

Penentuan Konsentrasi Optimum Kurva Standar Antioksidan; Asam Galat, Asam Askorbat dan Trolox® terhadap Radikal Bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,1 mM

IB Ketut Widnyana Yoga

Pranata Laboratorium Pendidikan pada Laboratorium Analisis Pangan,

Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana-Bali

Telp. (0361) 245010

ibkyogi@yahoo.com, HP 081 238 50 7255

Abstrak

Standar antioksidan seperti asam galat, asam askorbat dan Trolox® sering digunakan pada penentuan kapasitas antioksidan, konsentrasi standar optimum sangat diperlukan untuk menentukan kurva regresi linier yang memenuhi hukum *Lambert-Beer*. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi optimum masing-masing standar dalam membuat kurva regresi linier dengan nilai absorbansi 0,2-0,8. Metode pengujian dilakukan secara kuantitatif mencari nilai absorbansi dengan mereaksikan masing-masing standar terhadap radikal Bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,1 mM menggunakan spektrofotometer. Pengamatan dilakukan sebanyak 2 kali, data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel, grafik, nilai absorbansi rata-rata dan standar deviasi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa masing-masing standar memberikan kurva regresi linier dengan rentang nilai optimum pada asam galat (2,5; 5; 10; 15 mg/L), asam askorbat (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 mg/L) dan Trolox® (10; 20; 30; 40; 50; 60 mg/L). Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa asam galat yang paling efektif dalam mereduksi radikal Bebas DPPH 0,1 mM dibandingkan asam askorbat dan Trolox®.

Kata Kunci : asam galat, asam askorbat, Trolox®, antioksidan, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Determination of Optimum Concentration Antioxidant Standard of Curve; Gallic Acid, Ascorbic Acid and Trolox® to Against of Free Radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,1 mM

Abstract

Antioxidant standard such as gallic acid, ascorbic acid, and Trolox® often are used to determine of antioxidant capacity, standard optimum concentration are needed to make regression of curve to follow of Lambert-Beer law. The purpose of this research is to determine of optimum concentration each standards to make regression of curve with absorbance value 0,2-0,8. The quantitative method was done to search absorbance value by reaction between each standards to free radical of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0,1 mM by spectrophotometer. The experiment was done two replicates, all of datas were collected is showed on table, graph, absorbance value average and deviation of standard. The result show that each standards gave regression of curve by optimum interval of value respectively; gallic acid (2,5; 5; 10; 15 mg/L), ascorbic acid (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 mg/L) and Trolox® (10; 20; 30; 40; 50; 60 mg/L). The conclusion of this research is gallic acid is the most effective to against of free radicals DPPH 0,1 mM to compare with ascorbic acid and Trolox®.

Kata Kunci : gallic acid, ascorbic acid, Trolox®, antioxidant, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

1. Pendahuluan

Standar dalam analisis spektrofotometri sangat diperlukan untuk mendeteksi keberadaan suatu senyawa. Kurva kalibrasi atau kurva standar dalam pengujian spektrofotometri, didasarkan pada hukum “*Lambert- Beer*”, dimana grafik konsentrasi dengan absorbansi akan membentuk suatu garis lurus. Kurva kalibrasi memudahkan dalam mengetahui konsentrasi suatu senyawa dalam sampel yang dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi $y = ax + b$, dimana y adalah absorbansi, a adalah intersep, x adalah konsentrasi dan b adalah slope (Khopkar, 1990).

Beberapa literatur analisis kimia umumnya mencantumkan konsentrasi ideal standar yang perlu dibuat dalam melakukan analisis kimia tertentu. Tetapi ada juga beberapa jurnal penelitian yang dijadikan pedoman tidak mencantumkan besarnya konsentrasi yang harus disiapkan, hanya mencantumkan jenis standar, sehingga memerlukan *trial* dan *error*, serta tambahan waktu dan biaya yang dikeluarkan dalam proses pengujian sampel, terutama pada pengukuran kapasitas antioksidan.

