

## Optimization of Microplate Type Uv-Vis Spectrophotometer Performance as an Antioxidant Activity Testing Instrument

Martin Sulistyani ✉, Widhi Mahatmanti, Nuril Huda, dan Ridho Prasetyo

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang  
Gedung D8 Kampus Sekaran Gunungpati Telp. (024)8508112 Semarang 50229

### Info Artikel

Diterima: 17-05-2024

Disetujui: 27-05-2024

Dipublikasikan: 27-05-2024

### Keywords:

Validasi Metode,  
Antioksidan,  
DPPH (2,2-difenil-1-  
pikrilhidrazil)

### Abstrak

Analisis aktivitas antioksidan bertujuan untuk menganalisis kemampuan suatu senyawa dalam menghambat dan menetralkan reaksi oksidasi yang melibatkan radikal bebas. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Keunggulan metode DPPH antara lain metode analisis yang sederhana, sensitif, stabil, cepat, mudah, dapat digunakan dalam sample jumlah kecil. Asam askorbat digunakan sebagai kontrol dalam penelitian ini, sebagai pembanding digunakan beberapa ekstrak tanaman. Riset ini bertujuan untuk menganalisis optimasi kinerja Spektrofotometer uv-vis tipe microplate sebagai instrumen pengujian aktivitas antioksidan meliputi penentuan gelombang maksimum, linearitas, presisi dan nilai IC50. Validasi metode analisis aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH memiliki selektivitas pada panjang gelombang 517 nm. Hasil validasi menunjukkan kinerja Spektrofotometer uv-vis dalam pengujian masih sangat baik hal ini dibuktikan dengan reproduksibilitas dan presisi yang menunjukkan nilai RSD rata-rata <2%. Pengukuran pada larutan asam askorbat sebagai kontrol diperoleh nilai R<sup>2</sup> sebesar 0.9781 degan batas LoD dan LoQ sebesar 0,961 dan 3,053. Sedangkan nilai IC50 pada asam askorbat, jahe dan kunyit masing-masing sebesar: 14,7218 (sangatt kuat), 29,9194 (sangat kuat), dan 52,4943 (kuat).

Kata Kunci: Validasi Metode, Antioksidan, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

### Abstract

Eliminating a compound's capacity to impede and neutralize free radical-induced oxidation processes is the goal of antioxidant activity analysis. The DPPH (pikrilhidrazil-2,2-difenil-1) method was the approach taken in this investigation. Simple, sensitive, stable, quick, straightforward, and suitable for usage with tiny sample volumes are some of the benefits of DPPH procedures. In this investigation, some plant extracts were employed as a comparison, with ascorbic acid serving as the control. In order to evaluate a microplate-type uv-vis Spectrophotometer effectiveness as an antioxidant activity test tool, the study will determine its maximum wave, linearity, accuracy, and IC50 values. Wavelength selectivity is found in 517 nm. The results validation of the DPPH method for analyzing the activity of antioxidants. Measurements of the ascorbic acid solution as a control obtained R<sup>2</sup> values of 0.9781 compared to the LoD and LoQ limits of 0.961 and 3.053 respectively. The IC50 of ascorbic acid, ginger and turmeric, respectively, was 14.7218 (strong), 29.9194 (very strong), and 52.4943 (strong).

Keywords: Method Validation, Antioxidants, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

© 2024 Universitas Negeri Semarang

## Pendahuluan

Perkembangan industri yang semakin pesat memiliki korelasi terhadap jumlah radikal bebas yang dihasilkan. Polusi udara merupakan salah satu sumber radikal bebas yang berasal dari luar tubuh selain makanan, minuman, radiasi, ozon dan pestisida (Sianturi, 2019). Radikal bebas bertanggung jawab terhadap kerusakan sel dan jaringan. Radikal bebas yang berlebih di dalam tubuh menyebabkan kerusakan fungsional seluler (Zalukhu *et al.*, 2016) dan menimbulkan beberapa penyakit seperti kanker, parkinson, alzheimer, gangguan pernafasan, gangguan syaraf (Sirivibulkovit *et al.*, 2018), dan diabetes militus (Sianturi, 2019). Antioksidan adalah molekul yang dapat berinteraksi dan menghambat inisiasi atau penyebaran reaksi berantai oksidasi yang dihasilkan oleh radikal bebas reaktif sebelum molekul vital rusak (Sirivibulkovit *et al.*, 2018).

Beberapa senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan antara lain asam askorbat (Azam *et al.*, 2021)(Gaafar *et al.*, 2020) dan senyawa fenolik (Shahidi & Ambigaipalan, 2015)(Adebo & Medina-Meza, 2020)(Hagos *et al.*, 2023). Senyawa tersebut banyak terkandung dalam tumbuhan dan buah-buahan(Okzelia & Nurdaini, 2019). Beberapa tanaman yang memiliki aktivitas antioksidan antara lain bunga telang(Andriani & Murtisiwi, 2020)(Apriani & Pratiwi, 2021), buah maja(Muhammad Nur Fauzi *et al.*, 2021), daun tembakau(Yati *et al.*, 2022), daun kelapa sawit(Patimah *et al.*, 2023), daun magrove(Haryoto *et al.*, n.d.), daun kemangi (Himawan *et al.*, 2021) kunyit(Suena *et al.*, 2021)(Suprihatin *et al.*, 2020), dan jahe(Yuliani *et al.*, 2016)(Sari & Nasuha, 2021).

