

**VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA
EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH KAKAO DAN KULIT BUAH NANAS
MENGUNAKAN METODE DPPH (1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL)
SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

(SKRIPSI)

Oleh

Kadek Fani Sugiyanti



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG**

2022

ABSTRAK

VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH KAKAO DAN KULIT BUAH NANAS MENGUNAKAN METODE DPPH (1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL) SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

Oleh

KADEK FANI SUGIYANTI

Penelitian validasi metode uji aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol kulit kakao dan kulit nanas menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri UV-Vis telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode uji aktivitas antioksidan, menghitung ketidakpastian pengukuran, serta melakukan uji aktivitas antioksidan pada kulit kakao dan nanas. Sampel dipreparasi dengan cara dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan membuat variasi konsentrasi sampel lalu ditambahkan larutan DPPH sebanyak 1 mL dan diinkubasi selama 30 menit, absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm. Kemudian dilakukan validasi metode dan estimasi ketidakpastian pengukuran. Hasil penelitian menunjukkan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH secara Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode valid. Berdasarkan hasil uji linearitas dengan nilai $R^2 = 0,9916$, uji akurasi sampel kulit kakao diperoleh nilai % *recovery* pada sampel 200; 600; 1000 ppm ditambah 4 ppm standar yaitu masing-masing 99,30%; 101,43% dan 101,66%. Uji akurasi sampel kulit nanas diperoleh % *recovery* pada sampel 9,08; 10,23; 12,04 ppm ditambah 4 ppm standar yaitu masing-masing 98,12%; 99,17% dan 101,93%. % RSD dari uji presisi sampel kulit kakao 200; 600; 1000 ppm yaitu masing-masing 1,60%; 1,91% dan 1,29%. % RSD dari uji presisi sampel kulit nanas 9,08; 10,23; 12,04 ppm yaitu masing-masing 0,99%; 0,89% dan 0,95%. Aktivitas antioksidan sampel kulit kakao yang diperoleh yaitu 1134,00 ppm dengan nilai ketidakpastian 1,34 dan Aktivitas antioksidan sampel kulit nanas yang diperoleh sebesar 7,24 ppm dengan nilai ketidakpastian pengukuran 1,70. Nilai LoQ dan LoD yang diperoleh yaitu 27,91 ppm dan 93,06 ppm.

Kata kunci: Kulit kakao, kulit nanas, aktivitas antioksidan, DPPH, validasi.

ABSTRACT

VALIDATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST METHODS ON ETHANOL EXTRACT OF COCOA AND PINEAPPLE FRUIT PEELS USING DPPH (1,1-DIPHENYL-2-PIKRILHYDRAZYL) METHOD BY SPECTROPHOTOMETRY UV-VIS

By

KADEK FANI SUGIYANTI

Research on the validation of the antioxidant activity test method on the ethanol extract of cocoa and pineapple peels using the DPPH method by UV-Vis spectrophotometric has been carried out. This research aims to validate the antioxidant activity method, calculate measurement uncertainty, and perform antioxidant activity on pineapple and cocoa peels. Samples were prepared by maceration using 70% ethanol solvent. Antioxidant activity testing was carried out by varying the sample concentration, then adding 1 mL of soluble DPPH. Incubated for 30 minutes, the absorbance was measured at a wavelength of 517 nm. Then, the method was validated and the measurement uncertainty was estimated. The results showed that the antioxidant activity test using the DPPH method by UV-Vis spectrophotometry was a valid method. Based on the results of the linearity test with a value of $R^2 = 0.9916$, the accuracy test of the cocoa peel sample obtained % recovery values for samples 200; 600; 1000 ppm plus 4 standard ppm are 99.30%, 101.40% and 101.66% respectively. Accuracy test pineapple peel samples obtained % recovery of sample 9.08; 10.23; 12.04 ppm plus 4 ppm standard are 98.12%, 99.17% and 101.93% respectively. % RSD from precision testing of cocoa peel samples 200; 600; 1000 ppm, namely 1.60%, 1.91% and 1.29%. % RSD from the precision test of pineapple peel samples 9.08; 10.23; 12.04 ppm, namely 0.99%, 0.89% and 0.95%. Antioxidant activity of cocoa peel samples was 1134.00 ppm with uncertainty value of 1.34. The antioxidant activity of the pineapple peel samples obtained was 7.24 ppm with uncertainty value of 1.70. The LoQ and LoD values obtained were 27.91 ppm and 93.06 ppm.

Keywords: Cocoa peels, pineapple peels, antioxidant activity, DPPH, validation.

**VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA EKSTRAK
ETANOL KULIT BUAH KAKAO DAN KULIT BUAH NANAS
MENGUNAKAN METODE DPPH (1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL)
SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

Oleh

KADEK FANI SUGIYANTI

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG**

2022

Judul

: **VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN PADA EKSTRAK ETANOL
KULIT BUAH KAKAO DAN KULIT BUAH
NANAS MENGGUNAKAN METODE DPPH
(1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL) SECARA
SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

Nama

: **Kadek Fani Sugiyanti**

Nomor Pokok Mahasiswa

: **1817011026**

Jurusan

: **Kimia**

Fakultas

: **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc.
NIP. 197110301997031003

Pembimbing II

Rinawati, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP. 197104142000032001

2. Ketua Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Lampung

Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

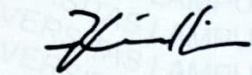
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

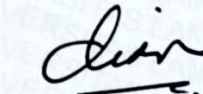
Ketua : Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc.


.....

Sekretaris : Rinawati, S.Si., M.Si., Ph.D.


.....

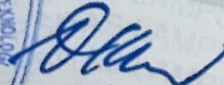
Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.


.....



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T.
NIP 19740705 200003 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 19 Desember 2022

SURAT PERNYATAAN

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Kadek Fani Sugiyanti
Nomor Induk Mahasiswa : 1817011026
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Validasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Kulit Buah Kakao dan Kulit Buah Nanas Menggunakan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) secara Spektrofotometri UV-Vis”** adalah benar karya sendiri, baik gagasan, hasil dan analisisnya. Saya tidak keberatan jika data dalam skripsi ini digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 19 Desember 2022

Penulis



Kadek Fani Sugiyanti

NPM. 1817011026

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Kadek Fani Sugiyanti, lahir di Swastika Buana pada tanggal 29 Juli 2000 yang merupakan anak kedua dari dua bersaudara, putri dari Bapak Nengah Rata dan Ibu Wayan Karyani. Saat ini, penulis bertempat tinggal di Desa Swastika Buana, Kecamatan Seputih Banyak, Kabupaten Lampung Tengah.

Penulis memulai pendidikan Sekolah Dasar (SD) di SD Negeri 3 Swastika Buana yang diselesaikan pada tahun 2012. Kemudian melanjutkan pendidikan ke jenjang Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 2 Way Seputih yang diselesaikan pada tahun 2015, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Paramarta 1 Seputih Banyak yang diselesaikan pada tahun 2018.

Tahun 2018, penulis melanjutkan jenjang pendidikan di Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) dan menerima Beasiswa Bidikmisi serta terdaftar sebagai mahasiswa jurusan Kimia FMIPA. Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif mengikuti beberapa organisasi kampus seperti Himaki sebagai anggota biro Kesekretariatan pada periode 2019 dan 2020, penulis juga bergabung di UKM Hindu sebagai anggota bidang Kewirausahaan pada periode 2019 dan 2020, serta penulis bergabung sebagai anggota *Chemistry English Club* (CEC) pada periode 2019. Penulis pernah mengikuti kegiatan sosial seperti Karya Wisata Ilmiah (KWI) BEM-FMIPA Unila di Desa Tanjung Tirto Kecamatan Way Bungur, Kabupaten Lampung Timur pada

tahun 2018. Kemudian pada tahun 2019 penulis bergabung dalam kepanitiaan KWI XXX BEM-FMIPA Unila. Pada bulan Februari-Maret 2021 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Tanjung Harapan, Seputih Banyak, Lampung Tengah. Pada bulan Agustus-September 2021 penulis melakukan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di PT Indo Energy Solution Lampung selama. Selain itu, penulis pernah menjadi asisten praktikum Kimia Organik I-Kimia Analitik I pada tahun 2022. Penulis juga pernah meraih pendanaan proposal Program Mahasiswa Wirausaha (PMW) dengan produk *Dates Milk* (susu kurma) pada tahun 2021.

MOTTO

“Walau seandainya engkau paling berdosa di antara manusia yang memikul dosa, dengan perahu ilmu pengetahuan ini, lautan dosa akan engkau seberangi.”

(Bhagavad Gita IV.36)

“You can’t have a better tomorrow if you’re still thinking about yesterday.”

(Charles F. Kettering)

“Jangan pergi mengikuti kemana jalan akan berujung. Buat jalanmu sendiri dan tinggalkanlah jejak.”

(Ralph Waldo Emerson)

PERSEMBAHAN

Puji Syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, atas rahmat dan karunia-Nya skripsi ini dapat terselesaikan.

Ku persembahkan sebuah karya sederhana ini kepada:

Kedua Orang Tua Tercinta

Terimakasih atas semua hal yang Bapak dan Ibu berikan, baik dari segi materi, dukungan, cinta kasih serta doa yang tiada henti untuk putri mu ini.

Kakak Tersayang

Terimakasih atas dukungan dan doa yang kamu berikan, semoga karya sederhana ini membuat kamu bangga memiliki Adik sepertiku.

Almamater Kebanggaan Universitas Lampung

SANWACANA

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul, **”Validasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan pada Sampel Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao dan Kulit Buah Nanas Menggunakan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)”**, yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Sains di Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa dalam proses pengerjaan dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari kesulitan dan rintangan yang penulis hadapi. Namun itu semua bisa terlewati berkat rahmat Tuhan Yang Maha Esa serta bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, sehingga dalam kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc., selaku pembimbing satu yang telah sabar membimbing dan memberi masukan serta saran dan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
2. Ibu Rinawati, S.Si., M.Si., Ph.D., selaku pembimbing dua yang telah membimbing, memberikan ilmu, motivasi dan semangat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
3. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si., selaku penguji dan pembahas sekaligus pembimbing akademik yang telah memberikan, kritik, saran, dan arahan kepada penulis, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
4. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

5. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T., selaku Dekan Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
6. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia yang telah memberikan ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat kepada penulis selama menjadi mahasiswa jurusan kimia.
7. Kedua orang tua yang sangat penulis cintai. Terima kasih Bapak Nengah Rata dan Ibu Wayan Karyani atas segala bentuk kerja keras dan pengorbanan yang telah diberikan. Terima kasih juga untuk segala cinta, kasih sayang, perhatian, dukungan, motivasi, dan doa yang selalu diberikan.
8. Kakak penulis, I Gede Sugianto yang telah memberikan dukungan dan doa, begitu juga untuk segala cinta dan kasih sayangnya.
9. Keluarga besar penulis yang selalu memberikan dukungan dan doa kepada penulis.
10. Teman-teman seperbimbingan yang baik Indah dan Dea. Terima kasih atas kerjasama, dukungan, dan kesabaran untuk menyelesaikan penelitian hingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini.
11. Analis lab UPT-LTSIT Mba Farlina, terima kasih atas arahan dan selalu sabar menghadapi penulis selama penelitian di UPT-LTSIT.
12. Sahabatku yang sangat baik, Ni Wayan Mega. Terima kasih atas dukungan semangat dan doa yang telah diberikan. Terima kasih juga karena selalu menjadi pendengar yang baik di setiap keluhan yang penulis alami.
13. Sobat “Ambyar” Indah, Hendriko, Grace, dan Kharisma. Terima kasih sudah menjadi teman yang baik, memberikan keceriaan, dan partner belajar terbaik di kampus.
14. Teman sejak maba, Ninid dan Iin. Terima kasih sudah menjadi teman yang baik selama kuliah dan berbagi ilmu serta cerita perkuliahan.
15. Partner kosan sekaligus sepupuku, Mitri. Terima kasih sudah menjadi teman selama di kosan dan memberikan semangat untuk penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

16. Adik-adik kimia Angkatan 2019 dan 2020 yang telah memberikan semangat, serta motivasinya untuk penulis menyelesaikan skripsi ini.
17. Terakhir tapi tidak kalah pentingnya, Terima kasih untuk diriku yang masih bertahan di titik ini hingga skripsi ini terselesaikan dengan baik dan semangat untuk langkah berikutnya.

Terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu, semoga Tuhan membalas segala kebaikan kalian. Penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi penulis pada khususnya dan pembaca pada umumnya.