Kapasitas antioksidan adalah pengujian besarnya kemampuan senyawa pada *crude* ekstrak bahan alam, yang diekstrak umumnya dengan pelarut metanol dan etanol dalam mereduksi radikal bebas. Hasil reaksi ditunjukkan dalam perbedaan warna larutan dan serapan warna dibaca nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer. Beberapa jenis pengujian kapasitas antioksidan seperti ORAC (*the oxygen radical absorbance capacity*), *Galvinoxyl* methode (Procorny J.*et.al.* 2001), β -*Carotene-linoleate bleaching assay*, DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay*, *Ferric reducing/ antioxidant power* (FRAP) *assay*, (Othman A., *et.al.* 2007). *ABTS radical cation decolourisation assay* (Miliauskas G., *et.al.* 2003).

Metode sederhana yang paling sering dilakukan untuk menguji kapasitas antioksidan dari ekstrak bahan alam menggunakan radikal bebas DPPH. DPPH digunakan untuk sampel yang larut dalam air, larut lemak, tidak larut atau terikat pada dinding sel yang hampir tidak bebas. Senyawa tersebut mampu bereaksi dengan DPPH, sehingga uji antioksidan dengan radikal DPPH sangat luas digunakan, termasuk mampu mengukur antioksidan pada sistem biologis yang kompleks (Prakash, 2001), menggunakan vitamin C (asam askorbat) dengan satuan *Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity* (AEAC), analog vitamin E yang larut air (Trolox®) dengan satuan *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) dan Asam galat sebagai standar dengan satuan (*Gallic Acid Equivalent Antioxidant Capacity* (GAEAC).

Othman A., *et.al.* 2007, dalam penelitiannya tentang kapasitas antioksidan pada biji kakao menggunakan asam askorbat pada konsentrasi 0,16-1,28 mg/mL terhadap DPPH 0,5 μ M (0,5 mM). Hanani E. 2005, menggunakan asam askorbat (2,3,4,5 mg/L) pada DPPH 1mM. Ismail A. dan Hong TS.2002. yang meneliti tentang aktivitas antioksidan dari rumput laut komersil menggunakan konsentrasi vitamin E (0,04-1,28 mg/mL) terhadap DPPH 0,5mM. Penelitian Smejkal K., *et.al.* 2007 tentang aktivitas antiradikal dari ekstrak *Paulownia tomentosa* (Scrophulariaceae) menggunakan Trolox sebagai standar terhadap DPPH 22g/L, tetapi tidak disebutkan besarnya konsentrasi Trolox, sedangkan asam galat sering digunakan sebagai standar penentuan kadar total fenol, dan komponen polifenol termasuk kelas utama dari antioksidan alami pada tanaman (Prakash 2001), sehingga perlu dilakukan penentuan kapasitas antioksidan menggunakan standar asam galat.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi optimum standar

asam galat, asam askorbat dan Trolox® dalam penentuan kapasitas antioksidan. **Manfaat** yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah sebagai acuan dalam membuat kurva regresi linier standar antioksidan yang digunakan untuk menentukan kapasitas antioksidan dari beragam senyawa bioaktif yang terdapat pada sampel bahan alam secara lebih efisien.

2. Metode yang diterapkan

2.1. Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2015, bertempat di Laboratorium Analisis Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Zigma), Metanol (Merck), asam galat (Zigma), L(+) ascorbic acid (Merck) dan Trolox® (Zigma) sedangkan alat-alat yang digunakan seperti pipet mikro 20 µL, 100 µL, 1000 µL (Socorex), labu takar 10 mL, 50 mL dan 100 mL (Pyrex), pipet tetes, kertas label, cuvet spektro 2 mL, tip pipet biru dan kuning serta instrumen yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis (Genesys).