Laboratorium di Perguruan Tinggi khususnya laboratorium kimia Universitas Negeri Semarang memiliki peran dalam pengujian senyawa antioksidan dari berbagai tanaman. Spektrofotometer uv-vis tipe microplate merupakan instrumen yang dimiliki Laboratorium Kimia FMIPA UNNES yang memiliki kinerja optimum dan ketelitian yang sangat tinggi (Sulistyani *et al.*, 2023). Penelitian ini merupakan pengembangan instrumen Spektrofotometer uv-vis sebagai instrumen pengujian aktivitas antioksidan. Analisis akktivitas antioksidan dibuktikan dengan nilai konsentrasi inhibisi (IC 50) dimana semakin kecil nilai IC 50 yang didapatkan semakin tinggi aktifitas antioksidan (Xiao *et al.*, 2020)(Osés *et al.*, 2020). Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sirivibulkovit *et al.*, 2018)(Andriani & Murtisiwi, 2020)(Patimah *et al.*, 2023).

Metode DPPH memiliki kelebihan seperti sederhana, cepat dilakukan, hemat biaya dan efisien(Wołosiak *et al.*, 2022)(Munteanu & Apetrei, 2021). DPPH adalah senyawa yang tidak larut dalam air, berwarna dan sangat stabil, dengan dua sifat tersebut menjadikan DPPH sebagai reagen dalam pengujian antioksidan. DPPH memiliki panjang gelombang berkisar 515-520 nm apabila dilarutkan dalam larutan alkohol. Larutan akan berubah menjadi warna oranye-kuning setelah direaksikan dengan senyawa antioksidan. Perubahan warna terjadi akibat bagian luar DPPH tereduksi. Dengan demikian, semakin tinggi aktivitas antioksidan maka semakin kuat dekolonisasi reagenya. Riset ini bertujuan untuk menganalisis optimasi kinerja Spektrofotometer uv-vis tipe microplate sebagai instrumen pengujian aktivitas antioksidan pada sampel asam askorbat, ekstrak kunyit dan ekstrak jahe merah.

## Metode

Peralatan yang digunakan dalam riset ini antara lain: Rotary evaporator (*Eyela*), neraca analitik (*O-Haus*), Spektrofotometer uv-vis (*Fluostar Omega BMG LabTech*), Mikroplate kuarsa (BMG Labtech 96), botol gelap, Hot plate dan stirrer (*D Lab*), Labu ukur 10 mL (*pyrex*), Labu Ukur 25 mL (*pyrex*), Mikropipet 100 mikroliter, pipet ukur (*pyrex*), pipet volume(*pyrex*), ball pipet, gelas beker,.

Bahan yang digunakan antara lain: DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) , Asam Askorbat p.a (*Merck*), Metanol p.a (*Merck*), aluminium foil, etanol p.a (*merck*), kertas saring, serbuk kunyit, dan serbuk jahe merah.

### a) Preparasi Sampel

Ekstraksi sampel dilakukan menggunakan metode maserasi, serbuk kunyit dan jahe merah masing-masing dimaserasi menggunakan etanol 96% (perbandingan 1:10) selama 7 hari (Farjadmand *et al.*, 2018)(Tambun *et al.*, 2021)(Jovanović *et al.*, 2017). Sampel ditutup rapat dalam kondisi terlindung dari cahaya matahari dan dilakukan pengadukan tiap 24 jam. Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat.

### b) Ekstraksi Sampel

Hasil maserasi yang telah didapat pada langkah 1, dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, tekanan 140 mmHg, kecepatan putaran 25 rpm (Sapiun *et al.*, 2020)(Bennour *et al.*, 2020). Hasil yang didapatkan digunakan sebagai sampel uji.

**c) Persiapan Larutan Kontrol Asam Askorbat 20 ppm**

Asam askorbat memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Azam *et al.*, 2021) (Sayed Mostafa & Fawzy El Azab, 2022). Penelitian ini menggunakan asam askorbat 20 ppm sebagai larutan kontrol positif.

**d) Persiapan Larutan Sampel Ekstrak dari Tanaman**

Larutan sampel 100 ppm dibuat dengan melarutkan masing-masing 1 mg ekstrak dalam 10 mL metanol.

**e) Persiapan Larutan DPPH 100 ppm**

Larutan DPPH 100 ppm dibuat dengan melarutkan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dalam 10 mL metanol (Yati *et al.*, 2022) (Okzelia & Nurdaini, 2019).

**f) Persiapan Optimasi Instrumen Spektrofotometer uv-vis**

Instrumen Spektrofotometer uv-vis tipe *microplate* (*Fluostar Omega BMG LabTech*) dihidupkan sesuai SOP dan ditunggu selama 30-60 menit untuk memastikan instrument siap untuk membaca sampel (Sulistyani *et al.*, 2023).

**g) Pengecekan Absorbansi Microplate**

Pastikan instrument Spektrofotometer uv-vis sudah siap untuk membaca absorbansi sampel. Scan *microplate* kosong pada panjang gelombang 220-1000 nm. Catat absorbansi pada masing-masing *hole* (Sulistyani *et al.*, 2023).

**h) Penetapan Panjang Gelombang Maksimum**

Larutan DPPH 100 ppm diambil masing-masing sebanyak 100 mikroliter dan diinjeksikan kedalam *hole*. Lakukan pembacaan pada panjang gelombang 400 – 800 nm. Ulangi pembacaan sebanyak 10 kali (Sulistyani *et al.*, 2023) (Himawan *et al.*, 2021).

**i) Pembuatan Larutan Kontrol dan Larutan Sampel**

Masing-masing larutan dipipet dengan volume dan perbandingan yang ditunjukkan pada Tabel 1 untuk larutan asam askorbat dan Tabel 2 untuk larutan sampel ekstrak.