Bandar Lampung, 19 Desember 2022

Penulis

Kadek Fani Sugiyanti

NPM. 1817011026

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xx
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Radikal Bebas.....	5
2.1.1 Sumber Pemicu Radikal Bebas	6
2.2 Antioksidan	7
2.2.1 Jenis-jenis Antioksidan	7
2.2.2 Cara Kerja Antioksidan	8
2.3 Ekstraksi	9
2.4 Metode Uji Aktivitas Antioksidan	11
2.5 Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)	12
2.6 Spektrofotometri UV-Vis	15
2.6.1 Instrumen Spektrofotometri UV-Vis.....	19
2.7 Validasi Metode	23
2.7.1 Presisi	23
2.7.2 Ketepatan (Akurasi)	24
2.7.3 Linearitas dan Rentang.....	26
2.7.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi	27
2.8 Ketidakpastian Pengukuran.....	28
2.9 Uraian Tumbuhan.....	29
2.9.1 Nanas.....	29
2.9.2 Kakao	31
III. METODOLOGI PENELITIAN.....	33
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	33

3.2	Alat dan Bahan	33
3.3	Prosedur Penelitian.....	34
3.3.1	Pengumpulan Sampel.....	34
3.3.3	Pembuatan Larutan.....	35
3.3.4	Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH Secara Spektrofotometri UV-Vis.....	36
3.3.5	Uji Aktivitas Antioksidan pada Sampel Ekstrak Kulit Kakao dan Ekstrak Kulit Nanas Menggunakan Metode DPPH Secara Spektrofotometri UV-Vis.....	37
3.3.6	Validasi Metode Analisis	38
3.3.7	Estimasi Ketidakpastian Pengukuran	39
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
4.1	Lokasi Sampling.....	41
4.2	Penentuan Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH Secara Spektrofotometri UV-Vis	42
4.2.1	Ekstraksi Sampel	42
4.2.2	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	43
4.2.3	Penentuan Aktivitas Antioksidan Standar Asam Askorbat sebagai Pembanding.....	45
4.3	Validasi Metode Analisis	47
4.3.1	Linearitas.....	47
4.3.2	Akurasi	48
4.3.3	Presisi	49
4.3.4	Penentuan Batas Deteksi (LoD) dan Batas Kuantifikasi (LoQ).....	51
4.4	Ketidakpastian Pengukuran.....	51
4.4.1	Ketidakpastian dari Massa Sampel	52
4.4.2	Ketidakpastian Baku Labu Takar 5 mL	53
4.4.3	Ketidakpastian Baku dari Labu Takar 10 mL	54
4.4.4	Ketidakpastian Baku dari Labu Takar 20 mL	56
4.4.5	Ketidakpastian Baku dari Labu Takar 100 mL	57
4.4.6	Ketidakpastian Baku dari Pipet Volume 0,5 mL.....	58
4.4.7	Ketidakpastian baku dari Pipet Volume 1 mL	59
4.4.8	Ketidakpastian Baku dari Pipet Volume 2 mL.....	61
4.4.9	Ketidakpastian Kemurnian Standar Asam Askorbat.....	62
4.4.10	Ketidakpastian Kurva Kalibrasi	62
4.4.11	Ketidakpastian Repeatabilitas	66
4.4.12	Estimasi Ketidakpastian Gabungan Penentuan Aktivitas Antioksidan..	67
4.4.13	Ketidakpastian Diperluas	70
4.5	Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Etanol Kulit Kakao dan Kulit Nanas.....	72
4.5.1	Ekstrak Etanol Kulit Kakao.....	72
4.5.2	Ekstrak Etanol Kulit Nanas	73
V.	SIMPULAN DAN SARAN.....	75
5.1	Simpulan.....	75
5.2	Saran.....	76

DAFTAR PUSTAKA	77
LAMPIRAN.....	83
Lampiran 1. Perhitungan dan Penyiapan Larutan DPPH 0,5 mM	84
Lampiran 2. Perhitungan Pembuatan dan Pengenceran Larutan Standar Asam Askorbat.....	85
Lampiran 3. Penyiapan Larutan	86
Lampiran 4. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH.....	87
Lampiran 5. Perhitungan % Penghambat dan IC ₅₀	90
Lampiran 6. Akurasi.....	93
Lampiran 7. Presisi.....	96
Lampiran 8. Perhitungan LOD & LOQ	98

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Panjang gelombang dan warna yang diabsorpsi	16
2. Batas keberterimaan berdasarkan persamaan horwitz	24
3. Persyaratan presisi dan % <i>recovery</i>	25
4. Kandungan senyawa kimia pada ekstrak kulit nanas	30
5. Data pengukuran aktivitas antioksidan standar asam askorbat	45
6. Hasil akurasi sampel kulit kakao.....	48
7. Hasil akurasi sampel kulit nanas	48
8. Hasil pengujian presisi pada sampel kulit kakao	50
9. Hasil pengujian presisi pada sampel kulit nanas.....	50
10. Sumber ketidakpastian kurva kalibrasi sampel kulit kakao	63
11. Data pengukuran sampel ekstrak kulit kakao.....	63
12. Sumber ketidakpastian kurva kalibrasi	64
13. Data pengukuran sampel ekstrak kulit nanas	65
14. Sumber ketidakpastian aktivitas antioksidan dalam sampel ekstrak kulit kakao.....	67
15. Sumber ketidakpastian aktivitas antioksidan dalam sampel ekstrak kulit nanas.....	68
16. Data pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit kakao	72
17. Data pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit nanas.....	74
18. Pengenceran sampel	86
19. Hasil Pengukuran absorbansi asam askorbat	87
20. Hasil pengukuran absorbansi sampel ekstrak kulit kakao.....	88
21. Hasil pengukuran absorbansi blanko	88
22. Absorbansi sampel kulit nanas.....	89

23. % inhibisi standar asam askorbat	90
24. % inhibisi dan nilai IC_{50} sampel ekstrak kulit kakao	91
25. % inhibisi dan nilai IC_{50} sampel ekstrak kulit nanas	92
26. Penentuan akurasi sampel kulit kakao	93
27. Akurasi dikali dengan faktor pengenceran.....	94
28. Perhitungan Akurasi Sampel Kulit Nanas.....	94
29. Akurasi dikali faktor pengenceran	94
30. Perhitungan presisi pada sampel kulit kakao	96
31. Perhitungan LoD dan LoQ	98

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur DPPH.	13
2. Reaksi DPPH dengan Antioksidan.	14
3. Kurva absorbansi (A) banding konsentrasi (C).....	17
4. Pembacaan spektrofotometer.	21
5. Bagan alir penelitian.	40
6. Lokasi pengumpulan sampel kulit kakao.	41
7. Lokasi pengumpulan sampel kulit nanas.	42
8. Kurva panjang gelombang maksimum DPPH.	44
9. Kurva hubungan antara % inhibisi dan konsentrasi.....	46
10. Kurva kalibrasi uji aktivitas antioksidan.....	47
11. Diagram penentuan aktivitas antioksidan.	52
12. Diagram kontribusi masing-masing ketidakpastian.	70
13. Kurva hubungan absorbansi dan konsentrasi standar asam askorbat.....	87
14. Kurva hubungan absorbansi dan konsentrasi ekstrak kulit kakao.	88
15. Kurva hubungan absorbansi dan sampel kulit nanas.	89
16. Kurva hubungan % inhibisi dan konsentrasi standar.	90
17. Kurva hubungan % inhibisi dan konsentrasi sampel kulit kakao.	91
18. Hubungan konsentrasi dan % inhibisi pada sampel kulit nanas.	92
19. Kurva standar asam askorbat	96
20. Kurva kalibrasi standar.	98

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Radikal bebas dan antioksidan banyak dipelajari di dunia kedokteran dan kesehatan dalam beberapa dekade terakhir. Hal ini karena sebagian besar penyakit diawali oleh adanya reaksi oksidasi yang berlebihan di dalam tubuh. Reaksi oksidasi inilah yang menyebabkan terbentuknya radikal bebas yang sangat aktif dan dapat merusak struktur serta fungsi sel. Sejumlah penyakit yang diakibatkan oleh adanya radikal bebas yaitu kanker, diabetes, penyakit kardiovaskular, autoimun, gangguan saraf, hipertensi, parkinson, alzheimer, sindrom gangguan pernapasan akut dan penyakit lainnya (Hoyos-Arbeláez *et al.* 2017). Perubahan pola hidup masyarakat dari pola hidup tradisional menjadi pola hidup yang praktis dan instan, khususnya dalam pemilihan makanan, memiliki dampak negatif bagi kesehatan. Salah satunya yaitu makanan cepat saji dengan pemanasan tinggi dan pembakaran yang dapat menjadi pemicu terbentuknya radikal bebas (Pourmorad *et al.* 2006, Malau dan Prasetyaningsih, 2019).

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Senyawa radikal bebas disebabkan oleh adanya berbagai proses kimia kompleks dalam tubuh, yang berupa hasil samping dari proses oksidasi atau pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, olahraga berlebihan, peradangan atau

ketika tubuh terpapar polusi lingkungan seperti asap kendaraan bermotor, asap rokok, bahan pencemar dan radiasi matahari atau radiasi kosmis (Fessenden dan Fessenden, 1986). Radikal bebas dalam tubuh memiliki sifat sangat reaktif dan akan berinteraksi secara destruktif melalui reaksi oksidasi dengan bagian tubuh maupun sel-sel tertentu yang tersusun atas lemak, protein, karbohidrat, DNA, dan RNA sehingga memicu berbagai penyakit seperti jantung koroner, penuaan dini dan kanker (Reynertson, 2007; Malau dan Prasetyaningsih, 2019).

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menghambat atau mencegah kerusakan yang disebabkan oleh adanya oksidasi. Antioksidan berperan sebagai penyumbang hidrogen atau elektron yang bertindak sebagai akseptor radikal bebas dan dapat menunda inisiasi pembentukan radikal bebas sehingga tidak dapat menginduksi suatu penyakit (Youngson, 1998). Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa senyawa antioksidan dapat mengurangi resiko terhadap penyakit kronis seperti kanker dan penyakit jantung koroner (Prakash, 2001). Senyawa antioksidan dapat ditemukan pada senyawa-senyawa metabolit sekunder tanaman yang mempunyai struktur cincin aromatis fenol atau senyawa fenolik. Cincin aromatis fenol inilah yang akan berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan (Winarsi, 2007).

Menurut Winarsi (2007), kulit buah-buahan mengandung antioksidan yang tinggi dibanding dengan jaringan yang lebih dalam. Buah-buahan yang berpotensi sebagai sumber antioksidan adalah buah nanas dan kakao. Buah-buahan tersebut adalah tanaman yang tumbuh di daerah tropis dan cukup banyak ditemukan di daerah Lampung. Kulit nanas mengandung vitamin C, karotenoid dan flavonoid yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan (Hatam *et al.* 2013). Kulit buah kakao memiliki protein, serat dan komponen bioaktif yang cukup tinggi. Komponen bioaktif ini termasuk senyawa polifenol yang dapat bermanfaat sebagai antioksidan (Yuliani dan Gazali, 2020).

Metode pengukuran aktivitas antioksidan yang sering digunakan adalah DPPH (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil), FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) dan

CUPRAC (*cupric ion reducing antioxidant capacity*). Namun, metode DPPH lebih banyak digunakan karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel (Prakash, 2001). Metode DPPH sering digunakan untuk menguji kemampuan senyawa dalam bertindak sebagai donor elektron atau hidrogen. Metode DPPH merupakan metode yang dapat mengukur aktivitas antioksidan baik pada pelarut polar maupun non polar. Pada beberapa metode lain hanya terbatas pada pengukuran komponen yang terlarut dalam pelarut yang digunakan dalam analisis. Namun, pada metode DPPH mengukur semua komponen antioksidan baik yang larut dalam lemak maupun dalam air (Prakash, 2001). Analisis penangkal radikal DPPH dapat dilakukan dengan mengamati penurunan absorbansi. Hal ini dapat terjadi oleh karena adanya reduksi radikal oleh antioksidan atau bereaksi dengan senyawa radikal lainnya (Yu *et al.* 2002, Artanti *et al.* 2018). Antioksidan yang bereaksi dengan DPPH akan menghasilkan bentuk tereduksi 1,1-difenil 2-pikrilhidrazil dan radikal antioksidan (Prakash, 2001). Adanya senyawa yang bereaksi sebagai anti radikal akan mereduksi radikal DPPH.