2.2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini berupa eksperimen dengan melakukan beberapa percobaan membuat berbagai konsentrasi standar dan menentukan linieritas dari standar yang dibuktikan dari grafik kurva regresi linier. Adapun teknik pengumpulan data yang dilakukan sebagai berikut :

Pembuatan larutan stok standar asam galat 100 mg/L

Untuk membuat larutan asam galat 100mg/L disiapkan labu takar 100 mL, ditimbang 0,0100 g asam galat kemudian dilarutkan dengan aquades hingga 100 mL. Seri pengenceran dibuat dengan memipet 0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25 µL dan mengencerkan dengan metanol hingga 100 µL.

Pembuatan larutan stok standar asam askorbat 100 mg/L

Ditimbang 0,0100 g L (+) Asam askorbat, kemudian dilarutkan dengan aquades hingga 100 mL. Seri pengenceran dibuat dengan memipet sebanyak 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; µL, kemudian ditambahkan metanol hingga volume 100 µL.

Pembuatan larutan stok standar Trolox® 100 mg/L

Ditimbang 0,0100 g Trolox®, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga 100 mL. Seri pengenceran dibuat dengan memipet sebanyak 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; µL, kemudian ditambahkan metanol hingga volume 100 µL.

Pembuatan larutan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) 0,1 mM

Ditimbang 0,0039 g DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), dilarutkan dengan metanol dalam labu takar 100 mL. Dihomogenisasi dengan magnetik stirer hingga larutan DPPH terlarut sempurna.

Reaksi antara standar antioksidan dan radikal bebas DPPH 0,1 mM

Proses pengujian larutan standar dengan larutan radikal bebas DPPH dilakukan dengan mereaksikan masing-masing standar yang telah dibuat sebanyak 100 µL direaksikan dengan larutan DPPH 700 µL, divortek dan diinkubasi 15 menit, selanjutnya dibaca serapan warnanya pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer.

2.3. Analisis data

Semua data hasil pengukuran diulang sebanyak 2 kali, dianalisis secara deskriptif dengan menampilkan data berupa nilai rata-rata ± standar deviasi, gambar (foto) dan grafik.

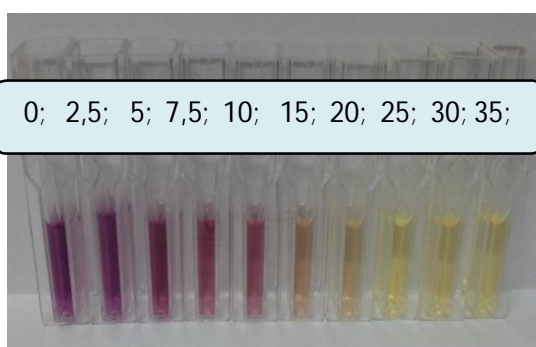
3. Hasil dan Pembahasan

Hasil pengukuran kurva standar antioksidan asam galat terhadap radikal bebas DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) 0,1 mM dapat dilihat pada Tabel 1. Reaksi asam galat dengan

DPPH serta kurva regresi linier dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Tabel 1. Nilai absorbansi dan standar deviasi beberapa konsentrasi Asam galat dalam mereduksi radikal bebas DPPH 0,1 mM

No	Konsentrasi (mg/L)	Nilai Absorbansi Ulangan 1	Nilai Absorbansi Ulangan 2	Nilai rata-rata	Standar Deviasi
1	0,0	1,027	1,019	1,023	0,006
2	2,5	0,875	0,888	0,882	0,009
3	5,0	0,782	0,780	0,781	0,001
4	7,5	0,575	0,670	0,623	0,067
5	10,0	0,511	0,549	0,53	0,027
6	15,0	0,274	0,255	0,265	0,013
7	20,0	0,188	0,208	0,198	0,014
8	25,0	0,066	0,078	0,072	0,008

