifitas	Ya	Ya	Ya
Linieritas	Ya	Ya	Ya
Akurasi	Tidak	Ya	Ya
Presisi	Ya	Ya	Ya
Rentang	*	Ya	Ya
Tidak	Tidak	Ya	Tidak
Batas Kuantifikasi	Tidak	Ya	*

*Memungkinkan untuk dilakukan tergantung dari jenis karakteristik pengujian

Berdasarkan uraian di atas, maka untuk meningkatkan validitas data yang dihasilkan dan sebagai langkah jaminan mutu dari metode uji, maka perlu dilakukan prosedur validasi metode. Parameter validasi yang akan dilakukan adalah presisi. Validasi terhadap sampel yang telah dikatui aktifitas antioksidannya tinggi harus dilakukan sebagai kontrol metode, pada penelitian ini asam askorbat sebagai kontrol sampel. Validasi juga dilakukan bahan alam yang memiliki aktifitas antioksidan tinggi dan rendah (nilai IC_{50} rendah dan tinggi), yaitu daun jeruk dengan perbedaan preparasi untuk mendapatkan rentang variasi nilai IC_{50} yang besar.

METODE

Bahan

Etanol, metanol, DPPH (2-2-Diphenyl-1-Picrylhidrazil), Asam askorbat (vitamin C) dan daun jeruk nipis.

Sampel Pengujian

Asam Askorbat, daun jeruk yang dipotong-potong kecil kemudian dikeringkan dan ekstrak etanol daun jeruk nipis.

Preparasi Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis

Daun jeruk nipis kering yang sudah dipotong potong kecil ditimbang sebanyak ± 150 gram ke dalam gelas kimia 500 mL. Sebanyak ± 100 mL etanol ditambahkan ke dalam gelas kimia, samapai seluruh daun jeruk terendam etanol. ke dalam vial. Sampel dimaserasi semalaman kemudian disaring. Filtrat diuapkan pada suhu $40^{\circ}C$ sampai didapat ekstrak pekat etanol daun jeruk nipis.

Pembuatan larutan DPPH $4 \times 10^{-4} M$

Sebanyak 0,004 gram DPPH ditimbang ke dalam labu ukur 25 mL, kemudian ditambahkan methanol sampai batas tera. Larutan dihomogenkan. Labu ukur ditutup dengan alumunium foil agar terhindar dari

cahaya. Larutan DPPH dibuat segar saat akan dilakukan pengujian.

Pembuatan larutan induk asam askorbat 10 mg/ L

Asam askorbat ditimbang sebanyak 1 mg kemudian dilutkan dengan methanol dalam labu ukur 10 mL. Larutan dihomogenkan hingga terlarut sempurna. Larutan dipipet sebanyak 1 mL ke labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan metanol sampai batas tera. Larutan dihomogenkan.

Pembuatan larutan induk sampel 1.000 mg/ L

Ekstrak etanol daun jeruk nipis ditimbang sebanyak 10 mg ke dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan metanol sampai dengan batas tera. Larutan dihomogenkan hingga terlarut sempurna.

Pembuatan larutan induk sampel 50.000 mg/ L

Daun jeruk nipis yang sudah kering ditimbang sebanyak 0,5 gram ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan metanol sampai dengan batas tera. Larutan dihomogenkan.

Penentuan aktifitas antioksidan dengan metode DPPH

Sampel stok diencerkan menjadi 5 variasi konsentrasi bertingkat (termasuk pelarut metanol sebagai blanko). Sampel dimasukan ke dalam tabung reaksi sebanyak 2,4 mL. Ke dalam tabung reksi ditambahkan larutan DPPH 4×10^{-4} M sebanyak 0,6 mL. Larutan

diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Absorbansi dan konsentrasi larutan diplotkan terhadap kurva daya hambat sampel. Regresi linier yang didapat minimal 0,9900. Nilai IC₅₀ dihitung, dengan persamaan:

$$IC_{50} = \frac{(50 - \text{slope})}{\text{Intercept}}$$

Penentuan nilai parameter validasi presisi (HorRat)

Metode uji dilakukan pada sampel yang sama sebanyak 7 kali (n) pengulangan, dengan analisis, alat dan hari yang sama atau dalam interval waktu yang pendek. Kelompok data terdiri dari asam askorbat, k sampel beraktifitas tinggi dan sampel beraktifitas rendah. Masing-masing kelompok data dihitung secara statistika sehingga didapatkan nilai (HorRat)nya dengan persamaan sebagai berikut: .

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

$$\bar{X} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$RSDr = \frac{S_r \times 100 \%}{\bar{x}}$$

$$(CV)_r = \frac{S_r}{\bar{x}}$$

$$PRSD = 2C^{-0.1505}$$

$$(HORRAT)_r = RSDr / PRSD$$

(Horwitz & Albert, 2006).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Prosedur penentuan aktifitas antioksidan yang dilakukan merupakan sebuah prosedur non baku yang tejamin parameter jaminan mutunya. Sampel asam askorbat diujikan untuk mengkonfirmasi bahwa prosedur ini tepat digunakan untuk menentukan potensi aktifitas antioksidan dalam suatu sampel. Berdasarkan literatur, asam askorbat merupakan senyawa antioksidan yang baik. Vitamin C (asam askorbat) adalah makanan penting antioksidan dan secadara signifikan menurunkan efek samping spesies reaktif, sepeerti oksigen rwkatif yang dapat menyebabkan kerusakan dengan reaksi oksidatif pada makromolekul seperti lipid, DNA dan protein, yang mana terlibat dalam penyakit kronis termasuk neurodegenerative penyakit.

Tabel 1. Nilai Rata-Rata Variasi Konsentrasi Asam Askorbat dan Inhibisi Potensi Antioksidan

Konsentrasi Asam Askorbat (mg/ L)	0,00	1,07	2,22	2,95	3,62	4,69
% Inhibisi	0,00	13,55	38,95	50,62	63,44	86,65

Nilai IC₅₀ asam askorbat yang diperoleh dari penelitian ini adalah 3,2 mg/ L. Artinya, hanya diperlukan asam askorbat dalam konsentrasi kecil untuk menginhibisi terjadinya 50% radiasi. Hal ini menunjukkan bahwa metode uji yang dilakukan cukup handal dalam menentukan potensi aktifitas antioksidan. Sebuah studi menentukan bahwa aktifitas antioksidan terhadap vitamin C (asam

askorbat) memiliki nilai IC₅₀ 1,01- 58,94 mg/ L.

Dari hasil uji coba yang dilakukan maka disimpulkan bahwa konsentrasi kerja untuk sampel asam askorbat berada pada rentang 1-5 mg/ L sesuai dengan Tabel 1. Oleh karena itu, pengujian penentuan Aktifitas Antioksidan dengan Metode DPPH dalam asam askorbat diulang sebanyak 7 kali pada rentang kosentrasi 1-5 mg/ L, dengan hasil analisa sebagai berikut :

Tabel 2. Konsentrasi IC₅₀ Potensi Aktifitas Antioksidan Asam Askorbat terhadap Radikal Bebas DPPH

Ulangan	IC ₅₀ (mg/ L)
1	2,8
2	3,0
3	3,5
4	3,4
5	3,0
6	3,2
7	3,4
rata-rata	3,2
stdev	0,25
% RSD	7,70
(PRSD)r	13,44
(HorRat)r	0,573

Dari data 7 ulangan pengujian ditentukan nilai (*HorRat*)r untuk menunjukan kualitas atribut validasi *repetability* yang ditentukan. Nilai (*HorRat*)r yang didapat adalah 0,573.

Ekstrak etanol daun jeruk nipis berfungsi sebagai sampel yang memiliki nilai IC₅₀ yang relatif sedang, yaitu pada rentang 100- 250mg/ L. Hasil optimasi penentuan konsentrasi sampel daun jeruk yang berpotensi memiliki aktifitas antioksidan terhadap DPPH adalah

pada rentang 100 - 500 mg/ L. Oleh karena itu, pengujian penentuan Aktifitas Antioksidan dengan Metode DPPH dalam daun jeruk diulang sebanyak 7 kali pada rentang konsentrasi 100 – 500 mg/ L, dengan hasil analisa sebagai berikut :

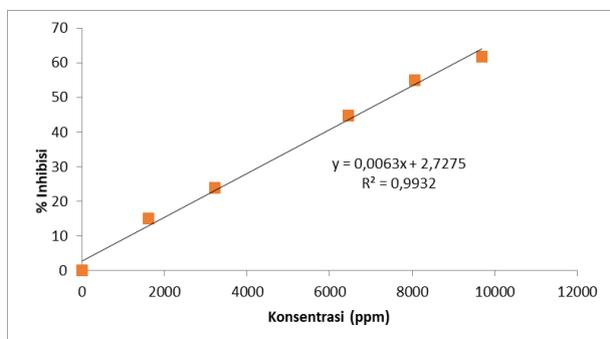
Tabel 3. Konsentrasi IC₅₀ Potensi Aktifitas Antioksidan Ekstrak Etranol Daun Jeruk Nipis terhadap Radikal Bebas DPPH

Ulangan	IC ₅₀ (mg/ L)
1	179,8
2	186,4
3	201,5
4	193,9
5	188,2
6	182,9
7	196,8
rata-rata	189,9
stdev	7,80
% RSD	4,11
(PRSD)r	7,2628
(HorRat)r	0,566

Dari data 7 ulangan pengujian ditentukan nilai (HorRat)r untuk menunjukkan kualitas atribut validasi *repeatability* yang ditentukan. Nilai (HorRat)r yang didapat adalah 0,556.

Pada penelitian ini, daun jeruk nipis memiliki nilai IC₅₀ pada rentang 1.000- 10.000 mg/ L.

Gambar 1. Kurva Daya Hambat Daun Jeruk Nipis terhadap radikal bebas DPPH



Hasil optimasi penentuan konsentrasi sampel daun jeruk yang berpotensi memiliki aktifitas antioksidan terhadap DPPH adalah pada rentang 1.000 - 10.000 mg/ L. Oleh karena itu, pengujian penentuan Aktifitas Antioksidan dengan Metode DPPH dalam daun jeruk diulang sebanyak 7 kali pada rentang konsentrasi 1.000 - 10.000 mg/ L, dengan hasil analisa sebagai berikut :

Tabel 4. Konsentrasi IC₅₀ Potensi Aktifitas Antioksidan Daun Jeruk Nipis terhadap Radikal Bebas DPPH

Ulangan	IC ₅₀ (mg/ L)
1	6683,8
2	7446,1
3	7089,4
4	7602,7
5	6989,4
6	7384,5
7	7786,8
rata-rata	7283,2
stdev	382,02
%RSD	5,25
(PRSD)r	4,1952
(HorRat)r	1,250

Dari data 7 ulangan pengujian ditentukan nilai (HorRat)r untuk menunjukkan kualitas atribut validasi *repeatability* yang ditentukan. Nilai (HorRat)r yang didapat adalah 1,250.

Dari ketiga nilai (HorRat)r berada pada rentang yang dipersyaratkan kurang dari 2 (Horwitz & Albert, 2006).

SIMPULAN

Nilai (Horrat)r dari asam askorbat yang berfungsi sebagai kontrol sampel yaitu 0,537. Nilai (Horrat)r untuk 2 variasi sampel bahan alam yaitu 0,566 dan 1,250. Nilai (Horrat)r dari ketiganya menunjukkan bahwa metode yang dilakukan pada penelitian ini memiliki nilai presisi yang baik hingga nilai IC₅₀ sampel 10.000 mg/L, karena berada pada rentang yang

dipersyaratkan yaitu kurang dari 2 (Horwitz & Albert, 2006).

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Universitas Padjadjaran yang telah membantu pendanaan penelitian ini dalam program Riset Tenaga Kependidikan Unpad dan juga atas fasilitas di Laboratorium Aplikasi Kimia dan Pelayanan. Terima kasih juga kami ucapkan kepada Dr. Dadan Sumiarsa yang membantu sebagai Koordinator Teknis Laboratorium serta kepada pihak-pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, C. (2007). *Teknik & Evaluasi Validasi Metode serta Pemilihan Parameter Validasi Metode*. Seminar Pelatihan Validasi Metode Analisis Kuantitatif 14 s/d 15 April 2009. Bogor.
- APVMA. (2004). *Guidelines for The Validation of Analytical Method for Active Constituent*. Agricultural and Veterinary Chemical Products. Australia.
- Horwitz & Albert. (2006). *The (HorRat) Rasio Horwitz: A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision*. Journal of AOAC International. 89(14).
- Juansa, D., Budiana, W & Ridwan, I.M. (2015) . *Penetapan Kadar Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan dari Jus Buah Lima Spesies Jeruk (Citrus sp.)*. Jurnal Farmasi Galenika. Volume 02 No. 01. ISSN: 2406-9299.
- KAN BSN. (2018). *Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi : SNI 19 - 17025 – 2008*.
- Lung, J.K.S & Destiani, D.P. (2017) . *Review Artikel Uji Aktifitas Antioksidan Vitamin A, C, E dengan Metode DPPH*. Farmaka. Vol 15 No. 1.
- Maesaroh, K., Kurnia, D & Anshori, J.A. (2018). *Perbandingan Metode Uji Aktivitas Antioksidan DPPH, FRAP dan FIC terhadap Asam Askorbat, Asam Galat dan Kuersetin*. Chimica et Natura Acta. Vol. 06 No. 02.
- Molyneux, P. (2004). *The Use of Stable free radical diphenylpicryl-hisrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. J. Sci. Technol. 26(2):211-219.
- Reddi, L.J., Jalli, R.D., Jose, B & Gopu, S. (2012). *Evaluation of Antibacterial & Antioxidant Activities of The Leaf Essential Oil & Leaf Extract of Citrus aurantifolia*. Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research. . Vol. 2. 346-53.
- Riyanto. (2014). *Validasi dan Verifikasi Metode Uji Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*. Deepublish. Sleman.