Pengukuran aktivitas antioksidan pada kulit buah kakao dan kulit buah nanas secara Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode yang belum baku di Unit Pelayanan Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT) Universitas Lampung, sehingga perlu dilakukan validasi metode terlebih dahulu. Validasi metode digunakan untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan dalam suatu penelitian memenuhi persyaratan sehingga dapat dinyatakan bahwa data yang diperoleh selama penelitian merupakan hasil yang baik dan dapat dipercaya (Riyanto, 2014). Selain itu, evaluasi ketidakpastian pengukuran juga perlu dilakukan sebagai parameter yang berhubungan dengan hasil pengujian yang mencerminkan ketersebaran nilai-nilai. Ketidakpastian pengukuran juga merupakan suatu parameter yang menetapkan rentang nilai yang di dalamnya diperkirakan nilai benar yang diukur. Dalam klausul 7.6 ISO/IEC 17025: 2017 mengharuskan laboratorium terakreditasi melakukan evaluasi ketidakpastian pengujian untuk setiap parameter kuantitatif lingkup terakreditasi. Sistem manajemen mutu standar Indonesia 17025 (SNI-17025) tahun 2005

mengharuskan laboratorium pengujian dalam menganalisis bahan menggunakan metode pengukuran yang valid.

Berdasarkan uraian diatas, maka pada penelitian ini dilakukan validasi metode uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri UV-Vis. Parameter validasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah presisi, akurasi, linearitas, batas deteksi dan batas kuantifikasi serta estimasi ketidakpastian pengukuran untuk menjamin hasil analisis. Selanjutnya, metode tersebut akan digunakan dalam pengukuran aktivitas antioksidan pada kulit buah nanas dan kakao.

1.2 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, maka tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Melakukan validasi metode uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH secara Spektrofotometri UV-Vis dengan parameter presisi, akurasi, linearitas, batas deteksi dan kuantifikasi .
2. Menghitung ketidakpastian pengukuran metode uji antioksidan menggunakan metode DPPH secara Spektrofotometri UV-Vis.
3. Melakukan uji aktivitas antioksidan pada kulit buah yaitu kulit buah nanas dan kakao.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah mendapatkan metode uji aktivitas antioksidan pada kulit kakao dan nanas menggunakan metode DPPH secara Spektrofotometri UV-Vis yang valid sesuai dengan ISO/IEC 17025 : 2017.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Molekul yang kehilangan pasangan ini menjadi tidak stabil dan radikal, agar stabil molekul ini selalu berusaha mencari pasangan elektronnya dengan cara mengambil elektron dari molekul lain. Oleh karena itu, disebut radikal bebas atau *reactive oxygen species* (ROS). Tipe radikal bebas turunan oksigen reaktif sangat signifikan dalam tubuh. Oksigen reaktif ini mencakup superoksida (O_2^-), hidroksil (OH), peroksil ($ROO^\bullet$), hidrogen peroksida (H_2O_2), oksigen tunggal (O_2), oksida nitrat ($NO^\bullet$), peroksinitrit ($ONOO^\bullet$) dan asam hipoklorit ($HOCl$) (Fessenden dan Fessenden, 1982). Radikal bebas dalam tubuh sangat reaktif dan akan berinteraksi secara destruktif melalui reaksi oksidasi dengan bagian tubuh dan sel-sel tertentu yang terdiri dari lemak, protein, karbohidrat, DNA, dan RNA, sehingga memicu berbagai penyakit seperti jantung koroner, penuaan dini dan kanker (Reynertson, 2007, Malau dan Prasetyaningsih, 2019).

Radikal bebas mengambil elektron dari DNA sehingga menyebabkan perubahan struktur DNA dan timbullah sel-sel mutan. Mutasi yang berlangsung lama dapat menjadi kanker. Radikal bebas juga berperan dalam proses penuaan, dimana reaksi inisiasi radikal bebas di mitokondria menyebabkan diproduksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang bersifat reaktif. Radikal bebas dapat dihasilkan dari

hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultra violet, zat kimia dalam makanan dan polutan lain (Werdhasari, 2014)

Radikal bebas juga merupakan pemicu kerusakan saraf dan otak. Selain itu radikal bebas juga terlibat dalam peradangan, pengapuran tulang, gangguan pencernaan, gangguan fungsi hati, meningkatkan kadar *low density lipoprotein* (LDL) yang kemudian menjadi penyebab penimbunan kolesterol pada dinding pembuluh darah sehingga mengakibatkan munculnya aterosklerosis atau lebih dikenal dengan penyakit jantung koroner (Hatam *et al.* 2013).

2.1.1 Sumber Pemicu Radikal Bebas

Sumber radikal bebas ada yang bersifat internal yaitu dari dalam tubuh dan ada yang bersifat eksternal dari luar tubuh.

2.1.1.1 Radikal bebas internal

Radikal bebas internal berasal dari oksigen yang kita hirup. Oksigen yang biasa kita hirup merupakan penopang utama kehidupan karena menghasilkan banyak energi. Namun, hasil samping dari reaksi pembentukan energi tersebut akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Metabolisme aerobik yang merupakan proses penting dalam kehidupan organisme selalu diikuti dengan pembentukan radikal bebas. Radikal bebas terbentuk selama proses sintesis energi oleh mitokondria atau proses detoksifikasi yang melibatkan enzim sitokrom P450 di hati. Seperti yang diketahui, proses metabolisme terjadi akibat oksidasi zat makanan yang diubah menjadi senyawa pengikat energi (adenosin trifosfat) dengan bantuan oksigen. Pada proses oksidasi juga terbentuk radikal bebas ROS yaitu anion superoksida dan radikal hidroksil (Lehninger, 1982).

2.1.1.2 Radikal bebas Eksternal

Sumber radikal bebas eksternal dapat berasal dari polusi udara, alkohol, rokok, radiasi sinar ultraviolet, Obat-obatan tertentu seperti anestesi, pestisida, Sinar X dan kemoterapi. Radikal bebas juga dihasilkan dari proses pengolahan makanan yang berlebihan (Desrosier, 1998). Beberapa cara pengolahan makanan yang akrab dengan kehidupan sehari-hari adalah menggoreng, membakar atau memanggang. Proses pengolahan makanan dengan cara menggoreng, membakar atau memanggang dengan suhu yang terlalu tinggi, terutama pada makanan hewani berkadar protein dan lemak tinggi sebaiknya tidak sering dilakukan karena akan menimbulkan dampak terbentuknya radikal bebas.

2.2 Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang dapat menetralkan radikal bebas, atau bahan yang berfungsi untuk mencegah sistem biologis tubuh dari efek buruk yang timbul dari proses atau reaksi yang menyebabkan oksidasi berlebihan. Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa senyawa antioksidan dapat mengurangi risiko penyakit kronis seperti kanker dan penyakit jantung koroner (Prakash, 2001). Senyawa antioksidan dapat diperoleh dari senyawa-senyawa metabolit sekunder tumbuhan yang memiliki struktur cincin aromatik fenol atau senyawa fenolik. Cincin aromatik fenol ini akan berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan (Winarsi, 2007).

2.2.1 Jenis-jenis Antioksidan

Antioksidan dikelompokkan menjadi dua jenis, yaitu antioksidan endogen yang diproduksi oleh tubuh sendiri dan antioksidan eksogen yang merupakan antioksidan yang berasal dari luar tubuh. Antioksidan yang diproduksi oleh tubuh terdiri dari 3 enzim yaitu, superoksida dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH Px), katalase, serta non enzim, yaitu senyawa protein kecil glutathione

(Murray, 2003). SOD berperan dalam melawan radikal bebas pada mitokondria, sitoplasma dan bakteri aerob dengan mengurangi bentuk radikal bebas superoksida. SOD murni berupa peptida orgoteina yang disebut agen anti peradangan. Antioksidan glutathione peroksidase bekerja dengan cara menggerakkan H_2O_2 dan lipid peroksida dibantu dengan ion logam-logam transisi (Khaira, 2010).

Menurut sumbernya, antioksidan dapat digolongkan menjadi dua jenis, yaitu antioksidan sintetis dan alami (Gülçin *et al.* 2004).

2.2.1.1 Antioksidan Sintetis

Antioksidan sintetis merupakan antioksidan yang dibuat melalui sintesis secara kimia, contohnya : *tert-butylhydroquinone* (tBHQ), *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), dan propil galat (PG) (Gülçin *et al.* 2004). Konsentrasi rendah dari antioksidan tBHQ dan BHA telah lama digunakan untuk mencegah oksidasi dari produk makanan sehingga dapat menstabilkan produk tersebut (nutrisi, rasa, maupun warna).

2.2.1.2 Antioksidan Alami

Antioksidan alami merupakan antioksidan yang diproduksi langsung oleh tanaman maupun tubuh, contohnya : senyawa polifenol seperti flavonoid dan tanin. Zat antioksidan alami tersebut biasanya memiliki bagian fenolik dalam struktur molekulnya. Asam organik, karotenoid, hidrolisat protein dan tanin dapat menjadi antioksidan atau memiliki efek sinergis bila digunakan bersama dengan antioksidan fenolik. (Gülçin *et al.* 2004).

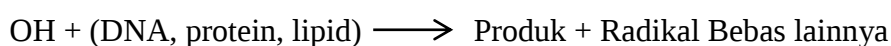
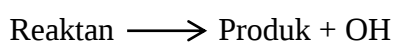
2.2.2 Cara Kerja Antioksidan

Jika di suatu tempat terjadi reaksi oksidasi dimana reaksi tersebut menghasilkan hasil samping berupa radikal bebas ($OH\cdot$) maka tanpa adanya kehadiran antioksidan, radikal bebas ini akan menyerang molekul-molekul lain di sekitarnya.

Hasil reaksi ini akan dapat menghasilkan radikal bebas yang lain yang siap menyerang molekul yang lainnya lagi. Akhirnya akan terbentuk reaksi berantai yang sangat membahayakan (Khaira, 2010).

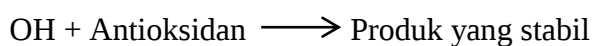
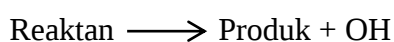
Berbeda halnya bila terdapat antioksidan. Radikal bebas akan segera bereaksi dengan antioksidan membentuk molekul yang stabil dan tidak berbahaya. Reaksi pun berhenti sampai disini.

- Reaksi tanpa adanya antioksidan



Radikal bebas yang lain akan memulai reaksi yang sama dengan molekul yang ada di sekitarnya.

- Reaksi dengan adanya antioksidan.



Antioksidan cenderung bereaksi dengan radikal bebas terlebih dahulu dibandingkan dengan molekul yang lain karena antioksidan bersifat sangat mudah teroksidasi atau bersifat reduktor kuat dibanding dengan molekul yang lain. Jadi keefektifan antioksidan bergantung dari seberapa kuat daya oksidasinya dibanding dengan molekul yang lain. Semakin mudah teroksidasi maka semakin efektif antioksidan tersebut (Khaira, 2010).

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu teknik pemisahan kimia untuk memisahkan atau menarik satu atau lebih komponen atau senyawa-senyawa (analit) dari suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu yang sesuai (Luba, 2017).

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang dilakukan dengan proses perendaman sampel menggunakan pelarut. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam, karena selama perendaman terjadi peristiwa plasmolisis yang menyebabkan terjadi pemecahan dinding sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga senyawa yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan proses ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang diinginkan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut (Nurdiansyah dan Redha, 2011).

Berbagai pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi antara lain (Tiwari, 2011):

1. N-Heksana

N-heksana memiliki sifat non-polar, mudah menguap, memiliki bau khusus yang dapat menyebabkan pingsan. Berat molekul heksana adalah 86,2 gram/mol dengan titik leleh $-94,3$ hingga $-95,3^{\circ}\text{C}$. Titik didih heksana pada tekanan 760 mmHg adalah 66 sampai 71°C . N-Heksana Biasanya digunakan sebagai pelarut untuk ekstraksi minyak nabati.

2. Etil asetat

Etil Asetat adalah pelarut dengan sifat semipolar. Etil asetat selektif akan menarik senyawa semipolar seperti fenol dan terpenoid. Sifat etil asetat memiliki massa molekul 88,11 g/mol, dengan titik didih $77,1^{\circ}\text{C}$, titik leleh -84°C , densitas 0,901 g/mL.

3. Etanol

Secara umum, etanol adalah pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik dari bahan alam, karena dapat melarutkan semua metabolit sekunder. Etanol larut sempurna dalam air dan tidak membentuk azeotrop. Etanol memiliki massa molekul 32,04 g/mol, titik didih $64,7^{\circ}\text{C}$ dan titik leleh $-97,7^{\circ}\text{C}$ % (Sitorus dan Marham, 2013). Gugus OH dalam etanol membantu

melarutkan molekul polar dan ion-ion, gugus alkil nya CH_3CH_2- dapat mengikat bahan non-polar. Dengan demikian etanol dapat melarutkan baik non maupun polar (Aziz *et al.* 2009).

