

Perbandingan Metode Uji Aktivitas Antioksidan DPPH, FRAP dan FIC Terhadap Asam Askorbat, Asam Galat dan Kuersetin

Kiki Maesaroh^{1,*}, Dikdik Kurnia², Jamaludin Al Anshori^{2,3}

¹Laboratorium Kimia Fisik dan Anorganik, Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21. Jatinangor, Kab. Sumedang 45363

²Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Sintesis, Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21. Jatinangor, Kab. Sumedang 45363

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

*Penulis korespondensi: kiki.maesaroh@unpad.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v6.n2.19049>

Abstrak: Antioksidan merupakan senyawa yang menghambat atau menunda reaksi oksidasi molekul dengan cara menghambat proses inisiasi atau propagasi reaksi oksidasi berantai. Struktur kimiawi antioksidan, sumber radikal bebas, dan sifat fisiko-kimia sediaan sampel yang berbeda dapat memberikan hasil uji aktivitas antioksidan yang beragam. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode analisa aktivitas antioksidan yang selektif untuk suatu jenis sampel tertentu. Studi perbandingan metode uji aktivitas antioksidan DPPH, FRAP, dan FIC telah dilakukan terhadap asam askorbat (AA), asam galat (AG), dan kuersetin. Ketiga metode uji antioksidan dibedakan berdasarkan pada jenis mekanisme reaksinya, sedangkan sampel standar antioksidan dipilih berdasarkan struktur polihidroksi atau polifenol yang umumnya mewakili dasar struktur antioksidan bahan alam. Metode uji aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH ditemukan paling efektif dan efisien diantara ketiga metode uji yang digunakan dengan nilai IC_{50} berturut-turut 1,27; 2,44; dan 2,77 mg/L untuk AG, kuersetin dan AA. Adapun metode FIC terbukti paling tidak efektif dan efisien karena sensitivitasnya yang sangat rendah dan daya kelatnya lebih kecil dari 20%. Korelasi antara metode uji untuk semua standar antioksidan terbukti sangat tinggi ($R > 0,98$), khususnya antara FRAP dan DPPH. Hal ini mengindikasikan adanya keterkaitan sangat kuat antara daya hambat radikal bebas dengan potensial reduksi senyawa polihidroksi (polifenol) terhadap ion besi. Secara umum kedua metode ini sangat dimungkinkan bisa saling menggantikan satu sama lain.

Kata kunci: Antioksidan, DPPH, FRAP, FIC, asam askorbat, asam galat, kuersetin

Abstract: Antioxidants are compounds that prevent or postpone oxidation reaction of a molecule by inhibiting initiation or propagation process of the chain oxidation reaction. The chemical structure of antioxidants, free radical sources, and physico-chemical properties of different sample preparations can provide various antioxidant activity test results. Therefore, selectivity of an antioxidant activity analysis method for a particular sample type is compulsory. The comparative study of antioxidant activity assays (DPPH, FRAP, and FIC) against ascorbic acid (AA), gallic acid (GA), and quercetin was accomplished. The three antioxidant activity assays were distinguished based on their typical reaction mechanism, while the samples of antioxidant standard were selected on the polyhydroxy or polyphenol based-structure, which are commonly available as the basic skeleton of the natural antioxidants compounds. The antioxidant assay against a radical of DPPH was found to be the most effective and efficient among the three assays with IC_{50} 1.27, 2.44, and 2.77 mg/L for GA, quercetin and AA, respectively. In contrast, FIC method was proven to be the least one due to its poor sensitivity and low chelating capability (<20%). The correlation between the antioxidant assay methods was found to be really high ($R > 0,98$), particularly between the FRAP and DPPH assay. This result indicated that the radical inhibition has strong correlation with the reduction power of the polyhydroxy (polyphenol) compounds toward iron ion. In general, the FRAP and DPPH assay are most probably complementary each other.