**Tabel 1.** Perbandingan Volume Asam Askorbat

| Konsentrasi (ppm) | Volume Asam Askorbat (μL) | Volume Metanol (μL) | Volume DPPH (μL) |
|-------------------|---------------------------|---------------------|------------------|
| Kontrol           | -                         | 100                 | 100              |
| Blanko            | -                         | 200                 | -                |
| 2                 | 10                        | 90                  | 100              |
| 6                 | 30                        | 70                  | 100              |
| 10                | 50                        | 50                  | 100              |
| 14                | 70                        | 30                  | 100              |
| 18                | 90                        | 10                  | 100              |

**Tabel 2.** Perbandingan Volume Ekstrak Kunyit dan Jahe Merah

| Konsentrasi (ppm) | Volume Sampel (μL) | Volume Metanol (μL) | Volume DPPH (μL) |
|-------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| Kontrol           | -                  | 100                 | 100              |
| Blanko            | -                  | 200                 | -                |
| 10                | 10                 | 90                  | 100              |
| 30                | 30                 | 70                  | 100              |
| 50                | 50                 | 50                  | 100              |
| 70                | 70                 | 30                  | 100              |
| 90                | 90                 | 10                  | 100              |

Setelah direaksikan dengan DPPH masing – masing larutan diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap. Selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada langkah 8. Lakukan pembacaan sebanyak 10 kali. Hasil yang diperoleh kemudian dianalisis.

### j) Pengukuran Aktivitas Antioksidan Larutan Kontrol dan Larutan Sampel

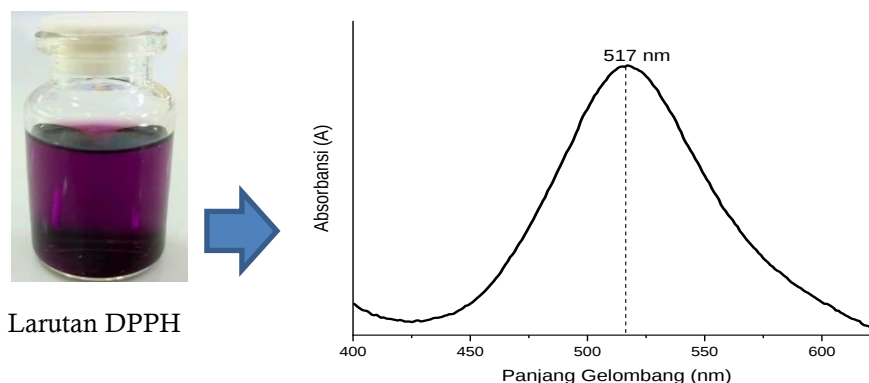
Perhitungan nilai IC 50 dihitung berdasarkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi larutan sampel. Persentase inhibisi dihitung menggunakan persamaan 1:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol DPPH} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol DPPH}} \times 100\% \dots (1)$$

### Hasil dan Pembahasan

#### Optimasi Panjang Gelombang DPPH dan Selektivitas

Optimasi panjang gelombang DPPH bertujuan untuk menentukan panjang gelombang maksimum untuk mengukur absorbansi DPPH secara akurat dan sensitif. DPPH adalah senyawa yang berubah warna ketika teroksidasi (Supriatna *et al.*, 2023). Pada keadaan tereduksi, DPPH berwarna ungu tua, sedangkan ketika teroksidasi, warnanya berubah menjadi kuning pucat (Antari *et al.*, 2023). Optimasi Panjang gelombang memastikan bahwa panjang gelombang yang digunakan memberikan respons maksimal dari DPPH saat teroksidasi atau tereduksi (Salsabila, 2022). Absorbansi yang diperoleh lebih konsisten dan dapat akurat dalam interpretasi hasil penelitian dan kesimpulan yang diambil mengenai aktivitas antioksidan sampel yang diuji. Berdasarkan hasil pengukuran pada rentang 400-800 nm didapatkan panjang gelombang maksimum senyawa DPPH berada pada 517 nm. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan panjang gelombang maksimum DPPH berkisar pada 515-520 nm (Sirivibulkovit *et al.*, 2018; Yuliani *et al.*, 2016). Interpretasi pengukuran Panjang gelombang maksimum senyawa DPPH disajikan pada gambar 1.



**Gambar 1.** Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Senyawa DPPH 100 ppm

#### Pengukuran Absorbansi Senyawa DPPH

Intensitas perubahan warna yang semula berwarna ungu menjadi kuning dikuantisasikan menggunakan Spektrofotometer uv-vis dalam nilai absorbansi. Nilai absorbansi larutan DPPH digunakan sebagai acuan dalam penentuan nilai aktivitas suatu sampel dalam menghambat atau menetralkan radikal bebas (Baliyan *et al.*, 2022). Secara umum absorbansi DPPH digunakan sebagai larutan blanko atau kontrol negatif. Penentuan aktivitas antioksidan, nilai absorbansi larutan DPPH digunakan dalam perhitungan persentase inhibisi. Hasil pengukuran nilai absorbansi senyawa DPPH ditunjukkan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Pengukuran Absorbansi Larutan DPPH

| Sampel       | Absorbansi |       |       |       |       |       |       |       |       |       | Absorbansi Rata-Rata |
|--------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------|
|              | 1          | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |                      |
| DPPH 100 ppm | 0,866      | 0,865 | 0,864 | 0,864 | 0,865 | 0,865 | 0,866 | 0,864 | 0,864 | 0,864 | 0,865                |