2.4 Metode Uji Aktivitas Antioksidan

Metode-metode pengujian aktivitas antioksidan secara *in vitro* bertujuan untuk mengetahui aktivitas suatu senyawa antioksidan dalam menghambat radikal bebas. Beberapa metode yang digunakan untuk menghambat radikal bebas antara lain:

a) Metode DPPH

Metode DPPH digunakan secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron atau hidrogen. DPPH yang merupakan suatu molekul radikal bebas dengan warna ungu dapat berubah menjadi senyawa yang stabil dengan warna kuning oleh reaksi dengan antioksidan, dimana antioksidan memberikan satu elektronnya pada DPPH sehingga terjadi peredaman pada radikal bebas DPPH. Elektron yang tidak berpasangan pada DPPH memberikan suatu absorbansi yang kuat, maksimum pada $\lambda = 517 \text{ nm}$ dan berwarna ungu. Peredaman radikal bebas oleh antioksidan terjadi ketika elektron tidak berpasangan menjadi berpasangan dengan adanya donor hidrogen, sehingga membentuk DPPH yang stabil (Yuhernita dan Juniarti, 2011).

b) Metode CUPRAC

Pada pengujian CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*), reagen Cu(II) -neocuproin (Cu(II)-(Nc)_2) digunakan sebagai agen pengoksidasi kromogenik karena reduksi ion Cu(II) dapat diukur. Pereaksi CUPRAC merupakan pereaksi yang selektif karena memiliki nilai potensial reduksi yang rendah. metode pengukuran kapasitas antioksidan dengan menggunakan metode CUPRAC memiliki kelebihan jika dibandingkan dengan metode pengukuran antioksidan yang lain yaitu reagen CUPRAC cukup cepat untuk mengoksidasi tiol

jenis antioksidan, pereaksi CUPRAC merupakan pereaksi selektif karena potensi redoksnya lebih rendah. Reagen CUPRAC lebih stabil dan dapat diakses dari reagen kromogenik yang lain (misalnya ABTS, DPPH). Metode ini mudah dan berlaku di laboratorium konvensional menggunakan standar kolorimetri tidak memerlukan peralatan canggih dan operator yang memenuhi syarat. Metode ini dapat mengukur hidrofilik dan lipofilik dari antioksidan (misalnya, β -karoten dan α - tokoferol) (Apak *et al.* 2007).

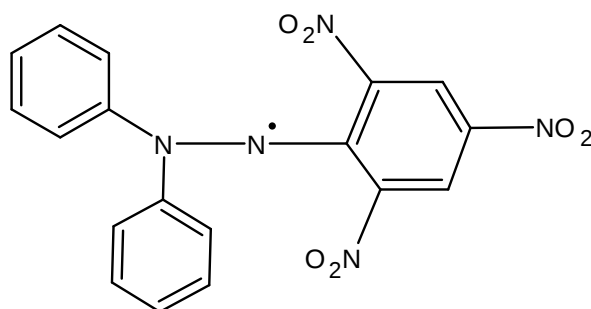
c) Metode FRAP

Pengukuran antioksidan dengan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) didasarkan pada transfer elektron. Oksidan yang digunakan adalah probe terdiri dari garam besi, Fe(III) (TPTZ) (2,4,6-tripyridyls-triazine). Metode FRAP mengukur kemampuan mereduksi *ferric* 2,4,6-tripyridyls-triazine (TPTZ) menjadi produk berwarna dengan mendeteksi senyawa dengan potensial redoks kurang dari 0,7 V (potensial redoks $F3^{+}$ -TPTZ). Kekurangan metode FRAP sangat bervariasi tergantung pada skala waktu analisis, tidak relevan untuk mengukur aktivitas antioksidan secara mekanis dan fisiologis karena FRAP tidak mengukur antioksidan tiol seperti glutathione (Teow, 2005).

2.5 Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) adalah suatu senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan absorbansi kuat pada λ maks 517 nm dan berwarna ungu gelap. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH tersebut akan tereduksi dan warnanya akan berubah menjadi kuning. Perubahan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer, dan diplotkan terhadap konsentrasi (Reynertson, 2007).

Rumus struktur DPPH diperlihatkan pada Gambar 1.



DPPH

Gambar 1. Struktur DPPH (Prakash, 2001).

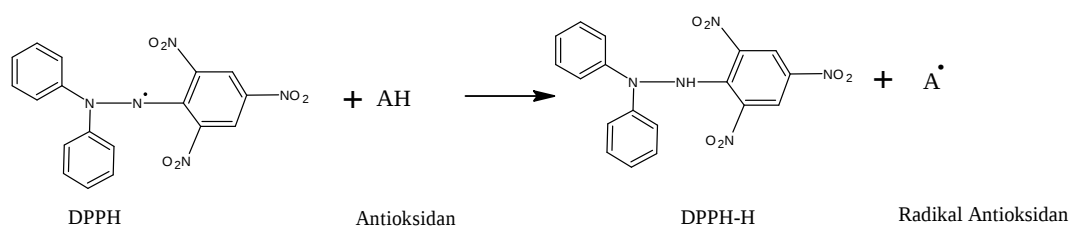
Metode DPPH dapat digunakan untuk menguji adanya aktivitas antioksidan. Pengamatan terhadap penangkapan radikal DPPH dapat dilakukan dengan mengamati penurunan absorbansi. Hal ini dapat terjadi karena adanya reduksi radikal oleh antioksidan atau bereaksi dengan senyawa radikal lainnya (Yu *et al.* 2002, Artanti *et al.* 2018).

Penangkapan radikal bebas adalah mekanisme utama dimana antioksidan bereaksi dalam makanan. Salah satu cara untuk menguji aktivitas suatu senyawa sebagai antioksidan adalah dengan mereaksikannya dengan pereaksi DPPH secara spektrofotometri. Metode DPPH tidak spesifik untuk komponen antioksidan tertentu, tetapi untuk semua senyawa antioksidan dalam sampel. Pengukuran kapasitas antioksidan total dapat membantu memahami sifat fungsional suatu makanan. Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan sensitif serta hanya membutuhkan sampel yang sedikit (Prakash, 2001; Wahyuni, 2015).

Metode DPPH sering digunakan untuk menguji kemampuan senyawa yang bertindak sebagai donor elektron atau hidrogen. Metode DPPH merupakan metode yang dapat mengukur aktivitas antioksidan baik pada pelarut polar maupun non polar. Beberapa metode lain terbatas pada pengukuran komponen terlarut dalam pelarut yang digunakan dalam analisis. Metode DPPH mengukur

semua komponen antioksidan, baik yang larut dalam lemak maupun yang larut dalam air (Prakash, 2001; Wahyuni, 2015).

Antioksidan bereaksi dengan DPPH akan menghasilkan bentuk tereduksi 1,1-difenil 2-pikrilhidrazin dan radikal antioksidan (Prakash, 2001; Wahyuni, 2015). Adanya senyawa yang bereaksi sebagai anti radikal akan mereduksi radikal DPPH, sebagaimana tersaji pada Gambar 2.berikut.



Gambar 2. Reaksi DPPH dengan Antioksidan (Molyneux, 2004).

Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan memberikan warna ungu dan menghasilkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm. Warnanya akan berubah menjadi kuning ketika elektron berpasangan. Pengurangan intensitas warna yang terjadi berkaitan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap atom hidrogen. Penurunan intensitas warna menunjukkan peningkatan kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas (Prakash, 2001; Wahyuni, 2015). Absorbansi yang baik untuk larutan DPPH adalah kurang dari satu. Tinggi rendahnya aktivitas antioksidan pada sampel dilihat dari nilai *Efficient Concentration* (EC_{50}) atau *Inhibition Concentration* (IC_{50}) yaitu nilai dimana 50% DPPH kehilangan sifat radikal bebasnya. Semakin kecil nilai IC_{50} semakin tinggi aktivitas antioksidan pada sampel.

Aktivitas antioksidan dapat dinyatakan dengan satuan % aktivitas. Nilai ini diperoleh dengan rumus (Molyneux, 2004).

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100 \% \quad (1)$$

2.6 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri Sinar Tampak (UV-Vis) adalah pengukuran energi cahaya oleh suatu sistem kimia dengan menggunakan panjang gelombang tertentu. Sinar ultraviolet ini mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, dan sinar tampak (*visible*) memiliki panjang gelombang 400-750 nm. Pengukuran panjang gelombang dan absorbansi analit menggunakan alat spektrofotometer melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis. Sehingga spektrofotometer UV-Vis lebih banyak digunakan untuk analisis kuantitatif dibandingkan dengan analisis kualitatif. Spektrum UV-Vis sangat berguna dalam pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit dalam larutan dapat ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Day dan Underwood, 2002).

Spektrofotometri *visible* disebut juga spektrofotometri sinar tampak, sinar tampak adalah sinar yang dapat dilihat oleh mata manusia. Cahaya yang dapat dilihat oleh mata manusia adalah cahaya dengan panjang gelombang 400-800 nm dan memiliki energi sebesar 299 – 149 kJ/mol (Hasanuddin, 2016). Spektrofotometri UV-Vis merupakan bagian dari teknik analisis spektroskopi dengan menggunakan sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis (Mulja dan Suharman, 1995). Prinsip metode spektrofotometri didasarkan pada interaksi dari energi radiasi elektromagnetik dengan suatu zat kimia tempat cahaya putih diubah menjadi cahaya monokromatis yang bisa dilewatkan ke dalam larutan berwarna, sebagian cahaya diserap dan sebagian diteruskan (Rohman dan Sumantri, 2007). Panjang gelombang dan warna yang diabsorpsi dapat ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Panjang gelombang dan warna yang diabsorpsi (Basset dan Mendham, 1994)

Warna yang diabsorpsi	Panjang gelombang (nm)
Ultraviolet	<400
Violet	400 – 450
Biru	450 – 500
Hijau	500 – 570
Kuning	570 – 590
Jingga	590 – 620
Merah	620 – 670
Inframerah	>760

Jika suatu berkas cahaya melewati suatu medium homogen, sebagian dari cahaya datang (P_o) diabsorpsi sebanyak (P_a), sebagian dapat dipantulkan (P_r), sedangkan sisanya ditransmisikan (P_t) dengan efek intensitas murni sebesar:

$$P_o = P_a + P_t + P_r \quad (2)$$

keterangan:

P_o : intensitas cahaya masuk

P_a : intensitas cahaya diabsorpsi

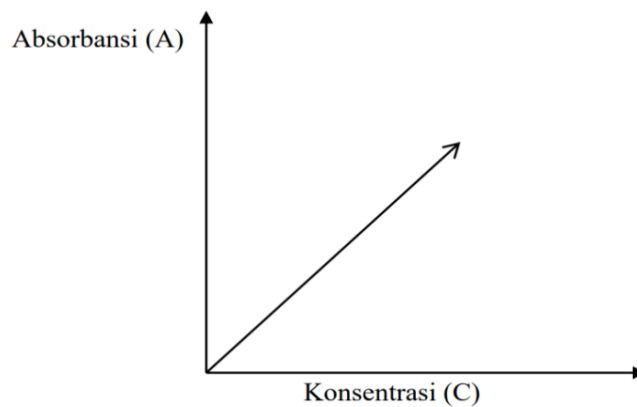
P_r : intensitas cahaya dipantulkan

P_t : intensitas cahaya ditransmisikan.

Pada praktiknya, nilai P_r adalah kecil yaitu kurang dari 4%, sehingga nilai P_r dapat diabaikan dan dapat diperoleh:

$$P_o = P_a + P_t \quad (3)$$

Berdasarkan hukum Beer, absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi sehingga kurva absorbansi (A) Vs konsentrasi (C) digambarkan garis linier melalui titik (0,0) seperti Gambar 3.



Gambar 3. Kurva absorbansi (A) banding konsentrasi (C) (Shita, 2016).

Dalam hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan konsentrasi larutan (Shita, 2016). Ada beberapa tahapan yang harus dilakukan dalam analisis dengan spektrofotometri ultraviolet dan sinar tampak yaitu:

a. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang terjadi absorbansi maksimum terjadi. Untuk memilih panjang gelombang maksimum, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan standar dengan konsentrasi tertentu.

b. Waktu Kerja (*Operating Time*)

Metode ini biasa digunakan untuk pengukuran hasil reaksi atau pembentukan warna. Tujuannya adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu kerja ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan

c. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Serangkaian larutan standar disiapkan dari zat yang akan dianalisis dengan berbagai konsentrasi. Diukur absorbansi masing-masing larutan dengan berbagai konsentrasi, kemudian dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi (y) dengan konsentrasi (x). Bila hukum Lambert-Beer terpenuhi maka kurva standar berupa garis lurus (Ganjar dan Rohman, 2007).