Keywords: Antioxidant, DPPH, FRAP, FIC, ascorbic acid, gallic acid, quercetin

PENDAHULUAN

Antioksidan adalah zat yang dapat menghambat proses oksidasi (Schuler 1990), sehingga dapat melindungi sel dari bahaya radikal bebas yang

dihasilkan dari metabolisme tubuh maupun faktor eksternal lainnya (Halliwell 1995). Secara kimiawi antioksidan alami yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan dan bahan pangan terutama berasal dari

golongan senyawa turunan fenol seperti flavonoid (kuersetin) (Rice-Evans *et al.* 1996; Kaur & Kapoor 2001), turunan senyawa asam hidroksamat (Liu *et al.* 2008), kumarin (Christos *et al.* 2006), vitamin (tokoferol) (Kamal-Eldin 1996), asam organik (asam galat) dan vitamin C (asam askorbat) (Moon & Shibamoto 2009; Chen & Ho, 1997; Kikukazi *et al.*, 2002; Kelebek *et al.*, 2009; Fang *et al.* 2002). Sistem kerja antioksidan secara umum dibagi menjadi dua, yaitu enzimatik: Superoxide dismutase (SOD), Katalase (CAT), Peroksidase (POX), Asam askorbat peroksidase (APX), glutation reduktase (GR) dan polifenol oksidase (PPO) dan non-enzimatik; contohnya asam askorbat (vitamin C), senyawa fenolik, karotin dan α -tokoferol (Mandal *et al.* 2009). Senyawa fenolik yang sangat aktif sebagai antioksidan alam dan paling banyak ditemukan dalam tanaman diantaranya adalah asam galat (Moon & Shibamoto 2009) dan kuersetin (Kaur & Kapoor 2001). Penelitian tentang hubungan antara struktur dan aktivitas antioksidan senyawa fenolik telah membuktikan bahwa aktivitas antioksidan senyawa ditentukan oleh adanya gugus hidroksil bebas dan terkonyugasi seperti pada asam galat, asam tanat dan kuersetin (Materska 2008).

Pengujian aktivitas antioksidan non enzimatis pada tanaman dan bahan pangan umumnya dapat menggunakan metode yang berbasis air 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (reaksi dengan radikal bebas), *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) (reaksi reduksi-oksidasi), *Ferrous Ion Chelating* (FIC) (reaksi kelat atau melalui pembentukan kompleks), dan yang berbasis lemak misalnya dengan *Thiobarbituric acid* (TBA) (Moon & Shibamoto 2009; Liu *et al.* 2006; Masoud *et al.* 2012; Dudonne *et al.* 2009; Thaipong *et al.* 2006; Lai *et al.* 2011; Pokorny 2001). Banyaknya metode uji aktivitas antioksidan tersebut dapat memberikan hasil uji yang beragam. Hal tersebut diakibatkan oleh adanya pengaruh dari struktur kimiawi antioksidan, sumber radikal bebas, dan sifat fisiko-kimia sediaan sampel yang berbeda. Oleh karena itu, sangat diperlukan pemilihan metode analisa aktivitas antioksidan yang tepat dan selektif untuk suatu jenis sampel tertentu. Pada penelitian ini telah dilakukan perbandingan tiga metode uji aktivitas antioksidan yang berbasis air (DPPH, FRAP, dan FIC) yang digunakan terhadap standar antioksidan bersifat polar dan mewakili struktur antioksidan pada umumnya seperti asam askorbat (AA), asam galat (AG), dan kuersetin. Selain itu, korelasi diantara ketiga metode uji tersebut juga telah diteliti. Prosedur yang digunakan adalah hasil modifikasi dan optimalisasi dari metode yang telah dilaporkan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan kimia yang digunakan terdiri dari asam askorbat (AA) (Merck), asam galat (AG) (Merck), kuersetin (Sigma), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

(DPPH) (Sigma), buffer fosfat pH 6,6 (0,2 M), larutan kalium heksasianoferat 1%, larutan asam trikloroasetat 10%, larutan besi(III)klorida 0,1%, larutan besi(II)klorida terhidrat 1 mM dan Ferozin 2,5 mM. akuades, aquabides, dan metanol (Merck).

Persiapan sampel

Larutan stok 100 mg/L standar AA, AG dan kuersetin dibuat dalam metanol yang akan digunakan dalam metode DPPH dan FRAP. Variasi konsentrasi masing-masing standar dibuat dengan cara pengenceran dari larutan stok 100 mg/L. Variasi konsentrasi yang digunakan adalah 2, 4, 8, 16 dan 32 mg/L, sedangkan untuk metode FIC, larutan stok AA dan AG dibuat pada konsentrasi 40 mg/mL, untuk kuersetin dibuat larutan stok 1 mg/mL.

Metode DPPH (2,2 dipenyl-1-picrylhidrazil)

Metode uji antioksidan terhadap radikal bebas DPPH yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil modifikasi dari beberapa prosedur yang telah dilaporkan oleh Brand-Williams *et al.* (1995), Sharma & Bhat (2009), Panda (2012) dan Dolatabadi *et al.* (2014).