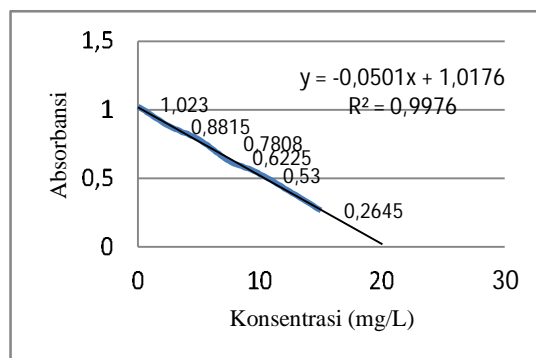


Gambar 1. Reaksi standar asam galat (mg/mL) dalam mereduksi radikal bebas DPPH 0.1 mM

Berdasarkan hasil pengukuran standar asam galat pada beberapa konsentrasi yang diujikan seperti Tabel 1, terlihat bahwa nilai absorbansi ideal tercapai pada konsentrasi 20 mg/L, di atas konsentrasi tersebut nilai absorbansi sudah menurun cukup jauh dari rentang absorbansi ideal.

Konsentrasi asam galat dalam pembuatan kurva standar untuk pengukuran total fenol (Sakanaka *et al.* 2003), umumnya pada konsentrasi 10-100 mg/L, hal ini sangat berbeda pada penentuan kemampuan dari asam galat dalam mereduksi radikal bebas DPPH 0,1 mM pada konsentrasi optimal 15 mg/L dengan nilai R^2 0,9976, dan konsentrasi lebih dari itu memberikan bentuk kurva

yang tidak linier dan cenderung ke arah parabola dan menurunkan nilai R^2 .



Gambar 2. Kurva standar asam galat dalam mereduksi radikal bebas DPPH 0,1 mM

Asam askorbat atau vitamin C dikenal sebagai sumber antioksidan yang sangat kuat, dapat mendonorkan atom hidrogen dan membentuk radikal bebas askorbil yang relatif stabil (Muchtady D, 2012). L(+) askorbic acid yang biasa digunakan sebagai standar dalam penentuan kapasitas antioksidan.

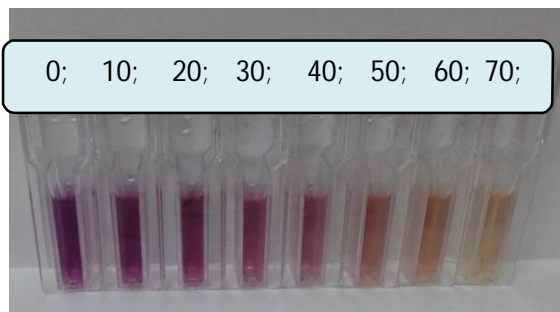
Berdasarkan hasil pengukuran standar asam askorbat terhadap radikal bebas DPPH 0,1 mM dapat dilihat pada Tabel 2, hasil reaksi perubahan warna ditunjukkan pada Gambar 3 dan grafik kurva regresi linier dapat dilihat pada Gambar 4.

Tabel 2. Nilai absorbansi dan standar deviasi beberapa konsentrasi asam askorbat dalam mereduksi radikal bebas DPPH 0,1 mM

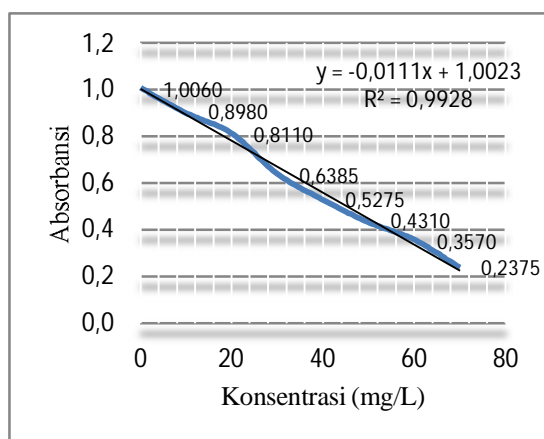
No	Konsentrasi (mg/L)	Nilai Absorbansi Ulangan 1	Nilai Absorbansi Ulangan 2	Nilai rata-rata	Standar Deviasi
1	0,0	1,007	1,005	1,006	0,001
2	10,0	0,904	0,892	0,898	0,008
3	20,0	0,810	0,812	0,811	0,001
4	30,0	0,671	0,606	0,639	0,046
5	40,0	0,526	0,529	0,528	0,002
6	50,0	0,451	0,411	0,431	0,028
7	60,0	0,379	0,335	0,357	0,031
8	70,0	0,246	0,229	0,237	0,012