Hal-hal yang harus diperhatikan dalam pembuatan kurva standar antara lain:

1. Dibuat suatu deret larutan standar yang akan dianalisis dengan berbagai konsentrasi.
2. Masing-masing larutan dengan konsentrasi tertentu diukur pada λ_{max} (berdasarkan hasil panjang gelombang yang diperoleh) dan waktu optimal (berdasarkan data yang diperoleh).
3. Kurva standar merupakan hubungan antara konsentrasi (sumbu x) dan absorbansi (sumbu y).
4. Deret konsentrasi yang dibuat paling tidak lima titik.
5. Jika kurva baku berupa garis lurus maka hukum Lambert-Beer terpenuhi.
6. Harga koefisien determinasi (R^2) menunjukkan baik tidaknya suatu kurva standar. Kurva standar yang baik adalah harga koefisien determinasinya mendekati satu.
7. Pada kurva standar akan diperoleh persamaan $y = bx + a$.
8. Berdasar perhitungan slope dan intersep tersebut maka akan diperoleh suatu koefisien korelasi (r), yaitu $r = \sqrt{R^2}$ (Basset dan Mendham, 1994).

d. Pembacaan absorbansi sampel

Absorbansi yang terbaca pada spektrofotometer hendaknya terletak antara 0,2 sampai 0,8 atau 15% sampai 70% jika dibaca sebagai transmittan (T). Hal ini disebabkan karena kisaran nilai absorbansi tersebut kesalahan fotometrik yang terjadi adalah paling minimal (Ganjar dan Rohman, 2007).

2.6.1 Instrumen Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri dari spektrofotometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi panjang gelombang. Kelebihan spektrofotometer dengan fotometer adalah panjang gelombang dari sinar putih dapat lebih di deteksi dan cara ini diperoleh dengan alat pengurai seperti prisma, grating atau celah optis. Pada fotometer filter dari berbagai warna yang mempunyai spesifikasi melewati trayek pada panjang gelombang tertentu (Ganjar dan Rohman, 2007).

Secara sederhana instrumen spektrofotometri yang disebut spektrofotometer terdiri dari sumber radiasi, monokromator, kuvet, dan detektor.

a. Sumber radiasi

Sumber radiasi atau lampu pada kenyataannya merupakan dua lampu yang terpisah yang secara bersama-sama mampu menjangkau keseluruhan daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak. Persyaratan sumber yang digunakan dalam spektrofotometri adalah intensitas emisi yang cukup tinggi di wilayah spektral tertentu, stabilitas jangka pendek dan distribusi spasial dari emisi yang seragam (Skoog *et al.*, 2007).

Berikut macam-macam sumber radiasi:

- Lampu Deuterium

Pemakaian lampu deuterium pada daerah panjang gelombang 190 nm sampai 380 nm (daerah dekat ultraviolet dekat). Pada rentang panjang gelombang tersebut sumber radiasi deuterium akan memberikan spektrum energi radiasi yang lurus.

Umur sumber radiasi deuterium sekitar 500 jam pemakaian Vis (Mulja dan Suharman, 1995; Ganjar dan Rohman 2012).

- **Lampu Tungsten**

Lampu tungsten sebagai campuran dari filamen tungsten dan gas iodin (halogen) sehingga disebut sebagai sumber radiasi “tungsten-iodine”. Lampu ini dipakai pada daerah pengukuran 350-2000 nm karena pada daerah tersebut sumber radiasi “tungsten-iodine” memberikan energi radiasi sebagai garis lengkung dan cocok untuk kolorimetri. Umur pemakaian sekitar 1000 jam pemakaian (Mulja dan Suharman, 1995; Ganjar dan Rohman 2012).

- **Lampu Xenon**

Penggunaan lampu xenon pada daerah panjang gelombang 200 sampai 1000 nm. Lampu ini pada dasarnya mempunyai kepekaan optimum pada daerah 500 nm

b. Monokromator

Monokromator berfungsi untuk mendapatkan radiasi monokromatis dari sumber radiasi dengan memancarkan radiasi polikromatis.

Monokromator terdiri dari:

- **Filter Optik**

Filter ini berfungsi untuk menyerap warna komplementer sehingga cahaya tampak yang diteruskan merupakan cahaya berwarna sesuai dengan warna filter optik yang digunakan. Filter optik yang baik berdasarkan pada interferensi cahaya yang saling menguatkan (interferensi konstruktif) dan interferensi cahaya yang saling meniadakan (interferensi destruktif) (Mulja dan Suharman, 1995).

- **Prisma**

Prisma merupakan suatu lempeng kuarsa yang membiaskan sinar yang melaluinya. Banyaknya pembiasan tergantung dengan panjang gelombang sinar, dengan demikian sinar putih dapat terpecah ke dalam warna penyusunnya (Gandjar dan Rohman, 2012).

- Kisi Difraksi

Kisi difraksi merupakan kepingan kecil gelas bercermin dan didalamnya terdapat sejumlah garis berarah sama yang terpotong- potong yang digunakan untuk memberikan struktur nampak seperti sisir kecil (Ganjar and Rohman 2012).

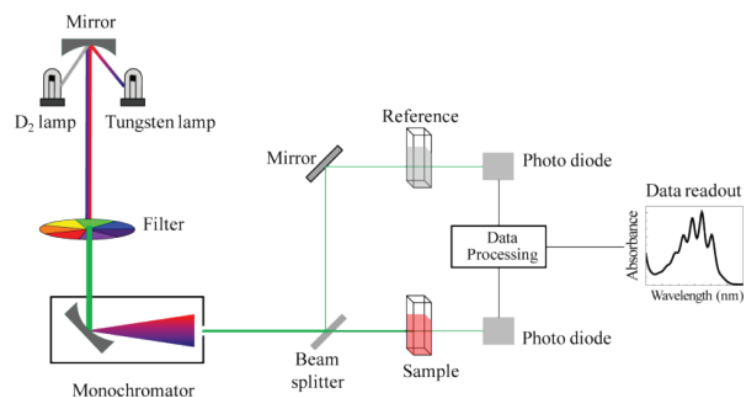
c. Kuvet

Kuvet merupakan wadah dari suatu sampel yang akan dianalisis. Ditinjau dari bahan yang dipakai terdapat dua macam kuvet yaitu kuvet leburan silika dan kuvet dari gelas. Kuvet leburan silika dapat dipakai pada daerah pengukuran 190-1100 nm. Sedangkan kuvet dari gelas dipakai pada daerah pengukuran 380-1100 nm karena bahan dari gelas dapat mengabsorbsi radiasi UV (Mulja dan Suharman, 1995).

d. Detektor

Detektor berfungsi untuk mengubah sinyal radiasi yang diterima menjadi suatu sinyal elektronik. Terdapat beberapa macam detektor yaitu detektor fotosel, detektor tabung foton hampa, detektor tabung penggandaan foton dan detektor PDA (*Photodiode-Array*) (Mulja dan Suharman, 1995).

Pembacaan spektrofotometer ditunjukkan pada Gambar 4 berikut.



Gambar 4. Pembacaan spektrofotometer.

2.6.2 Hukum Lambert Beer

Hukum Lambert-Beer adalah hubungan linier antara absorbansi dan konsentrasi suatu spesies yang menyerap cahaya. Hukum Beer, berbunyi: “jumlah radiasi cahaya tampak (ultraviolet, inframerah dan sebagainya) yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan”. Di dalam Hukum Lambert-Beer disebutkan bahwa nilai absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi larutan. Berdasarkan hukum Lambert-Beer, rumus yang digunakan untuk menghitung banyaknya cahaya yang hamburkan: $T =$ atau $\%T = x \ 100 \%$ dan absorbansi dinyatakan dengan rumus:

$$A = -\log T = \log \frac{1}{T} \quad (4)$$

Dimana I_0 merupakan intensitas cahaya datang dan I_t atau I_1 adalah intensitas cahaya setelah melewati sampel. Rumus yang diturunkan dari Hukum Beer dapat ditulis sebagai:

$$A = a \cdot b \cdot c \text{ atau } A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (5)$$

dimana:

A : absorbansi.

b / l : tebal larutan (tebal kuvet diperhitungkan juga umumnya 1 cm).

c : konsentrasi larutan yang diukur.

ε : tetapan absorptivitas molar (jika konsentrasi larutan yang diukur dalam molar).

a : tetapan absorptivitas (jika konsentrasi larutan yang diukur dalam ppm)

(Yasri *et al.* 2019).

2.7 Validasi Metode

Validasi metode analisis didefinisikan sebagai prosedur yang digunakan untuk membuktikan bahwa metode analisis tersebut dapat memberikan hasil seperti yang diharapkan (Mulja dan Suharman, 1995). Validasi dilakukan untuk melihat pengaruh kondisi peralatan yang digunakan, pereaksi dan personil yang melakukan pemeriksaan. Parameter validasi yang ditetapkan dalam analisis kuantitatif adalah linearitas dan rentang, batas deteksi (LoD) dan batas kuantitasi (LoQ), presisi, dan akurasi (Riyanto, 2014).

2.7.1 Presisi

Presisi menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil pengujian sampel individu yang diukur melalui penyebaran rata-rata hasil individual, ketika prosedur metode analisis dilakukan berulang kali pada sampel yang diambil dari campuran homogen. Penentuan presisi dilakukan dengan menganalisis sampel yang dibuat 10 replika ($n=10$). Kemudian ditentukan rata-rata (mean), standar deviasi (SD) dan persen simpangan baku relatif (% RSD) hasil pengukuran (Riyanto 2014). Dapat dilihat pada Persamaan 6 dan Persamaan 7, SD adalah simpangan baku, x_i adalah nilai arus puncak larutan ke- i , $\bar{x}$ adalah nilai arus puncak rata-rata, $n-1$ adalah derajat kebebasan (dengan n adalah banyaknya pengulangan), RSD adalah simpangan baku relatif, dan x adalah konsentrasi rata-rata analit (Miller dan Miller, 1991).

$$SD = \left[\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right]^{1/2} \quad (6)$$

$$\% RSD = \left[\frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \right] \quad (7)$$

Penentuan presisi dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu dengan *repeatability* dan *reproducibility*. *Repeatability* adalah penentuan nilai presisi yang dilakukan dengan mengukur satu sampel secara berulang-ulang pada hari, analisis, dan kondisi yang sama. Sedangkan *reproducibility* adalah penentuan nilai presisi

yang dilakukan dengan mengukur satu sampel secara berulang-ulang pada analisis dan kondisi yang sama, tetapi pada hari yang berbeda.

Aturan Horwitz (1995) menyebutkan bahwa metode presisi yang baik ditunjukkan dengan nilai % RSD yang diperoleh dari pengukuran harus lebih kecil dari nilai batas keberterimaan presisi berdasarkan persamaan Horwitz. % RSD Horwitz dapat dihitung menggunakan Persamaan 8, dimana c adalah rata-rata konsentrasi (fraksi konsentrasi). Tabel 2 di bawah dapat digunakan sebagai acuan batas keberterimaan presisi.

$$\text{Horwitz \% CV} = (2^{(1-0,5 \log C)}) \quad (8)$$

Tabel 2. Batas keberterimaan berdasarkan persamaan horwitz (Horwitz, 1995)

Unit	Repeatability (0,5% CV Horwitz)	Repro. dalam lab (0,67% CV Horwitz)	Repro antar lab (% CV Horwitz)
100 %	1,0	1	2,0
10 %	1,4	1,9	2,8
1 %	2,0	2,7	4,0
0,1 %	2,8	3,8	5,7
100 ppm	4,0	5,3	8,0
10 ppm	5,7	7,5	11
1 ppm	8,0	10,7	16,0
100 ppb	11	15,1	22,6
10 ppb	16,0	21	32,0
1 ppb	22,6	30,2	45,3

2.7.2 Ketepatan (Akurasi)

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kandungan analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (% *recovery*) analit. Akurasi ditentukan dengan dua cara yaitu metode penambahan standar (adisi) dan metode menggunakan CRM (*Certified Reference Material*). Dalam metode adisi, sampel dianalisis terlebih dahulu lalu sejumlah larutan standar ditambahkan ke dalam sampel tersebut, kemudian dihomogenkan dan dianalisis kembali. Selisih antara kedua hasil tersebut dibandingkan dengan

kadar yang sebenarnya (AOAC, 2012). Perhitungan % *recovery* dari metode adisi dapat ditentukan dengan menggunakan Persamaan 9. Metode menggunakan CRM dilakukan dengan membandingkan nilai rata-rata hasil pengukuran pengujian dengan nilai sebenarnya dari CRM yang dinyatakan dalam persentase. Perhitungan % *recovery* menggunakan CRM dapat ditetapkan dengan menggunakan Persamaan 10. Perhitungan % *recovery* pada uji aktivitas antioksidan, dilakukan dengan membandingkan nilai % inhibisi sampel yang ditambahkan standar dengan % inhibisi sampel sebenarnya, seperti yang ditunjukkan pada Persamaan 11.

Akurasi dalam metode analisis juga dapat ditentukan melalui uji bias (*error test*) menggunakan uji t. Nilai akurasi dapat diterima jika memenuhi batas akseptabilitas uji t. Akurasi dapat diterima jika nilai t hitung lebih kecil dari nilai t tabel. Hal ini menyatakan bahwa metode analisis yang diterapkan tidak ada bias pada hasil pengukuran. Perhitungan t hitung dapat ditetapkan dengan menggunakan Persamaan 12. Dapat dilihat pada Tabel 3 menunjukkan persyaratan dari presisi dan *recovery*.

Tabel 3. Persyaratan presisi dan % *recovery* (AOAC, 2012)

Analit %	Ratio Analit	Unit	RSD (%)	Recovery (%)
100	1	100 %	1	98-102
10	10	10%	1,9	98-102
1	10	1%	2,7	97-103
0,1	10	0,10%	3,7	95-105
0,01	10	100 ppm	5,3	90-107
0,001	10	10 ppm	7,3	80-110
0,0001	10	1 ppm	11	80-110
0,00001	10	100 ppb	15	80-110
0,000001	10	10 ppb	21	60-115
0,0000001	10	1 ppb	30	40-120

$$\% \text{ Recovery} = \left(\frac{[\text{C}]_{\text{Sampel} + \text{spike}} - [\text{C}]_{\text{sampel}}}{[\text{C}]_{\text{Spike}}} \right) \times 100\% \quad (9)$$

atau

$$\% Recovery = \frac{(\text{Kadar yang diperoleh})}{(\text{Kadar yang ditambahkan})} \times 100\% \quad (10)$$

Perhitungan % recovery untuk uji antioksidan dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\% Recovery = \left(\frac{CF}{CA} \right) \times 100\% \quad (11)$$

keterangan :

CF : % inhibisi sampel + standar asam askorbat.

CA : % inhibisi sampel sebenarnya.

$$t_{\text{Hitung}} = \frac{[C]_{\text{CRM}} - [C]_{\text{Hasil}}}{\sqrt{U^2_{\text{CRM}} + \frac{SD^2_{\text{Hasil}}}{n}}} \quad (12)$$

2.7.3 Linearitas dan Rentang

Linieritas adalah kemampuan analisis yang memberikan respon langsung atau bantuan transformasi matematis yang baik, sebanding dengan konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, kesaksamaan, dan linieritas yang dapat diterima. Penentuan linieritas dalam prakteknya menggunakan rangkaian larutan dengan konsentrasi yang berbeda antara 50–150% kadar analit dalam sampel. Dalam literatur sering ditemukan rentang konsentrasi yang digunakan antara 0–200%. Jumlah sampel yang dianalisa minimal delapan sampel blanko. Sebagai parameter adanya hubungan linier, koefisien korelasi r digunakan dalam analisis regresi linier. Regresi linier dapat dituliskan seperti pada Persamaan 13.

$$y = a + bx \quad (13)$$

keterangan:

y : absorbansi sampel

a : intersep

b : slope

x : konsentrasi sampel (Harmita, 2004).

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil seperti pada Persamaan 14 dan 15 berikut:

$$a = \frac{(\sum y_i)(\sum x_i)^2 - (\sum x_i)(\sum y_i)}{N(\sum x_i^2) - (\sum y_i^2)} \quad (14)$$

$$b = \frac{N(\sum x_i y_i)(\sum x_i)^2 - (\sum x_i)(\sum y_i)}{N(\sum x_i^2) - (\sum y_i^2)} \quad (15)$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien (r) sebagaimana pada Persamaan 16 berikut:

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{[(N(\sum x^2) - (\sum x)^2)(N(\sum y^2) - (\sum y)^2)]^{1/2}} \quad (16)$$

Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai b = 0 dan r = +1 atau -1 bergantung pada arah garis, sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan.

2.7.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi

Batas deteksi atau *Limit of Detection* (LoD) adalah jumlah terkecil analit dalam Sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi dapat ditentukan dengan penetapan blanko yang diterapkan ketika analisis blanko memberikan hasil standar deviasi tidak nol. Batas deteksi dinyatakan sebagai konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah tiga standar deviasi dan batas kuantifikasi adalah

konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah sepuluh standar deviasi seperti yang ditunjukkan pada Persamaan 17 dan Persamaan 18. Dimana nilai x adalah konsentrasi rata-rata blanko.

$$\text{LoD} = x + 3 \text{ SD} \quad (17)$$

$$\text{LoQ} = x + 10 \text{ SD} \quad (18)$$

Batas deteksi dan batas kuantifikasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ($S_{y/x}$). Sehingga Batas deteksi dan kuantifikasi dapat dihitung sesuai Persamaan 19 dan Persamaan 20 (Riyanto, 2014).

$$\text{LoD} = \frac{3 S_{y/x}}{\text{Slope}} \quad (19)$$

$$\text{LoQ} = \frac{10 S_{y/x}}{\text{Slope}} \quad (20)$$

dengan

$$S_{y/x} = \left(\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2} \right)^{1/2} \quad (21)$$

2.8 Ketidakpastian Pengukuran

Pengertian ketidakpastian adalah suatu parameter yang menentukan kisaran nilai yang diperkirakan nilai sebenarnya berada dalam nilai terukur. Menghitung rentang nilai ini dikenal sebagai pengukuran atau estimasi ketidakpastian.

Ketidakpastian menggabungkan semua kesalahan yang diketahui menjadi suatu rentang tunggal. Sumber-sumber ketidakpastian antara lain adalah sampling, preparasi cuplikan, kalibrasi peralatan, instrumen, kesalahan random, kesalahan sistematis, dan personil. Ada 2 kategori komponen ketidakpastian, yaitu tipe A (dari data primer) yang didasarkan pada pekerjaan eksperimental dan dihitung dari rangkaian pengamatan berulang, dan tipe B (dari data sekunder) yang didasarkan

pada informasi yang dapat dipercaya, seperti dari pabrik, buku literatur, jurnal, internet, dan lain-lain (Tuning dan Supriyanto, 2010).

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n X_k \quad (22)$$

Evaluasi tipe A didasarkan pada standar deviasi dari nilai pengukuran ulang, yang dinyatakan pada persamaan berikut:

$$S_{(x1)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x1 - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (23)$$

Ketidakpastian baku (μ) untuk tipe A diperoleh melalui persamaan:

$$\mu = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (24)$$

Penentuan nilai ketidakpastian hasil pengujian secara keseluruhan dapat diperoleh dengan menentukan nilai ketidakpastian gabungan menggunakan persamaan berikut:

$$\mu_{\text{Gabungan}} = (\mu_a/a)^2 + (\mu_b/b)^2 + (\mu_c/c)^2 + \dots \quad (25)$$

2.9 Uraian Tumbuhan

2.9.1 Nanas

Nanas merupakan tanaman buah yang selalu tersedia sepanjang tahun, tingginya mencapai 50-150 cm, terdapat tunas menyerap pada bagian pangkalnya berkumpul dalam roset akar dan pangkalnya melebar. Daun nanas merupakan daun majemuk yang berbentuk pedang, tebal, panjang 80-120 cm, lebar 2-6 cm, ujung lancip menyerupai duri, tepi berduri tempel yang bengkok ke atas, sisi bawah bersisik putih, berwarna hijau atau hijau kemerahan (Yomo *et al.* 2010).

2.9.1.1 Kandungan Senyawa Kimia

Flavonoid dan bromelin adalah senyawa yang banyak terkandung dalam kulit nanas. Selain itu, kulit nanas juga memiliki kandungan lain seperti tanin, oksalat dan pitat. Berdasarkan penelitian (Yeragamreddy *et al.* 2013) yang menyatakan bahwa kulit nanas positif mengandung tanin, saponin, steroid, flavonoid, fenol dan senyawa-senyawa lainnya, seperti yang tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4. Kandungan senyawa kimia pada ekstrak kulit nanas (Yeragamreddy *et al.* 2013)

Komponen Fitokimia	<i>Ananas comosus</i>
Karbohidrat	+
Tanin	+
Saponin	+
Terpenoid	+
Steroid	+
Flavonoid	+
Alkaloid	+
Fenol	+
Resin	+
Balsam	+
Glikosida jantung	+
Antrakuinon	+
Asam amino	+

Pada penelitian (Mardalena *et al.* 2011) melaporkan bahwa kulit buah nanas memiliki kandungan antioksidan sebesar 38,95 mg/100 gram dengan komponen bioaktif vitamin C yaitu sebesar 24,40 mg/100 gram, beta karoten sebesar 59,98 ppm, flavonoid 3,47 %, kuersetin 1,48%, fenol 32,69 ppm dan saponin 5,29%.

2.9.1.2 Manfaat Buah Nanas

Tanaman nanas dapat memiliki khasiat sebagai obat tradisional, mulai dari buah, bonggol dan kulit buah. Kulit nanas memiliki kandungan zat aktif flavonoid, enzim bromelain, vitamin C dan antosianin yang cukup tinggi dan diketahui senyawa aktif tersebut memiliki kemampuan sebagai agen antibakteri. Enzim bromelin pada kulit nanas berpotensi sebagai antinyeri, antiderma, *debridement*

(menghilangkan debris kulit) akibat luka bakar, mempercepat penyembuhan luka dan meningkatkan penyerapan antibiotik serta sangat bermanfaat dalam proses penyembuhan pasca operasi (Orsini *et al.* 2006).

2.9.2 Kakao

Tanaman kakao merupakan tumbuhan dikotil yang mempunyai 10 pasang kromosom ($2n = 2x = 20$). Habitat tanaman kakao yaitu hutan tropis dengan curah hujan atau kadar air serta kelembaban yang tinggi dan relatif konstan, curah hujan harus tinggi dan terdistribusi secara berkelanjutan, sehingga pohon kakao bisa tumbuh dengan baik. Tumbuhan kakao diketahui kaya akan kandungan senyawa bioaktif, terutama polifenol, dimana polifenol berkhasiat sebagai antioksidan alami dan antimikroba. Dari segi pangan dan kesehatan kulit buah kakao sangat bermanfaat bagi manusia, hal ini disebabkan karena adanya senyawa antioksidan yang terdapat pada kulit buah kakao dapat memodulasi sistem imun serta dapat mencegah penyakit kanker dan jantung koroner (Valko *et al.* 2007).

2.9.2.1 Kandungan Senyawa Kimia

Kulit buah kakao merupakan bagian terluar hingga daging buah sebelum terdapatnya kumpulan biji buah kakao, atau disebut juga bagian dinding buah kakao (mesokarp). Kulit buah kakao mengandung senyawa polifenol yang dapat digunakan sebagai antioksidan alami yang bermanfaat bagi kesehatan manusia (Miranda *et al.* 2020). Senyawa polifenol yang terkandung pada kulit buah kakao diantaranya adalah flavonoid, katekin, epikatekin, asam fenolat, dan proantosianidin (Daniswara dan Mujiburohman, 2020).

2.9.2.2 Manfaat Kakao

Efek antioksidan kakao secara langsung akan mempengaruhi resistensi insulin sehingga dapat menurunkan risiko diabetes. Kakao dapat melindungi dari iritasi, cedera, serta melindungi kulit dari paparan sinar UV, memiliki efek

mengenyangkan, fungsi kognitif, dan pengaturan suasana hati. Konsumsi rutin polifenol dan serat makanan yang ditemukan dalam buah kakao dapat secara efektif mengurangi risiko penyakit jantung koroner dan divertikulitis (Nieto-Figueroa *et al.* 2020).