Hasil pengukuran menunjukkan nilai absorbansi rata-rata senyawa DPPH 100 ppm sebesar 0,865. Nilai ini digunakan sebagai nilai absorbansi larutan kontrol DPPH pada validasi metode dan analisis lebih lanjut

**Validasi Metode Uji Antioksidan Metode DPPH****a. Reprodutibilitas dan Presisi**

Reprodutibilitas yang baik mengacu pada kemampuan instrumen dalam mengukur nilai absorbansi pada sampel yang sama dan dilakukan pengulangan. Reprodutibilitas erat kaitanya dengan presisi dimana keduanya merupakan parameter yang penting dalam menjamin validitas dan keadalan instrumen dalam analisis (Meng *et al.*, 2021) (Sulistyani *et al.*, 2023). Evaluasi stabilitas dan presisi larutan standar asam askorbat terhadap aktivitas antioksidan ditunjukkan pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Reprodutibilitas dan Presisi Asam Askorbat

| Konsentrasi | Absorbansi |       |       | Absorbansi Rata-Rata | Blank Correct | SD    | RSD   | %RSD   |
|-------------|------------|-------|-------|----------------------|---------------|-------|-------|--------|
|             | 1          | 2     | 3     |                      |               |       |       |        |
| Kontrol     |            |       |       | 0,865                | 0,809         |       |       |        |
| Blanko      |            |       |       | 0,056                | 0,000         |       |       |        |
| 2           | 0,69       | 0,702 | 0,704 | 0,699                | 0,643         | 0,008 | 0,011 | 1,084% |
| 6           | 0,664      | 0,668 | 0,666 | 0,666                | 0,610         | 0,002 | 0,003 | 0,300% |
| 10          | 0,539      | 0,542 | 0,544 | 0,542                | 0,486         | 0,003 | 0,005 | 0,465% |
| 14          | 0,472      | 0,48  | 0,486 | 0,479                | 0,423         | 0,007 | 0,015 | 1,465% |
| 18          | 0,384      | 0,39  | 0,399 | 0,391                | 0,335         | 0,008 | 0,019 | 1,931% |

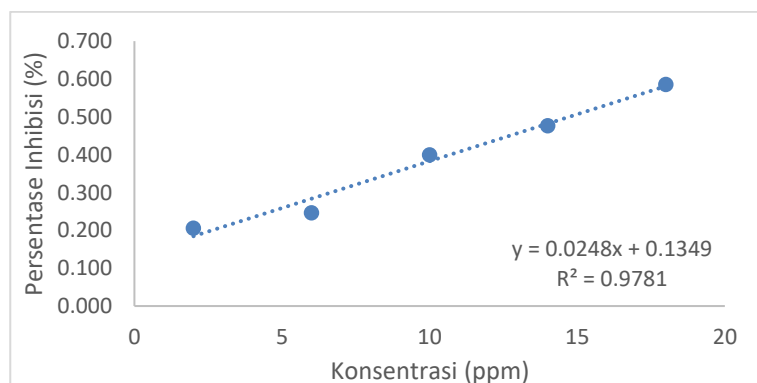
Evaluasi ketepatan metode dinyatakan dengan nilai % standar deviasi relatif (%RSD) atau koefisien variasi (CV). Hasil evaluasi ditunjukkan rata-rata %RSD sebesar <2%. Hasil ini membuktikan bahwa validasi metode pengujian aktivitas antioksidan sangat baik.

**b. Linearitas**

Evaluasi linearitas metode uji aktivitas antioksidan ditunjukkan berdasarkan koefisien determinasi ( $R^2$ ). Larutan asam askorbat dengan beberapa variasi konsentrasi digunakan sebagai larutan standar untuk memastikan hubungan linier yang baik. Pengujian linearitas aktivitas antioksidan dilakukan dengan memploting konsentrasi dengan nilai persentase inhibisi (Munteanu & Apetrei, 2021b) (Hassan *et al.*, 2020). Hasil pengukuran dan analisis linearitas aktivitas antioksidan pada larutan asam askorbat ditunjukkan pada Tabel 5 dan Gambar 2.

**Tabel 5.** Pengukuran Absorbansi Larutan Asam Askorbat

| Konsentrasi | Absorbansi Rata-Rata | Blank Correct | Inhibisi | % Inhibisi |
|-------------|----------------------|---------------|----------|------------|
| Kontrol     | 0,865                | 0,809         |          |            |
| Blanko      | 0,056                | 0,000         |          |            |
| 2           | 0,699                | 0,643         | 0,206    | 20,560%    |
| 6           | 0,666                | 0,610         | 0,246    | 24,598%    |
| 10          | 0,542                | 0,486         | 0,400    | 39,967%    |
| 14          | 0,479                | 0,423         | 0,477    | 47,672%    |
| 18          | 0,391                | 0,335         | 0,586    | 58,591%    |

**Gambar 2.** Kurva Kalibrasi Asam Askorbat

Lineritas larutan kurva kalibrasi asam askorbat menunjukkan pola regresi linear. Hasil ini mengacu pada nilai koefisien determinasi yang menunjukkan nilai 0,9781. Hubungan linearitas yang kuat antara konsentrasi dan persentase inhibisi dibuktikan dengan nilai koefisien determinasi yang mendekati nilai 1. Semakin tinggi konsentrasi maka nilai persentase inhibisi semakin tinggi. Hasil ini akan digunakan untuk validasi metode uji sekaligus sebagai pembanding aktivitas antioksidan pada sampel.

**c. LoD dan LoQ**

Instrumen Spektrofotometer uv-vis memiliki batas kuantifikasi dan batas deteksi yang berbeda dalam menganalisis suatu sampel. Analisis batas kuantifikasi(LoD) dan batas deteksi(LoQ) merupakan salah satu parameter dalam validasi metode. Tujuan pengukuran LoD dan LoQ adalah menentukan batas konsentrasu suatu analit yang dapat terkuantifikasi dan terdeteksi oleh instrumen(Wahyuni *et al.*, 2021). Hasil analisis LoD dan LoQ ditunjukkan pada Tabel 6.

**Tabel 6.** Penentuan Nilai LoD dan LoQ

| Konsentrasi (ppm) | SD    | LoD   | LoQ   |
|-------------------|-------|-------|-------|
| 2                 | 0,008 | 0,916 | 3,053 |

**d. Nilai IC 50 dan aktivitas antioksidan**

Penentuan efektivitas suatu senyawa dalam menghambat atau menetralsir radikal bebas dibuktikan dengan nilai IC 50. IC 50 (*Inhibitor Concentration 50*) menunjukkan konsentrasi senyawa atau sampel yang diperlukan untuk menghambat aktivitas radikal bebas atau kerusakan oksidatif sebesar 50%(Phuyal *et al.*, 2020). Semakin rendah nilai IC 50, semakin kuat potensi suatu senyawa dalam menghambat atau menetralsir radikal bebas. Aktivitas antioksidan dikatakan kuat apabila nilai IC 50 yang diperoleh kurang dari 50, Kuat (50-100), sedang (100-150), lemah (151-00), dan tidak memiliki aktivitas antioksidan atau sangat lemah (lebih dari 200) (Nurmazela & Rani, 2023). Berdasarkan persamaan 1 dan tabel 5 didapatkan nilai IC 50 asam askorbat sebesar 14,7218 (Tabel 7). Sehingga dapat disimpulkan bahwa asam askorbat memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat. Hasil ini digunakan sebagai pembanding dalam perhitungan aktivitas antioksidan pada sampel kunyit dan jahe.

**Tabel 7.** Perhitungan Nilai IC 50

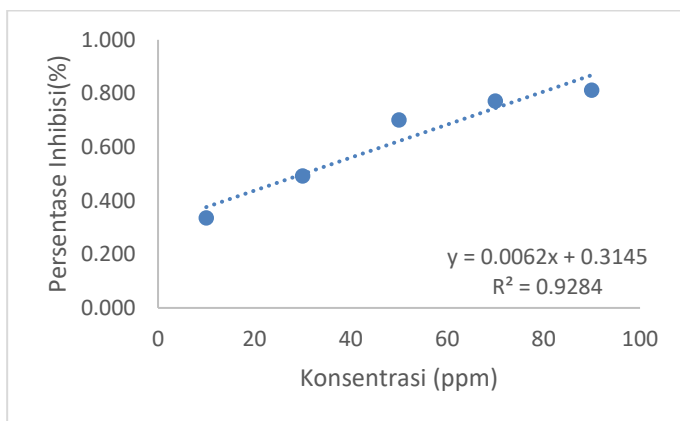
| Slope  | Intersep | Nilai IC 50 | Aktivitas Antioksidan |
|--------|----------|-------------|-----------------------|
| 0,0248 | 0,1349   | 14,7218     | Sangat Kuat           |

**Penentuan aktivitas antioksidan pada Ekstraks Jahe dan Kunyit**

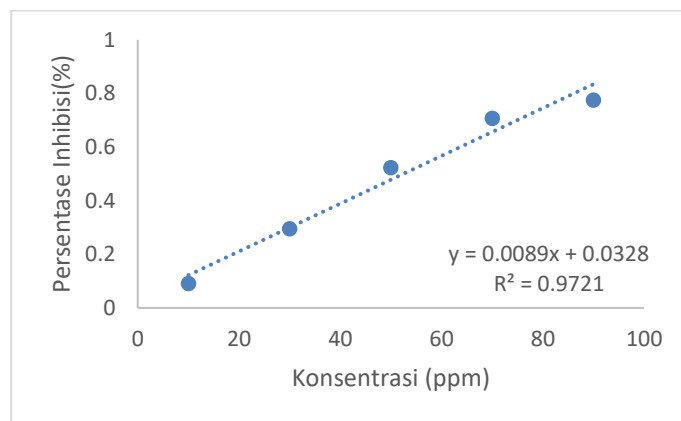
Tanaman mengandung berbagai senyawa yang memiliki aktifitas antioksidan. Senyawa antioksidan dalam tanaman memiliki peran penting dalam melindungi sel-sel dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas (Jamshidi-Kia *et al.*, 2020). Metabolite sekunder pada tanaman yang memiliki aktivitas antioksidan salah satunya golongan flavonoid dan saponin. Kunyit memiliki senyawa aktif kurkuminoid (kurkumin) yang memiliki kemampuan menghambat kerusakan oksidatif dalam tubuh yang disebabkan oleh radikal bebas (de Oliveira Filho *et al.*, 2021). Sedangkan jahe memiliki senyawa aktif seperti gingerol, shogaol, zingeron dan fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat baik (Ballester *et al.*, 2023). Sebagai senyawa antioksidan baik yang terkandung dalam kunyit maupun jahe memiliki peran melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Kerusakan oksidatif pada sel – sel tubuh menyebabkan penuaan dini, berkembangnya penyakit degeneratif dan berbagai masalah kesehatan lainnya (Chaudhary *et al.*, 2023). Dengan terhambatnya aktivitas radikal bebas, maka dapat membantu menjaga kesehatan dan mencegah kerusakan sel (Martemucci *et al.*, 2022). Analisis pehitungan persentase inhibisi dan pembuatan kurva regresi linear pada sampel jahe dan kunyit ditunjukkan pada Tabel 8 dan Gambar 3.

**Tabel 8.** Perhitungan Nilai IC 50

| Jahe              |            |               |                     | Kunyit            |            |               |                     |
|-------------------|------------|---------------|---------------------|-------------------|------------|---------------|---------------------|
| Konsentrasi (ppm) | Absorbansi | Blank Correct | Persentase Inhibisi | Konsentrasi (ppm) | Absorbansi | Blank Correct | Persentase Inhibisi |
| Kontrol           | 0,865      | 0,809         |                     | Kontrol           | 0,865      | 0,809         |                     |
| Blanko            | 0,056      | 0             |                     | Blanko            | 0,056      | 0,000         |                     |
| 10                | 0,593      | 0,537         | 33,581%             | 10                | 0,792      | 0,736         | 9,065%              |
| 30                | 0,467      | 0,411         | 49,197%             | 30                | 0,626      | 0,570         | 29,501%             |
| 50                | 0,298      | 0,242         | 70,045%             | 50                | 0,442      | 0,386         | 52,246%             |
| 70                | 0,241      | 0,185         | 77,132%             | 70                | 0,293      | 0,237         | 70,746%             |
| 90                | 0,208      | 0,152         | 81,170%             | 90                | 0,238      | 0,182         | 77,503%             |



(a)



(b)

**Gambar 3.** Kurva Regresi Linear (a) Jahe (b) kunyit

Data yang didapatkan pada kurva regresi linear sampel jahe dan kunyit masing-masing didapatkan  $R^2$  sebesar 0.9284 dan 0.9721. Berdasarkan data tersebut persamaan regresi linear yang diperoleh digunakan dalam perhitungan IC 50 untuk menentukan aktivitas antioksidan pada sampel jahe dan kunyit. Perhitungan IC 50 ditunjukkan pada Tabel 9.

**Tabel 9.** Perhitungan Nilai IC 50

| Jahe   |          |             |                       | Kunyit |          |             |                       |
|--------|----------|-------------|-----------------------|--------|----------|-------------|-----------------------|
| Slope  | Intersep | Nilai IC 50 | Aktivitas Antioksidan | Slope  | Intersep | Nilai IC 50 | Aktivitas Antioksidan |
| 0,0062 | 0,3145   | 29,9194     | Sangat Kuat           | 0,0089 | 0,0328   | 52,4943     | Kuat                  |

Berdasarkan Tabel 9 didapatkan nilai IC 50 untuk sampel jahe sebesar 29,9194 nilai ini menunjukkan bahwa ekstrak jahe memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada sampel kunyit dimana nilai IC 50 yang didapatkan sebesar 52,4943 dengan aktivitas antioksidan kuat.

### Simpulan

Validasi metode analisis aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH memiliki selektivitas pada panjang gelombang 517 nm. Hasil validasi menunjukkan kinerja Spektrofotometer uv-vis dalam pengujian masih sangat baik hal ini dibuktikan dengan reproduksibilitas dan presisi yang menunjukkan nilai RSD rata-rata <2%. Pengukuran pada larutan asam askorbat sebagai kontrol di peroleh nilai  $R^2$  sebesar 0,9781 dengan batas LoD dan LoQ sebesar 0,961 dan 3,053. Sedangkan nilai IC50 pada asam askorbat, jahe dan kunyit masing-masing sebesar: 14,7218(sangat kuat), 29,9194(sangat kuat), dan 52,4943(kuat). Metode DPPH adalah metode yang cepat dan sederhana untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan sampel. Namun, penting untuk diketahui bahwa metode ini memberikan informasi mengenai kapasitas meredam radikal bebas DPPH saja dan tidak bisa dianggap sebagai indikator yang lengkap untuk aktivitas antioksidan secara keseluruhan. Oleh karena itu, disarankan untuk mengkombinasikan metode DPPH dengan metode lain dalam analisis antioksidan untuk mendapatkan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai aktivitas antioksidan sampel.

### Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan dana hibah penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- Adebo, O. A., & Medina-Meza, I. G. (2020). Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: A mini review. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25040927>
- Andriani, D., & Murtisiwi, L. (2020). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70% Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) dari Daerah Sleman dengan Metode DPPH Antioxidant Activity Test of 70% Ethanol Extract of Telang Flower (*Clitoria ternatea* L) from Sleman Area with DPPH Method. In *Jurnal Farmasi Indonesia* (Vol. 1, Issue 1). <http://journals.ums.ac.id/index.php/pharmacon>
- Antari, E. D., Nafisah, U., Eka, W., Dewi, R., Muna, K., Kunci, K., Antioksidan, :, & Wangi, S. (2023). Uji Aktivitas Antioksidan pada Hidrosol Sereh Wangi (*Cymbopogon nardus*). *Jurnal Pharmascience* 288 *Jurnal Pharmascience*, 10(2), 288–295. <https://ppjp.ulm.ac.id/journal/index.php/pharmascience>
- Apriani, S., & Pratiwi, F. D. (2021). *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Telang (Clitoria Ternatea L.) Menggunakan Metode DPPH (2,2 Diphenyl 1-1 Picrylhydrazyl)*. (Vol. 5, Issue 3).
- Azam, M., Hameed, L., Qadri, R., Ejaz, S., Aslam, A., Khan, M. I., Shen, J., Zhang, J., Nafees, M., Ahmad, I., Ghani, M. A., Chen, J., & Anjum, N. (2021). Postharvest ascorbic acid application maintained physiological and antioxidant responses of guava (*Psidium guajava* L.) at ambient storage. *Food Science and Technology (Brazil)*, 41(3), 748–754. <https://doi.org/10.1590/fst.19820>
- Baliyan, S., Mukherjee, R., Priyadarshini, A., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., & Chang, C. M. (2022). Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041326>
- Ballester, P., Cerdá, B., Arcusa, R., García-Muñoz, A. M., Marhuenda, J., & Zafrilla, P. (2023). Antioxidant Activity in Extracts from Zingiberaceae Family: Cardamom, Turmeric, and Ginger. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules28104024>
- Bennour, N., Mighri, H., Eljani, H., Zammouri, T., & Akrou, A. (2020). Effect of solvent evaporation method on phenolic compounds and the antioxidant activity of *Moringa oleifera* cultivated in Southern Tunisia. *South African Journal of Botany*, 129, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.005>
- Chaudhary, P., Janmeda, P., Docea, A. O., Yeskaliyeva, B., Abdull Razis, A. F., Modu, B., Calina, D., & Sharifi-Rad, J. (2023). Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1158198>
- de Oliveira Filho, J. G., de Almeida, M. J., Sousa, T. L., dos Santos, D. C., & Egea, M. B. (2021). Bioactive Compounds of Turmeric (*Curcuma longa* L.). In *Reference Series in Phytochemistry* (pp. 297–318). Springer Science and Business Media B.V. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-57415-4\\_37](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57415-4_37)
- Farjadmand, F., Khanavi, M., Eftekhari, M., Hosseinsalari, A., Akbarzadeh, T., Safavi, M., Asatouri, R., Mirabzadeh, M., & Shams Ardekani, M. R. (2018). The Effect of Extraction Method on the Major Constituents and Biological Effects of *Trachyspermum ammi* L. Fruits. In *Research Journal of Pharmacognosy* (Vol. 5, Issue 1).
- Gaafar, A. A., Ali, S. I., El-Shawadfy, M. A., Salama, Z. A., Sekara, A., Ulrichs, C., & Abdelhamid, M. T. (2020). Ascorbic acid induces the increase of secondary metabolites, antioxidant activity, growth, and productivity of the common bean under water stress conditions. *Plants*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/plants9050627>
- Hagos, M., Chandravanshi, B. S., Redi-Abshiro, M., & Yaya, E. E. (2023). Determination Of Total Phenolic, Total Flavonoid, Ascorbic Acid Contents And Antioxidant Activity Of Pumpkin Flesh, Peel And Seeds. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 37(5), 1093–1108. <https://doi.org/10.4314/bcse.v37i5.3>
- Haryoto, H., Frista, A., Achmad Yani Tromol Pos, J., Kartasura, P., Tengah, J., & Sains dan Kesehatan, J. (n.d.). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Fraksi Polar, Semipolar dan Non Polar dari Daun Mangrove Kacangan (*Rhizophora apiculata*) dengan Metode DPPH dan FRAP. *J. Sains Kes.* 2019, 2(2). <https://doi.org/10.25026/jsk.v2i2.129>

- Hassan, A., Akmal, Z., Khan, N., & Alparslan, Y. (2020). The Phytochemical Screening and Antioxidants Potential of *Schoenoplectus triqueter* L. Palla. *Journal of Chemistry*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3865139>
- Himawan, H. C., Isa, A. F., & Wiharja, D. S. (2021). Antioxidant Activity of 70% Ethanol Extract Combination of Kemangi Leaf (*Ocimum Americanum* Linn) and Binahong Leaf (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Using DPPH. *Journal of Physics: Conference Series*, 1764(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1764/1/012009>
- Jamshidi-Kia, F., Wibowo, J. P., Elachouri, M., Masumi, R., Salehifard-Jouneghani, A., Abolhassanzadeh, Z., & Lorigooini, Z. (2020). Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 9(3), 191–199. <https://doi.org/10.34172/jhp.2020.25>
- Jovanović, A. A., Đorđević, V. B., Zdunić, G. M., Pljevljakušić, D. S., Šavikin, K. P., Gođevac, D. M., & Bugarski, B. M. (2017). Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology*, 179, 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055>
- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. G. (2022). Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen*, 2(2), 48–78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>
- Meng, J., Lv, Z., Zhang, Y., Wang, Y., Qiao, X., Sun, C., Chen, Y., Guo, M., Han, W., Ye, A., Xie, T., Chu, B., Shi, C., Yang, S., & Chen, C. (2021). Precision Redox: The Key for Antioxidant Pharmacology. *Antioxidants and Redox Signaling*, 34(14), 1069–1082. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8212>
- Muhammad Nur Fauzi, Joko Santoso, & Aldi Budi Riyanta. (2021). Uji Kualitatif dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Buah Maja (*Aegle Marmelos* (L.)Correa) dengan Metode DPPH. *Jurnal Riset Farmasi*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.29313/jrf.v1i1.25>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021a). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021b). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nurmazela, V., & Rani, Z. (2023). Antioxidant Activity Test Of Barangan Banana Hump's Ethanol Extract (*Musa Paradisiaca* (L.)) With DPPH (1,1 Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Methods. *International Journal of Science, Technology & Management*, 1478–1483. <http://ijstm.inarah.co.id>
- Okzelia, S. D., & Nurdaini, M. (2019). Antioxidant Activity of Pidada (*Sonneratia caseolaris* (L.) Engl.) Fruit Extract by DPPH Method. *Singapore International Multidisciplinary Academic Conference (SIMAC)*, 1–9. <https://www.researchgate.net/publication/338764485>
- Osés, S. M., Marcos, P., Azofra, P., de Pabl, A., Fernández-Muñoz, M. Á., & Sancho, M. T. (2020). Phenolic profile, antioxidant capacities and enzymatic inhibitory activities of propolis from different geographical areas: Needs for analytical harmonization. *Antioxidants*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/antiox9010075>
- Patimah, R., Ahdyani, R., & Pratiwi Indah Lestari, Y. (2023). Potensi Antioksidan Sediaan Krim Ekstrak Etanol Daun Klapa Sawit (*Elaeis Guineensis* Jack.) Dengan Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). In *Potensi Antioksidan Sediaan ... Journal of Pharmacopolium* (Vol. 6, Issue 1).
- Phuyal, N., Jha, P. K., Raturi, P. P., & Rajbhandary, S. (2020). Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities of Fruit, Seed, and Bark Extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. *Scientific World Journal*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8780704>
- Salsabila, S. R. (2022). Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Pada Daun Benalu Mahoni (*Dendrophthua* Sp).
- Sapiun, Z., Pangalo, P., Imran, A. K., Wicita, P. S., & Daud, R. P. A. (2020). Determination of total flavonoid levels of ethanol extract Sesewanua leaf (*Clerodendrum fragrans* Wild) with maceration method using Uv-vis spectrofotometry. *Pharmacognosy Journal*, 12(2), 356–360. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.56>