Hasil pengujian beberapa konsentrasi asam askorbat menunjukkan bahwa nilai absorbansi ideal 0,2-0,8 pada asam askorbat adalah maksimum pada

konstraksi 70 mg/L dengan interval 10 mg/L terhadap radikal bebas DPPH 0,1mM, sehingga nilai R^2 yang dihasilkan dari persamaan tersebut sangat linier yaitu 0,9928.



Gambar 3. Reaksi standar asam askorbat (mg/L) dalam mereduksi radikal bebas DPPH 0,1 mM



Gambar 4. Kurva standar asam askorbat dalam mereduksi radikal bebas DPPH 0,1 mM

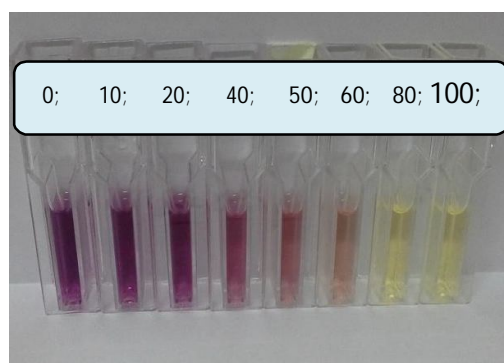
Trolox® atau *6-hidroxy-2,5,7,8 tetramethylcroman-2-carboxylic acid*, merupakan senyawa analog vitamin E yang larut dalam air dan permeable terhadap sel (Prakash 2001), sehingga sering digunakan sebagai standar pada penentuan kapasitas antioksidan pada sampel yang mengandung vitamin E, karena vitamin E salah satu sumber antioksidan.

Hasil pengukuran beberapa standar Trolox® terlihat pada Tabel 3, dimana konsentrasi stok standar tertinggi yang dibuat yaitu 100 mg/L tidak memberikan garis linier, melainkan terjadi peningkatan nilai absorbansi, sehingga konsentrasi optimum berdasarkan nilai

absorbansi ideal yaitu pada konstraksi 60 mg/L. Perubahan warna terlihat jelas hingga dititik optimum (Gambar 5).

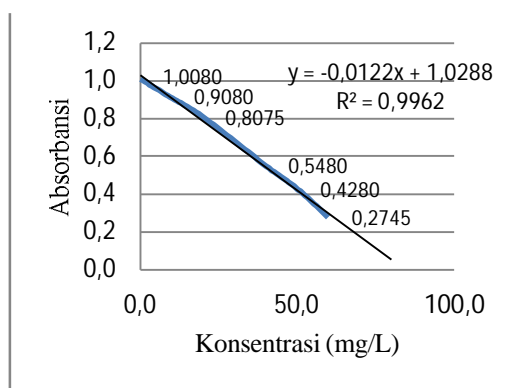
Tabel 3. Nilai absorbansi dan standar deviasi beberapa konsentrasi Trolox® dalam mereduksi radikal bebas DPPH 0,1 mM

No	Konsentrasi (mg/L)	Nilai Absorbansi Ulangan 1	Nilai Absorbansi Ulangan 2	Nilai rata-rata	Standar Deviasi
1	0,0	1,015	1,001	1,008	0,010
2	10,0	0,897	0,919	0,908	0,016
3	20,0	0,825	0,79	0,808	0,025
4	40,0	0,553	0,543	0,548	0,007
5	50,0	0,431	0,425	0,428	0,004
6	60,0	0,285	0,264	0,275	0,015
7	80,0	0,058	0,052	0,055	0,004
8	100,0	0,068	0,070	0,000	0,004



Gambar 5. Reaksi standar Trolox® (mg/L) dalam mereduksi radikal bebas DPPH 0,1 mM

Kurva persamaan garis lurus dari standar antioksidan Trolox® dapat dilihat pada Gambar 6. Konsentrasi optimum sesuai dengan absorbansi ideal adalah 60 mg/L, yang memberikan nilai R^2 0,9962. Hasil penelitian Yoga W. (2008) yang menganalisis kapasitas antioksidan daun Jempiring menggunakan Trolox® sebagai standar pada konsentrasi 10-100 mg/L dengan absorbansi optimum pada konsentrasi 70 mg/L.