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – September 2022 di Unit Pelayanan Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung, Laboratorium Kimia Analitik dan Instrumentasi, FMIPA, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas kimia, erlenmeyer, gelas ukur, labu takar, pipet tetes, pipet ukur dan *bulp*, blender, spatula, batang pengaduk, *rotary evaporator*, neraca analitik, oven, vial, toples, pisau, sendok, corong, kain, botol gelap, sonikasi dan spektrofotometer UV-Vis.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah nanas, kulit kulit buah kakao, kertas saring, alumunium foil, platik wrap, vitamin C (asam askorbat), etanol teknis 70%, etanol p.a, aquades dan reagen DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengumpulan Sampel

Sampel yang akan dianalisis pada penelitian ini adalah kulit buah nanas dan kulit buah kakao. Kulit buah nanas diperoleh dari penjual nanas madu di Jalan Z.A Pagar Alam Bandar Lampung, sedangkan kulit buah kakao yang diperoleh dari kebun warga di desa Bandar Sari, Kecamatan Padang Ratu, kabupaten Lampung Tengah. Sampel buah tersebut dicuci bersih kemudian dikupas kulitnya, kulit buah yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bagian kulit yang memiliki tekstur keras. Kulit buah tersebut selanjutnya dipotong-potong menjadi lebih kecil, lalu dikeringkan dibawah sinar matahari selama 4 hari. Sampel yang sudah kering ditandai dengan sampel kulit buah sudah bisa dipatahkan. Kandungan air pada sampel tidak boleh melebihi 10%. Sampel yang sudah kering masing-masing dihaluskan dengan grinder, kemudian diayak menggunakan ayakan 60 mesh. Sampel yang diperoleh dari ayakan 60 mesh selanjutnya dimasukan ke dalam wadah kedap udara sebelum diekstraksi dan dianalisis (Palente *et al.* 2021).

3.3.2 Ekstraksi Sampel

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu maserasi. Maserasi merupakan metode yang paling mudah dilakukan dan menggunakan peralatan yang sederhana, yaitu dengan cara merendam sampel dalam pelarut. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%.

Sampel diekstraksi dengan cara menimbang sebanyak 300 gram kulit kakao yang telah dihaluskan, dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 1,2 L, kemudian ditutup rapat dan didiamkan selama 24 jam dalam kondisi terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Setelah 24 jam simplisia dipisahkan antara ampas dan filtratnya. Ampas kembali dimaserasi dengan pelarut yang sama dan dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali replikasi.

Ekstrak etanol yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

Perlakuan yang sama juga dilakukan pada sampel kulit nanas. Selanjutnya, sampel yang diperoleh akan dilakukan pengukuran uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri UV-Vis.

3.3.3 Pembuatan Larutan

A. Pembuatan Larutan DPPH 0,5 mM

Sebanyak 4 mg DPPH ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam labu takar 20 mL dan ditambahkan dengan etanol p.a sampai tanda batas, larutan dihomogenkan. Labu takar ditutup dengan alumunium foil agar terhindar dari cahaya. Larutan DPPH dibuat segar saat akan dilakukan pengujian (Julizan *et al.* 2019).

B. Pembuatan Larutan Standar Asam Askorbat 10 ppm

Asam askorbat ditimbang sebanyak 1 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu takar 10 mL. Larutan dihomogenkan hingga larut dengan sempurna sehingga diperoleh larutan asam askorbat 100 ppm. Selanjutnya, larutan dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu takar 10 mL, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas, lalu dihomogenkan dan diperoleh larutan asam askorbat 10 ppm (Julizan *et al.* 2019).

C. Pembuatan Larutan Stok Sampel 1000 ppm

Sebanyak 1 gram sampel ekstrak kulit kakao ditimbang dalam erlenmeyer 250 mL, ditambahkan sebanyak 100 mL etanol p.a lalu disonikasi selama 15 menit agar senyawa dalam ekstrak sampel larut dengan sempurna. Diperoleh larutan dengan konsentrasi 10.000 ppm. Dipipet sebanyak 10 mL larutan sampel 10.000

ppm ke dalam labu takar 100 mL, lalu ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan dihomogenkan, diperoleh konsentrasinya 1000 ppm.

Prosedur yang sama juga dilakukan pada sampel ekstrak kulit nanas.

3.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH Secara Spektrofotometri UV-Vis

A. Penetapan Panjang Gelombang (λ) Serapan Maksimum

Sebanyak 1 mL larutan DPPH ditambahkan etanol p.a sebanyak 2,5 mL, lalu dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit pada ruang terhindar dari cahaya. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis hingga diperoleh panjang gelombang maksimum.

B. Pengukuran Serapan Blanko

Pengujian dilakukan dengan menambahkan 1 mL DPPH dengan 2,5 mL etanol p.a, lalu diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Semua pengerjaan dilakukan pada ruangan yang terhindar dari cahaya. Pengerjaan dilakukan sebanyak 3 replikasi.

C. Penentuan Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat

Larutan standar asam askorbat dipipet masing-masing 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL dan 2,5 mL. Lalu ditambahkan etanol p.a hingga masing-masing volumenya mencapai 2,5 mL, dihomogenkan. Diperoleh larutan dengan konsentrasi 2; 4; 6; 8; dan 10 ppm. Kemudian, sebanyak 1 mL DPPH ditambahkan kedalam masing-masing larutan lalu diinkubasi selama 30 menit pada ruang terhindar dari cahaya. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Pengerjaan dilakukan 3 kali replikasi.

3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan pada Sampel Ekstrak Kulit Kakao dan Ekstrak Kulit Nanas Menggunakan Metode DPPH Secara Spektrofotometri UV-Vis

Sampel ekstrak etanol kulit nanas dan kulit kakao yang diperoleh dari hasil maserasi selanjutnya diukur aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH.

A. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Kakao

Larutan stok ekstrak etanol dari kulit kakao dipipet sebanyak 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL, dan 2,5 mL lalu ditambahkan etanol p.a hingga masing-masing volume mencapai 2,5 mL, sehingga konsentrasi yang diperoleh yaitu 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, dan 1000 ppm. Selanjutnya ditambahkan DPPH sebanyak 1 mL, diinkubasi selama 30 menit dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

B. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Nanas

Larutan stok ekstrak etanol dari kulit nanas dibuat dalam 5 variasi, dengan memipet sebanyak 1 mL ekstrak sampel selanjutnya masing-masing labu ukur 5 mL. ditambahkan larutan standar 10 ppm dengan jumlah yang berbeda, pada sampel 1 tanpa penambahan standar, sampel 2 ditambahkan 0,5 mL standar, sampel 3 ditambahkan 1 mL standar, sampel 4 ditambahkan 1,5 mL standar dan sampel 5 ditambahkan 2 mL standar. Kemudian, dicukupkan dengan etanol pa hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan tersebut dipindahkan kedalam erlenmeyer, lalu masing-masing ditambahkan reagen DPPH sebanyak 1 mL dan diinkubasi pada ruang gelap selama 30 menit, selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 517 nm.

3.3.6 Validasi Metode Analisis

Parameter validasi metode yang diuji yaitu, akurasi, presisi, batas deteksi, batas kuantisasi, dan linearitas.

A. Penentuan Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan membuat kurva kalibrasi larutan standar asam askorbat dengan variasi konsentrasi yaitu 2 ppm; 4 ppm; 6 ppm; 8 ppm dan 10 ppm. Nilai absorbansi yang diperoleh dibuat persamaan linear hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi. Nilai koefisien determinasi yang diperoleh harus mendekati 1 dan sesuai dengan syarat keberterimaan yaitu nilai keberterimaan koefisien determinasi hasil uji linearitas adalah $> 0,997$ (Riyanto, 2014).

B. Akurasi

Sampel ekstrak etanol konsentrasi 200 ppm, 600 ppm, dan 1000 ppm, masing-masing ditambahkan larutan standar asam askorbat dengan konsentrasi 4 ppm. Larutan dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya, larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Prosedur ini direplikasi sebanyak 3 kali dan ditentukan % *recovery* dengan menggunakan Persamaan 7. Parameter ini dikatakan akurat bila % *recovery* yang diperoleh yaitu 98-102 % (Riyanto, 2014).

C. Presisi

Larutan induk dibuat dengan konsentrasi 200 ppm, 600 ppm dan 1000 ppm kemudian ditambahkan reagen DPPH lalu diinkubasi selama 30 menit pada ruang gelap. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 517 nm, dan diulang sebanyak 3 kali. Nilai presisi dinyatakan dalam *Relative*

Standard Deviation (% RSD), dimana syarat keberterimaan untuk %RSD <2% (Riyanto, 2014).

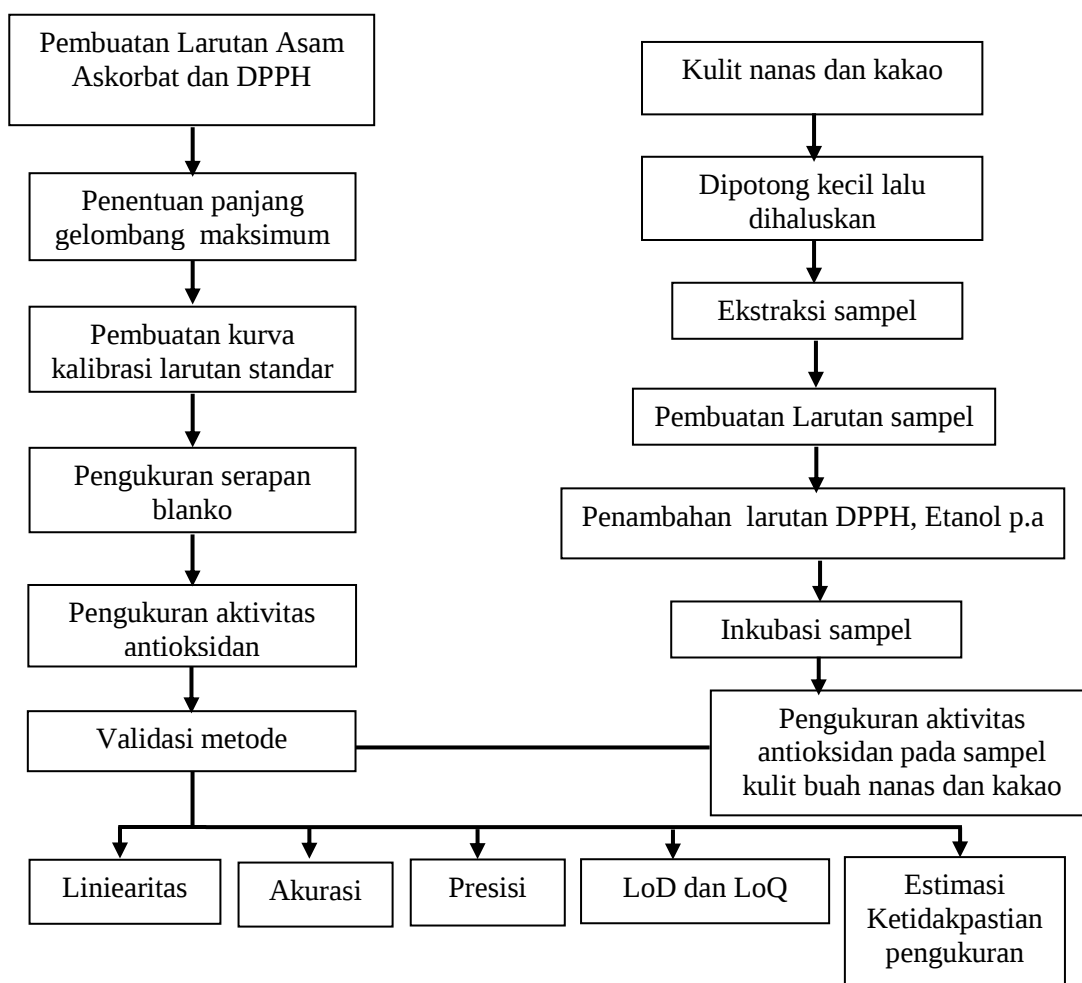
D. Batas Deteksi (LoD) dan Batas Kuantisasi (LoQ)

Penentuan LoD dan LoQ pada sampel dilakukan dengan menggunakan kurva kalibrasi dalam konsentrasi standar. Kurva kalibrasi tersebut dibuat dengan variasi konsentrasi yaitu 2 ppm; 4 ppm; 6 ppm; 8 ppm dan 10 ppm. Nilai LoD dan LoQ selanjutnya ditentukan menggunakan Persamaan 19 dan Persamaan 20.

3.3.7 Estimasi Ketidakpastian Pengukuran

Estimasi nilai ketidakpastian pengukuran dapat dihitung setelah diperoleh data hasil pengukuran dalam validasi metode pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri UV-Vis. Hasil data tersebut kemudian dilanjutkan dengan perhitungan ketidakpastian pengukuran dari masing-masing faktor yang dapat mempengaruhi pengukuran aktivitas antioksidan.

Bagan alir dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 5 berikut.



Gambar 5. Bagan alir penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Uji aktivitas antioksidan pada sampel kulit buah kakao dan kulit buah nanas menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri UV-Vis merupakan metode yang valid berdasarkan hasil uji validasi yang telah dilakukan. Sehingga metode tersebut dapat digunakan untuk pengujian rutin di UPT-LTSIT Universitas Lampung.
2. Berdasarkan uji validasi yang telah dilakukan pada sampel kulit kakao diperoleh hasil dengan parameter uji linearitas nilai $R^2 = 0,9916$. Uji presisi menghasilkan nilai % RSD sebesar 1,60 % pada sampel 200 ppm; 1,90% pada sampel 600 ppm; dan 1,28% pada sampel 1000 ppm, yang menunjukkan metode yang digunakan untuk uji antioksidan sampel kulit kakao memiliki ketelitian yang baik. Uji akurasi menghasilkan nilai % *recovery* yaitu 99,30% pada sampel 200 ppm ditambah 4 ppm standar; 101,40% 600 ppm ditambah 4 ppm standar dan 101,66% pada sampel 1000 ppm ditambah 4 ppm standar, nilai % *recovery* ini telah memenuhi syarat keberterimaan yaitu 95-105%. Hasil uji batas deteksi (LoD) yaitu 27,91 ppm dan batas kuantifikasi (LoQ) yaitu 93,06 ppm.

3. Berdasarkan uji validasi yang telah dilakukan pada sampel kulit nanas, diperoleh hasil dengan parameter uji linieritas nilai $R^2 = 0,9916$. Uji presisi menghasilkan % RSD sebesar 0,99% pada sampel 2; 0,89% pada sampel 3 dan 0,95% pada sampel 5 yang menunjukkan metode yang digunakan untuk uji antioksidan kulit nanas memiliki ketelitian yang baik. Uji akurasi menghasilkan % *recovery* yaitu 98,12% pada sampel 9,08 ppm ditambah standar 4 ppm; 99,17% sampel 10,23 ppm ditambah standar 4 ppm dan 101,93% sampel 12,04 ppm ditambah standar 5 ppm, nilai % *recovery* ini telah memenuhi syarat keberterimaan yaitu 95-105%. Uji batas deteksi (LoD) dan batas kuantifikasi (LoQ) yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 27,91 ppm dan 93,06 ppm.
4. Hasil uji aktivitas antioksidan dalam sampel ekstrak kulit kakao adalah $1134,00 \pm 1,34$ ppm dan kulit nanas adalah $7,24 \pm 1,70$ ppm.
5. Hasil uji pada sampel ekstrak kulit kakao menunjukkan aktivitas antioksidan kulit kakao pada penelitian ini tergolong sangat lemah dengan $IC_{50} > 200$ ppm. Sedangkan, hasil uji pada sampel ekstrak kulit nanas menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai $IC_{50} < 50$ ppm.

5.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan dari penelitian ini yaitu :

Diperlukan ketelitian dalam melakukan uji estimasi ketidakpastian pengukuran pada validasi metode uji aktivitas antioksidan agar nilai yang diperoleh sesuai dengan batas keberterimaan yaitu 30%.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 2012. Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F.1–17.
- Apak, R. Kubilay, O. G. Mustafa, and Saliha E.C. 2007. Mechanism of Antioxidant Capacity Assays and the CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay. *Molecules*.
- Artanti, Anif Nur, Ekstrak Etanol, dan Solanum Family. 2018. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Family Solanum Menggunakan Metode Reduksi Radikal Bebas. 62–69.
- Aziz, Tamzil, Ratih Cindo, dan Asima Fresca. 2009. Pengaruh Pelarut Hexana Dan Etanol, Volume Pelarut, Dan Waktu Ekstraksi Terhadap Hasil Ekstraksi Minyak Kopi. *Jurnal Teknik Kimia* 16(1):1–8.
- Basset, J., and Mendham. 1994. *Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. Buku kedokteran EGC. Jakarta.
- Daniswara, Lintang, dan Muhammad Mujiburohman. 2020. Isolasi Senyawa Flavonoid dari Limbah Kulit Buah Kakao dengan Variabel Mesh Partikel Dan Suhu Evaporasi. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”* 14–15.
- Day, R. A., and A. L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*. Erlangga. Jakarta.
- Desrosier, N. W. 1998. *Teknologi Pengawetan Pangan*. Ketiga. Diterjemahkan oleh M. Mulyohardjo. UI Press. Jakarta.

- Fessenden, R. J., and J. S. Fessenden. 1982. *Kimia Organik*. Edisi Ketiga. Diterjemahkan oleh A. H. Pudjaatmakan. Erlangga. Jakarta.
- Fessenden, R. J., and J. S. Fessenden. 1986. *Kimia Organik Dasar*. Edisi Ketiga. Diterjemahkan oleh A. H. Pudjaatmaka. Erlangga. Jakarta.
- Ganjar, I. G., dan A. Rohman. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Ganjar, I. G., dan A. Rohman. 2012. *Analisis Obat Secara Spektrofotometri dan Kromatografi*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Gülçin, İlhami, Metin Tansu Uğuz, Münir Oktay, Sükrü Beydemir, and Ö. Irfan Küfrevioğlu. 2004. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Salvia Sclarea* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 28(1):25–33.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 1(3):117–35.
- Hasanuddin. 2016. *Analisa Kadar Likopen Pada Tomat Dengan Menggunakan Spektrofotometer*. (Tugas Akh. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Hatam, Sri Febrianti, Edi Suryanto, dan Jemmy Abidjulu. 2013. Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Kulit Nanas (*Ananas Comosus* (L) Merr). *Jurnal Ilmiah Farmasi* 2(1):1–6.
- Horwitz, W. 1995. Protocols for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies. *Pure Appl. Chem* 67:331–43.
- Hoyos-Arbeláez, Jorge, Mario Vázquez, and José Contreras-Calderón. 2017. Electrochemical Methods as a Tool for Determining the Antioxidant Capacity of Food and Beverages: A Review. *Food Chemistry* 221:1371–81.
- Julizan, Nur, Siti Maemunah, Dina Dwiyanti, dan Jamaludin Al Anshori. 2019. Validasi Penentuan Aktifitas Antioksidan Dengan Metode Dpph. *Kandaga—Media Publikasi Ilmiah Jabatan Fungsional Tenaga Kependidikan* 1(1).

- Khaira, Kuntum. 2010. Antioksidan 2. Pdf. 183–87.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Diterjemahkan oleh M. Thenawijaya. Erlangga. Jakarta.
- Luba, Maria Aloisia Uron. 2017. *Ekstraksi dan Real Kromatografi*. Deepublish. Yogyakarta.
- Malau, Riana Octora, dan Yusi Prasetyaningsih. 2019. Formulasi Masker Alami Berbahan Dasar Kulit Buah Naga. *Jurnal TEDC* 13(3):283–87.
- Mardalena, L. Warli, E. Nurdin, W. S. N. Rusmana, and Farizal. 2011. *Milk Quality of Dairy Goat By Giving Feed Supplement as Antioxidant Source*. Andalas University. Padang.
- Miller, J., and J. Miller. 1991. *Statistika Untuk Kimia Analitik*. Diterjemahkan oleh Suroso. ITB. Bandung.
- Miranda, P.M., G. Putra, dan L. Suhendra. 2020. Karakteristik Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma Cacao L.*) Sebagai Sumber Antioksidan Pada Perlakuan Ukuran Partikel Dan Waktu Maserasi. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri* 8(1):28–38.
- Molyneux, Philip. 2004. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26 (December 2003):211–19.
- Mulja, H. M., dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Murray, R. K. 2003. *Biokimia Harper*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Nieto-Figueroa, K. H., N. V. Mendoza-garcía, M. Gaytan-Martínez, A. Wallmedrano, M. G. F. Loarca-Pina, and R. Campos-Vega. 2020. Effect Of Drying Methods On The Gastrointestinal Fate And Bioactivity Of Phytochemicals From Cocoa Pod Husk : In Vitro And In Silico Approaches. *Food Research International* 137:1–10.

- Nurdiansyah, dan Abdi Redha. 2011. Efek Lama Maserasi Bubuk Kopra Terhadap Rendemen , Densitas, dan Bilangan Asam Biodiesel Yang Dihasilkan dengan Metode Transesterifikasi In Situ. *Jurnal Belian* 60(2):218–24.
- Orsini, Roger A., Plastic Surgery Educational, Foundation Technology, and Assessment Committee. 2006. Bromelain. *Plastic and Reconstructive Surgery Journal* 118(7):1640–44.
- Palente, Ivon, Edi Suryanto, dan Lidya Irma Momuat. 2021. Karakterisasi serat pangan dan aktivitas antioksidan dari tepung kulit kakao (theobroma cacao l). *Chem. Prog.* 14(1):70–80.
- Pourmorad, F., S. Hosseinimehr, and N. Shahabimajd. 2006. Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Selected Iranian Medicinal Plants. *African Journal of Biotechnology* 5(TS32.744):1142–45.
- Prakash, A. 2001. Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 19(2).
- Reynertson, Kurt Allerslev. 2007. Phytochemical Analysis Of Bioactive Constituents From Edible Myrtaceae Fruits. *Dissertation*. The City University of New York. New York.
- Riyanto. 2014. *Validasi dan Verifikasi*. Deepublish.Yogyakarta.
- Rohman, A., dan Sumantri. 2007. *Analisis Makanan*. Gajah Mada University Press.
- Yogyakarta.Shita, A. E. 2016. *Selektivitas Metode Analisis Formalin Secara Spektrofotometri Dengan Pereaksi Schiff's*. Skripsi. Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta.
- Sitorus, Sanusi ibrahim, and Marham. 2013. *Teknik Laboratorium Kimia Organik*. Graha Ilmu. Padang.
- Teow, C. C. 2005. Antioxidant Activity and Bioactive Compounds of Sweetptatoes. Tesis. *Food Science Faculty of North Carolina State University*.

- Tiwari P, et al. 2011. Phytochemical Screening and Extraction : A Review. *India : Internationale Pharmaceutica Sciencia* 1(1):99–100.
- Tuning, Susanna, dan S. C. Supriyanto. 2010. Estimasi Ketidakpastian Hasil Pengujian Cu, Cr Dan Fe Dalam Contoh Sedimen Dengan Metode F- AAS. *Prosiding PPI-PDIPTN* 139–46.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser. 2007. Free Radicals And Antioxidants In Normal Physiological Functions And Human Disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39(1):44–84.
- Wahyuni, Indri Reski. 2015. *Validasi Metode Analisis Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak N- Heksan, Etil Asetat, Etanol 70% Umbi Talas Ungu (Colocasia Esculenta L. Schott) Dengan Metode Dpph, Cuprac Dan Frap Secara Spektrofotometri UV-Vis*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Alauddin. Makassar.
- Werdhasari, Asri. 2014. Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia* 3(2):59–68.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya Dalam Kesehatan*. Kanisius. Yogyakarta.
- Yasri, Budi, Kharoma Nur Hikmah, dan Meilandari Rosandhi. 2019. Perancangan Alat Uji Kandungan Peroksida (H₂O₂) Pada Minyak Goreng Menggunakan Light Dependent Resistor. *Agritepa*. VI(1).
- Yeragamreddy, Padmanabha R., Ramalingam Peraman, Naresh B. Chilamakuru, and Haribau Routhu. 2013. In Vitro Antitubercular and Antibacterial Activities of Isolated Constituents and Column Fractions from Leaves of *Cassia Occidentalis*, *Camellia Sinensis* and *Ananas Comosus*. *J. Pharmacol. Ther* 2(4):116–23.
- Yomo, S. A., Benny S., Zulfahmi, Putut W., Suharyono, dan Bambang W. 2010. Pedoman Praktis Budidaya Nanas. *Jurnal Pertanian* 120–36.
- Youngson, Robert Dr. 1998. *Antioksidan : Manfaat Vitamin C dan E Bagi Kesehatan*. Arcan. Jakarta.

- Yu, Liangli, Scott Haley, Jonathan Perret, Mary Harris, John Wilson, and Ming Qian. 2002. Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(6):1619–24.
- Yuhernita, and Juniarti. 2011. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun Surian yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Makara of Science Series* 15(1):48–52.
- Yuliani, F., dan F. Gazali. 2020. Pemanfaatan Kulit Buah Kakao Sebagai Sumber Antioksidan Alami. *Ranah Research: Journal of Multidisciplinary Research and Development* 119–24.