- Sari, D., & Nasuha, A. (2021). Kandungan Zat Gizi, Fitokimia, dan Aktivitas Farmakologis pada Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.): Review. *Tropical Bioscience: Journal of Biological Science*, 1(2), 11–18.
- Sayed Mostafa, H., & Fawzy El Azab, E. (2022). Efficacy of green coffee as an antioxidant in beef meatballs compared with ascorbic acid. *Food Chemistry: X*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100336>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 18, pp. 820–897). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Sianturi, C. Y. (2019). Manfaat Lidah Buaya sebagai Anti Penuaan melalui Aktivitas Antioksidan. *ESSENTIAL: Essence of Scientific Medical Journal*, 17(01), 34–38.
- Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *ANALYTICAL SCIENCES*, 34, 795.
- Suena, N. M. D. S., Suradnyana, I. G. M., & Juanita, Rr. A. (2021). Formulasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Granul Effervescent dari Kombinasi Ekstrak Kunyit Putih (*Curcuma Zedoaria*) dan Kunyit Kuning (*Curcuma Longa* L.). *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 7(1), 32–40. <https://doi.org/10.36733/medicamento.v7i1.1502>
- Sulistyani, M., Huda, N., Prasetyo, R., Alauhdin, D. M., & Abstrak, I. A. (2023). Calibration of Microplate Uv-vis Spectrophotometer for Quality Assurance Testing of Vitamin C using Calibration Curve Method. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 12(2), 207–215. <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ijcs>
- Supriatna, A., Regista Cahyani, B., Yanti, D., Afrina, D., Dwi Anzaini, F., Putri Nurizha, N., Shapa Azzahra, S., & Yuniarsih, N. (2023). Literatur Review Artikel: Uji Efektivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Saffron (*Crocus Sativus* L.) Dengan Metode DPPH Pada Sediaan Face Mist. *Nia Yuniarsih INNOVATIVE: Journal Of Social Science Research*, 3, 13348–13356.
- Suprihatin, T., Rahayu, S., Rifa, M., & Widyarti, S. (2020). Senyawa pada Serbuk Rimpang Kunyit (*Curcuma longa* L.) yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Buletin Anatomi Dan Fisiologi*, 5(1), 35–42.
- Tambun, R., Alexander, V., & Ginting, Y. (2021). Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1122(1), 012095. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1122/1/012095>
- Wahyuni, N. M. S., Wrasati, L. P., & Hartiati, A. (2021). Analisis Korelasi Antara Kandungan Senyawa Bioaktif Dengan Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Daun Bambu Duri (*Bambusa Blumeana*). *Agrointek: Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 15(4), 1062–1070. <https://doi.org/10.21107/agrointek.v15i4.9853>
- Wołosiak, R., Drużyńska, B., Derewiaka, D., Piecyk, M., Majewska, E., Ciecierska, M., Worobiej, E., & Pakosz, P. (2022). Verification of the conditions for determination of antioxidant activity by abts and DPPH assays—a practical approach. *Molecules*, 27(1). <https://doi.org/10.3390/molecules27010050>
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. In *Food Frontiers* (Vol. 1, Issue 1, pp. 60–69). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>
- Yati, K., Gozan, M., Mardiatut, M., Anggia, V., Prastiwi, R., & Jufri, M. (2022). Phytochemical Evaluation and Antioxidant Activity of Virginia tobacco Leaves (*Nicotiana tabacum* L. var *virginia*) Fractions with DPPH and FTC Methods. *Pharmacognosy Journal*, 14(3), 544–548. <https://doi.org/10.5530/pj.2022.14.69>
- Yuliani, N. N., Sambara, J., & Mau, M. A. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etilasetat Ekstrak Etanol Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) dengan Metode DPPH(1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl). *Jurnal Info Kesehatan*, 14(1), 1091–1111.
- Zalukhu, M. L., Phyma, A. R., & Pinzon, R. T. (2016). *Tinjauan Pustaka Proses Menua, Stres Oksidatif, dan Peran Antioksidan* (Vol. 43, Issue 10).