Gambar 6. Kurva standar Trolox® dalam mereduksi radikal bebas DPPH 0,1 mM

Simpulan dan Saran

Simpulan yang dapat disampaikan pada penelitian ini adalah nilai absorbansi ideal (0,2-0,8) yang memenuhi hukum *Lambert-Beer* dengan garis kurva regresi linier dengan nilai R^2 0,99 pada kurva standar asam galat (2,5-15 mg/L), asam askorbat (10-70 mg/L) dan Trolox® (10-60 mg/L).

Saran yang ingin disampaikan adalah perlu melakukan penelitian terhadap umur simpan dari standar dan pengukuran beberapa sumber antioksidan lain yang bisa dijadikan standar seperti asam tanat, asam sitrat, quercetin, katekin, kaemferol dll, yang merupakan kelompok senyawa flavonoid sumber antioksidan.

Daftar Pustaka

Atmosukarto. (2003). Mencegah penyakit degeneratif dengan makanan. *Cermin Dunia Kedokteran*. 140:41-49.

Hanani E, Mun'im A, Sekarini R. (2005). Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *Callyspongia sp.* dari kepulauan seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian* Vol II No. 3. Desember. 127-133.

Ismail A, Hong TS. (2002). Antioxidant activity of selected commercial seaweeds. Department of Nutrition and Health Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Putra Malaysia. 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia. *Mal J Nutr* 8(2): 167-177.

Khopkar, S.M. penterjemah oleh A. Saptoraharjo dan Agus Nurhadi. (1990). *Konsep dasar kimia analitik*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.

Miliauskas G^a, Venskutonis PR^a, Beek TAV^b. (2003). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. ^aKaunus University of Technology, Department of Food Technology, ^bLaboratory of Organic Chemistry, Natural Products Chemistry Group, Wageningen University. *Food Chemistry*.

Muchtady D. 2012. *Pangan fungsional dan senyawa bioaktif*. Alfabeta. Bandung

Othman A^a, Ismail A^a, Ghani NA^a, Adenan I^b. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. Department of Nutrition and Health Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM, Serdang, Selangor Malaysia. ^bForest Research Institute Malaysia (FRIM) Kepong, 52109 Kuala Lumpur, Malaysia. *Food Chemistry* 100 (2007) 1523-1530.

Prakash A. (2001). Antioxidant activity. *Meddalion Laboratories Analytical Progress*. Vol 19 no 2.

Procorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001). *Antioxidant in food partical application*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge England. CRC Press. Boca Raton Boston New York Washington, DC.

Sakanaka S, Tachibana Y, Okada, Yuki. 2005. Preparation and antioxiant properties of extracts of Japanese persimo leaf tea (*kakinocha-cha*). *Food chemistry* 89. 569-575.

Smejkal K., Holobova P., Zima A., Muselik J., Dvorska M. (2007). Antiradical activity of *Paulownia tomentosa* (Scrophulariaceae) Extracts. *Natural Drug Department, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceautical Sciences Brno. Molecules* 2007, 12, 1210-1219.

Yan LY., Teng LT., Jhi TJ. (2006). Antioxidant properties of guava fruit: Comparison with Some Local Fruits. *Sunway Academic Journal* 3, 9-20. Monash University Malaysia

Yoga W. 2008. Identifikasi komponen pembentuk gel (KPG) dan potensi antioksidan daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* Ellis). [tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor