

Artikel Penelitian

Validasi Metode Uji Linieritas Pada Penentuan Aktivitas Antioksidan Asam askorbat Dengan Metode DPPH Menggunakan Pelarut Etanol p.a.

Sri Safitri¹, Galuh Gondo Kusumo^{1*}, Mercyska Suryandari¹, Siti Annurijati Hatidja¹, Andhika Dwi Aristyawan¹, Umarudin¹

¹ Akademi Farmasi Surabaya

^{*}E-mail: kusumo.galuhgondo@gmail.com

ABSTRAK

Validitas suatu metode sangat penting dalam suatu penelitian, tidak terkecuali penentuan aktivitas antioksidan. Berdasarkan kategorinya pada USP XXXVII tahun 2014, pengujian antioksidan termasuk dalam penelitian kategori III dimana metode analisis digunakan untuk penetapan kinerja dan kualitas sediaan obat jadi. Pada kategori III ini, parameter presisi wajib dikerjakan dan parameter lain mungkin dikerjakan. Pada penelitian ini bertujuan menguji validasi linieritas dari metode aktivitas antioksidan pada asam askorbat menggunakan DPPH dengan pelarut etanol sebagai pelarut pengujian antioksidan. Parameter linieritas ini diperlukan untuk menjamin hubungan linier antara konsentrasi terhadap aktivitas antioksidannya. Studi ini menggunakan sampel asam askorbat dengan pelarut etanol 96% p.a. Untuk membuktikan adanya aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Pengujian dilakukan dengan mengambil 10 mg asam askorbat dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5 ppm dan kemudian mengulangnya 3 kali. Data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa hasil absorbansi dari replikasi 1, 2, dan 3 tidak terlalu berbeda. Semakin besar konsentrasinya, semakin kecil absorbansi yang dihasilkan. Hasil % penurunan dari penelitian ini dapat dikatakan valid karena nilai r yang diperoleh mendekati 1, yaitu replikasi 1 = 0,9932, replikasi 2 = 0,9946, replikasi 3 = 0,9910.

Kata kunci: validasi, linieritas, antioksidan, asam askorbat, DPPH.

Validation Of Linerity Test Method For Determination Antioxidant Activity of Ascorbic Acid By DPPH Method Using Ethanol Solvent

ABSTRACT

Method's validatio is very important in research, including in the antioxidant activity test. Based on USP XXXVII 2014, antioxidant activity test is included in category III research where analytical methods are used to ensure the performance and quality of finished product. Precision is a must in this cathegory and other parameters may be needed. This research aims to test the validation of the linearity of the antioxidant activity method of ascorbic acid using DPPH with ethanol as the antioxidant testing solvent. This study used ascorbic acid samples with 96% p.a. ethanol solvent. The test was conducted by taking 10 mg of ascorbic acid with concentrations of 1, 2, 3, 4, 5 ppm and repeating it 3 times. The data obtained concluded that the absorbance results from replicates 1, 2, and 3 were not significantly different. As the concentration increased, the resulting absorbance decreased. The percentage decrease results from this research can be considered valid because the obtained r values are close to 1, namely replication 1 = 0.9932, replication 2 = 0.9946, replication 3 = 0.9910.

Keywords: validation, linerity, antioxidant, ascorbic acid, DPPH.

1. PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang hanya memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga bersifat sangat tidak stabil. Radikal bebas pada tubuh dapat memicu seperti jantung, kanker, penuaan dini, dan penyakit degenerative lain. Untuk mengatasi radikal bebas tersebut, maka diperlukan suatu

senyawa antioksidan yang dapat menangkap radikal bebas (1).

Antioksidan merupakan senyawa yang data menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, akibatnya kerusakan sel dapat dihambat. Berbagai metode pengujian aktivitas antioksidan secara *in vitro* bertujuan untuk mengetahui aktivitas suatu senyawa antioksidan dalam menghambat radikal

bebas. Metode yang sering digunakan untuk menghambat radikal bebas adalah metode DPPH (1,2).

Prosedur analisis antioksidan yang tervalidasi menjadi faktor untuk pada pengembangan produk baru. Terlebih metode antioksidan berbeda dengan metode penetapan kadar pada umumnya. Perbedaan tersebut terletak pada absorbansi yang diamati pada antioksidan merupakan hasil penurunan absorbansi blanko DPPH. DPPH ini merupakan radikal bebas yang bisa bertindak sebagai indikator pada pengujian menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Perbedaan lain adalah pada penetapan kadar umumnya memiliki hubungan linieritas semakin tinggi absorbansi maka semakin tinggi kadar yang ditentukan. Sedangkan pada uji aktivitas antioksidan, semakin tinggi selisih absorbansi pengukuran dengan absorbansi blanko maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya (2-5).

Metode DPPH dengan spektrofotometri UV-Vis menjadi pilihan yang baik dikarenakan merupakan metode yang paling sederhana, biaya operasional yang rendah dan mudah dikerjakan namun hasil yang bagus. (3). Pada penelitian ini dilakukan uji validasi metode linieritas uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dengan pelarut etanol p.a. (4,5). Parameter ini menjadi topik dalam penelitian ini karena sejalan dalam proses penentuan nilai aktivitas antioksidan IC_{50} .

2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian *true eksperimental* yang bertujuan mengetahui menguji linieritas uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dengan pelarut etanol jika dilakukan pada asam askorbat. Rancangan penelitian ini diawali dengan pembuatan larutan DPPH 40ppm menggunakan pelarut etanol p.a. Uji aktivitas antioksidan menggunakan larutan DPPH dengan asam askorbat (konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5 ppm) lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yaitu 517 nm (1,2).

2.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan, beakerglass, tabung reaksi, batang pengaduk, gelas ukur, pipet volume, mikro pipet dan Spektrofotometri UV-Vis Thermo tipe

Genesys 10S UV-Vis. Bahan yang digunakan adalah asam askorbat, etanol 96%, dan DPPH (4).

2.2. Pembuatan larutan DPPH dan Blanko DPPH

Larutan DPPH dibuat pada konsentrasi 40 ppm menggunakan pelarut etanol 96% p.a. Blanko DPPH dibuat dengan menambahkan 2ml larutan DPPH dengan 2ml pelarut etanol etanol 96% p.a. (4).

2.3. Cara Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu asam askorbat ditimbang sebanyak 10mg dan dilarutkan dalam etanol *ad* 100ml. Lalu diencerkan dengan etanol menjadi konsentrasi 1 ppm, 2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm (1,2).

2.4. optimasi panjang gelombang maksimum

Blanko DPPH yang telah dibuat dipayari dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis Thermo tipe Genesys 10S UV-Vis pada panjang gelombang 400-800nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan panjang gelombang yang memiliki absorbansi tertinggi (6).

2.5. Teknik Pengolahan Data

Aktivitas antioksidan diukur dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH menggunakan perhitungan (4):

$$\% \text{perendaman} = \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

Nilai %perendaman kemudian digunakan dalam penetapan linieritas. Konsentrasi sebagai sumbu X dan %perendaman pada sumbu Y sehingga didapatkan rumus linieritas (7).

$$Y = bX + a$$

Linieritas didapatkan dari nilai r pada perhitungan regresi linier konsentrasi terhadap %perendaman (7). Perhitungan nilai IC_{50} dilakukan dengan mengganti nilai Y pada rumus regresi linier yang didapatkan (6).

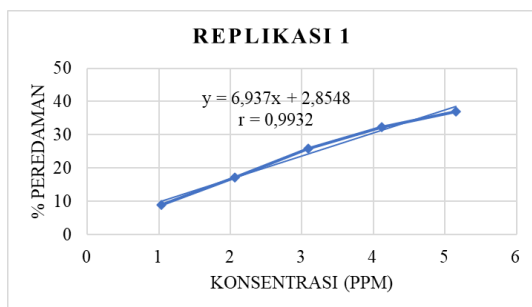
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dilakukan uji linieritas untuk mengetahui hubungan linieritas antara konsentrasi asam askorbat yang direaksikan dengan DPPH, sehingga hasil perhitungan ini untuk mengetahui nilai linieritas pada penentuan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yang menggunakan pelarut etanol 96%.

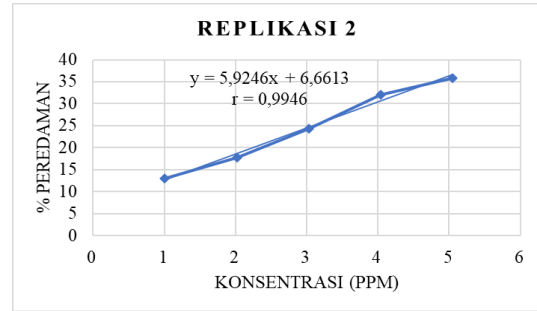
Tabel 1. hasil pengujian % peredaman antioksidan asam askorbat

Asam Askorbat	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Peredaman
Replikasi 1	1,03	0,565	8,8709
	2,06	0,513	17,2580
	3,09	0,459	25,9677
	4,12	0,420	32,2580
	5,15	0,390	37,0967
Replikasi 2	1,01	0,539	13,0645
	2,02	0,510	17,7419
	3,03	0,469	17,7419
	4,04	0,421	32,0967
	5,05	0,398	35,8064
Replikasi 3	1,02	0,537	13,3864
	2,04	0,486	21,6129
	3,06	0,456	26,4516
	4,08	0,413	33,3870
	5,10	0,374	44,0322

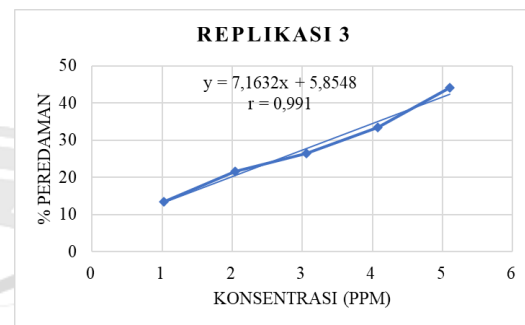
Dari data absorbansi yang diperoleh kemudian dihitung nilai %peredaman dengan hasil pada tabel di atas. Dari hasil tersebut digunakan untuk mengetahui nilai regresi linear nya dengan memasukkan nilai konsentrasi asam askorbat sebagai nilai X dan % peredaman sebagai nilai Y (7). Data yang diperoleh dari persamaan regresi linear tiap replikasi memenuhi syarat karena nilai koefisien korelasi mendekati 1 dengan hasil kurva regresi linear sebagai berikut (8,10). :



Gambar 1 grafik linieritas konsentrasi terhadap aktivitas antioksidan asam askorbat menggunakan metode DPPH dengan pelarut Etanol p.a. replikasi 1



Gambar 1 grafik linieritas konsentrasi terhadap aktivitas antioksidan asam askorbat menggunakan metode DPPH dengan pelarut Etanol p.a. replikasi 2



Gambar 1 grafik linieritas konsentrasi terhadap aktivitas antioksidan asam askorbat menggunakan metode DPPH dengan pelarut Etanol p.a. replikasi 3

Hasil perhitungan uji liniertitas menunjukkan bahwa nilai r atau linieritas dari ketiga replikasi mendekati nilai 1, dengan r replikasi 1, 2, 3 berturut-turut adalah 0,9932; 0,9946; dan 0,9910. Hal ini menunjukkan bahwa uji antioksidan yang dilakukan dengan metode DPPH dengan pelarut etanol p.a. pada penelitian ini memiliki linieritas yang bagus (11).

Dari hasil grafik tersebut selanjutnya ditentukan nilai IC₅₀ menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh. Hasil IC₅₀ yang didapat penelitian ini sebagai berikut :

Tabel 1. Tabel hasil perhitungan regresi linier dan nilai IC₅₀

replikasi	Persamaan regresi Linier	IC ₅₀
1	y = 6,937x + 2,8548 r = 0,9932	6,79
2	y = 5,9246x + 6,6613 r = 0,9946	7,31
3	y = 7,1632x + 5,8548 r = 0,9910	6,16
Rata-rata		6,75

Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, nilai kuat 50-100 ppm, nilai sedang 101-250 ppm, nilai lemah 250- 500 ppm, dan tidak aktif

apabila nilai IC50 diatas 500 ppm. Dari data pada penelitian ini nilai rata-rata IC50 yaitu 6,75 ppm yang berarti nilai IC50 kurang dari 500 ppm sehingga dapat disimpulkan senyawa antioksidannya sangat kuat (11).

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dari data uji linieritas yang sudah diambil, maka dapat disimpulkan yang dimana nilai koefisien korelasi (r) pada penelitian ini sudah mendekati 1 atau diatas 0,990 sehingga dapat dikatakan valid atau sudah linier karena sudah memenuhi persyaratan kriteria validasi metode analisis uji linieritas.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Akademi Farmasi Surabaya yang menyediakan fasilitas penelitian.

6. PENDANAAN

Penelitian ini tidak didanai oleh sumber hibah manapun.

7. KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kusumo GG, Dipahayu D. The Effect of Nano Extract Formulation on Antioxidant Activity of 70% Ethanolic Extract of Purple Sweet Potato's Leaves (*Ipomoea batatas L.*) Antin-3 Variety. *J Pharmasci (Journal Pharm Sci.* 2022;7(1):43–7.
2. Silviani VC. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstra Etanolik Buah Cabai Rawit Putih (*Capsicum frutescens L.*) Dengan Metode DPPH (1,1 difenil-2-pikrilhidrazil) Dan Penetapan Kadar Kapsaisin Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometri. 2013;
3. Rohmah J. antioxidant activities using DPPH, FIC, FRAP, AND ABTS Methods from Ethanolic Extract of Lempuyang Gajah Rhizome (*Zingiber zerumbet (L.) Roscoe ex Sm.*). *Jurnal Kimia Riset.* 2022; 7(2) : 152-166
4. Widyowati H, Ulfah M, Sumantri. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Herba Alfalfa (*Medicago sativa L.*) dengan Metode DPPH (1,1Diphenyl-2 Picrylhidrazil). *J Ilmu Farm Dan Farm Klin.* 2014;11(1):25–33.
5. Wardani, Andria L. Validasi Penentuan Kadar Vitamin C Pada Minuman Buah Kemasan Dengan Spektrofotometri Uv-Visible. *Univ Indones.* 2012;
6. Suwarni E, Cahyadi KD. Free-Radical Scavenging Activity of Ethanol Extract of Kecombrang Flowers (*Etilingera elatior*) with the DPPH Method. *J Ilm Medicam.* 2016;2(2):39–46.
7. Agustina R, Agustin L, Priyadi S. Validasi Metode Analisa Total Flavonoid Content Menggunakan Spektrofotometer UV/Vis. *Jurnal Teknik Ilmu dan Aplikasi.* 2020 Januari;8(1):34–41.
8. Rifai B, Ihsan P, Nurhayati IP, Maysaroh I. Validasi Metode Ultra High Performance Chromatography Double Mass Spectrometry (UHPLCMS/MS) Untuk Analisis Kurkumin Pada Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma longa*) Dengan Berbagai Perbandingan. *Pharmaceutical Journal.* 2018;4(1):29–34.
9. Ningrum PL. Penetapan Aktifitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Daun Kratom (*Mitragyna speciosa*) Hasil Maserasi Menggun. 2023;
10. Pramudita AW. Validasi Metode Analisis Erdostein secara KCKT yang digunakan pada Validasi Pembersihan Peralatan Produksi dengan cara Usap. 2015;
11. Susiloningrum D, Sari DEM, Uji Aktivitas Antioksidan Dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Temu Mangga (*Curcuma mangga* Valetton & Zijp) dengan Variasi Konsentrasi Pelarut. *Cendekia Journal of Pharmacy.* 2021; 5(2) : 117-127