Pembuatan reagen DPPH

DPPH dengan konsentrasi 160 mg/L dibuat dengan menimbang zat tersebut sebanyak 4,0 mg dan dilarutkan dalam 25 mL metanol di dalam labu ukur. Larutan yang dihasilkan disimpan di ruang gelap dan dilindungi dengan aluminium foil.

Pembuatan Kurva baku DPPH

Larutan DPPH dengan konsentrasi 160 mg/L diencerkan dengan metanol untuk memperoleh larutan dengan konsentrasi 4, 8, 16, dan 32 mg/L. Panjang gelombang maksimum DPPH di dalam metanol ditentukan dari pengukuran serapan salah satu larutan DPPH tersebut. Selanjutnya, masing-masing larutan DPPH dengan konsentrasi yang berbeda tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang maksima.

Pengukuran sampel

Pengenceran sampel uji dengan DPPH dilakukan sesuai dengan Tabel 1. Semua larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit yang dihitung sejak penambahan larutan DPPH pada sampel. Kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksima DPPH (517 nm). Sampel dengan konsentrasi 2,5 mg/L adalah AG, sedangkan sampel dengan konsentrasi 5,0 mg/L adalah AA dan kuersetin. Daya hambat masing-masing standar dinotasikan dengan % inhibisi, dan dihitung dengan persamaan (1).

$$\% \text{Inhibisi} = \left(1 - \frac{As}{Ak} \right) \times 100 \dots (1)$$

dengan : Ak = serapan kontrol
As = serapan sampel

Tabel 1. Tabel pengenceran sampel uji dengan DPPH

Kode sampel	Sampel			Blanko	
	Metanol (mL)	Sampel 2,5-5 mg/L (mL)	DPPH 160 mg/L (mL)	Sampel (mL)	Metanol (mL)
Kontrol	4	-	1	-	5
A1	-	4	1	4	1
A2	2	2	1	2	3
A3	3	1	1	1	4
A4	3,5	0,5	1	0,5	4,5
A5	3,75	0,25	1	0,25	4,75

Tabel 2. Tabel pengenceran sampel uji dengan FIC

Kode sampel	Sampel				Blanko	
	Metanol (mL)	Sampel (mL)	FeCl ₂ 1mM (mL)	Ferozin 2,5mM (mL)	Sampel (mL)	Metanol (mL)
Kontrol	4,5	-	0,5	0,5	-	5
A1	0,5	4	0,5	0,5	4	1
A2	2,5	2	0,5	0,5	2	3
A3	3	1	0,5	0,5	1	4
A4	3,5	0,5	0,5	0,5	0,5	4,5
A5	3,75	0,25	0,5	0,5	0,25	4,75

IC₅₀ sediaan sampel terhadap larutan DPPH ditentukan dari persamaan regresi linier yang dihasilkan dari pengukuran variasi konsentrasi sampel terhadap larutan DPPH.

Metode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Metode uji antioksidan FRAP yang digunakan dalam penelitian ini adalah modifikasi dari prosedur yang telah dilaporkan oleh Panda (2012).

Pembuatan kurva baku Fe²⁺ dari besi(II)sulfat heptahidrat

FeSO₄.7H₂O sebanyak 12,20 mg ditimbang dan dilarutkan dalam labu ukur 100 mL dengan akuades sampai dengan tanda batas labu. Aliquot masing-masing sebanyak 1,000; 0,500; 0,250; 0,125 dan 0,063 mL diambil dari larutan tersebut, dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi Fe²⁺ berturut-turut sebesar 0,88; 0,44; 0,22; 0,11 dan 0,05 µM.

Pengukuran sampel dengan FRAP

Sebanyak 0,5 mL sampel (variasi konsentrasi 0, 2, 4, 8, 16 dan 32 mg/L) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah dengan 0,5 mL buffer fosfat pH 6,6 (0,2 M), ditambah dengan 0,5 mL larutan kalium heksasianoferrat 1%. Larutan campuran diinkubasi pada 50°C selama 20 menit dan kemudian ditambah

dengan 0,5 mL larutan TCA 10% (Apabila terjadi dua lapisan, dipisahkan melalui sentrifugasi). Lapisan atas diambil sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam kuvet 1,5 mL, kemudian ditambahkan 0,5 mL akuades, 0,5 mL FeCl₃ 0,1%. Campuran larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar (25 oC) selama 5-10 menit. Serapan larutan tersebut kemudian diukur pada panjang gelombang 700 nm dan dihitung sebagai konsentrasi Fe²⁺ (µM/g) berdasarkan kurva baku Fe²⁺.

Metode FIC (Ferrous Ion Chelating)

Metode uji antioksidan FIC yang digunakan dalam penelitian ini adalah modifikasi dari prosedur yang telah dilaporkan oleh Lai & Lim (2011) dan Panda (2012).

Pengukuran sampel

Persiapan sampel dilakukan dengan mengikuti Tabel 2. Semua larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan. Selanjutnya larutan diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama 10 menit yang dihitung sejak dari penambahan larutan ferozin pada sampel. Serapan sampel diukur pada panjang gelombang 562 nm. Efek khelat ion Fe²⁺ dihitung dengan persamaan (2).

$$\text{Efek Pengkelat(\%)} = \left(1 - \frac{As}{Ak}\right) \times 100 \dots (2)$$

dengan : As = serapan sampel
Ak = serapan kontrol

Semua percobaan dilakukan minimal dari 5 variasi konsentrasi sampel yang diulang masing-masing sebanyak 3 kali dan diukur serapannya UV/tampaknya sebanyak 3 kali. Nilai aktivitas antioksidan masing-masing sampel dilaporkan dalam bentuk nilai rata-rata (\bar{x}) dari semua nilai hasil pengukuran dengan standar deviasinya (s_d) dan jumlah data populasi datanya (n) serta ditulis dalam format $\bar{x} \pm s_d$ (n). Koefisien korelasi antara data yang dihasilkan oleh masing-masing metode analisa dihitung dengan menggunakan Microsoft excel.

Untuk membandingkan efektifitas dan efisiensi ketiga metode uji aktivitas antioksidan terhadap sampel, maka dilakukan perhitungan limit deteksi Limit of Detection (LoD) dan Limit of Quantitation limit kuantitasi (LoQ), masing-masing dengan persamaan (3) dan (4).

$$\text{LoD} = 3,3\sigma/s \dots (3)$$

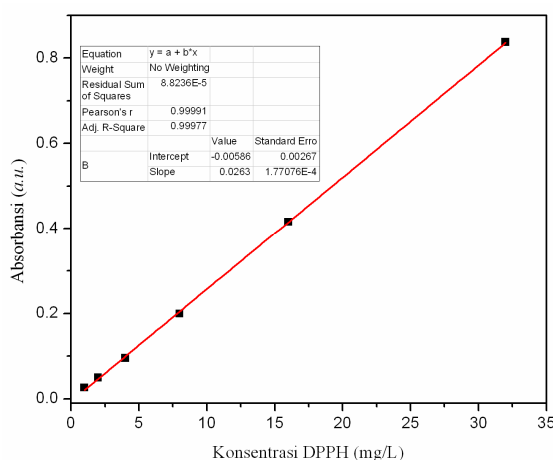
$$\text{LoQ} = 10\sigma/s \dots (4)$$

dengan : σ = standar deviasi yang diperoleh dari standar deviasi/standar eror intesep kurva baku
 s = slope kurva baku

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode Uji DPPH

Nilai konsentrasi larutan DPPH yang direaksikan dengan sampel dipilih berdasarkan kurva baku larutan DPPH (Gambar 1). Konsentrasi larutan DPPH yang digunakan pada sampel yaitu 32 mg/L dengan serapan pada 517 nm, sebesar $0,837 \pm 0,053$ (3). Konsentrasi tersebut dipilih berdasarkan linieritas kurva baku terbaik. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan, maka akan semakin banyak variasi konsentrasi yang bisa dipakai dalam percobaan. Dalam percobaan ini, metanol dipilih sebagai pelarut karena untuk menyesuaikan dengan pelarut DPPH (Sharma *et al.* 2009) dan sampel lainnya yang mempunyai kelarutan lebih baik dalam metanol.



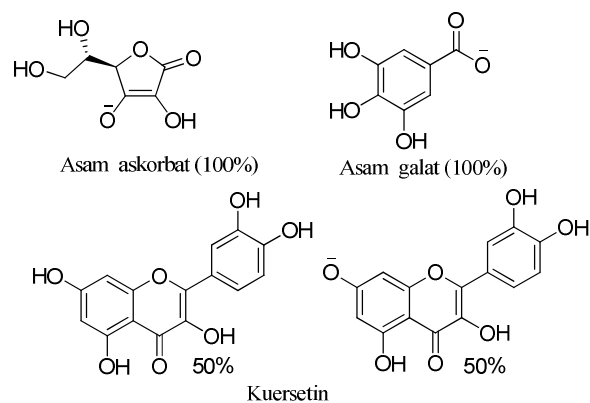
Gambar 1. Kurva baku larutan DPPH di dalam metanol pada λ_{maks} 517 nm

Aktivitas daya hambat AA, AG dan kuersetin terhadap radikal DPPH

Rentang konsentrasi standar AA yang digunakan dalam percobaan ini adalah 0,25–4,00 mg/L. Variasi konsentrasi AA tersebut menghasilkan daya hambat terhadap radikal DPPH berkisar antara 5–73 %. Untuk standar AG, konsentrasi pada rentang 0,13–2,0 mg/L dapat menghasilkan daya hambat terhadap radikal DPPH berkisar antara 5–80 %. Adapun untuk standar kuersetin, konsentrasi pada rentang 0,25–4 mg/L dapat menghasilkan daya hambat terhadap radikal DPPH berkisar antara 6–83 %. Rentang konsentrasi standar yang berbeda adalah hasil penyesuaian dengan reaktivitas masing-masing standar terhadap radikal DPPH yang relatif berbeda satu sama lain. Pertimbangan lain adalah berdasarkan pada batas nilai serapan minimum dan maksimum sampel yang masih dapat dibaca dengan spektrofotometer UV/tampak secara akurat dan presisi.

Tabel 3. Nilai IC_{50} , LoD dan LoQ senyawa AA, AG, dan kuersetin terhadap radikal bebas DPPH.

Sampel	$IC_{50} \pm RSD$ (n) (mg/L)	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)
AA	$2,77 \pm 0,05$ (15)	0,08	0,25
AG	$1,27 \pm 0,05$ (15)	0,09	0,26
Kuersetin	$2,44 \pm 0,07$ (15)	0,11	0,33



Gambar 2. Perkiraan bentuk terionisasi senyawa standar antioksidan pada pH 6,6, hasil simulasi perangkat lunak (Chem Axon)

Perbandingan nilai IC_{50} ketiga standar antioksidan tersebut terhadap radikal DPPH (Tabel 3), menunjukkan bahwa daya hambat standar antioksidan AG terhadap radikal DPPH dua kali lebih baik dibandingkan standar antioksidan AA. Kemungkinan besar hal ini disebabkan oleh AG yang lebih mampu menstabilkan radikal yang terbentuk melalui delokalisasi elektron ke dalam sistem aromatik fenol (Gambar 2). AG merupakan senyawa antioksidan yang banyak terkandung dalam berbagai

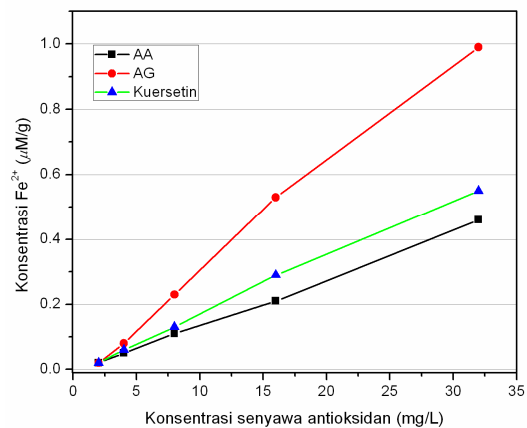
macam tanaman dan bahan pangan (Moon & Shibamoto, 2009) serta banyak digunakan sebagai standar pengukuran pada penentuan kadar senyawa-senyawa fenolik (Golumbic & Mattil, 2007). Penggunaan AG sebagai standar pada pengukuran aktivitas antioksidan terhadap senyawa radikal DPPH memang tidak sebanyak AA. Akan tetapi hasil pengukuran menunjukkan aktivitas yang relatif lebih baik daripada AA. Oleh karena itu, AG bisa menjadi alternatif pengganti standar antioksidan AA. Seperti halnya AA, struktur AG yang berperan sebagai antioksidan adalah gugus hidroksil fenol. Senyawa ini tidak larut dalam air, namun larut baik dalam metanol dan etanol.

Perbandingan IC_{50} standar AA dan AG terhadap kuersetin (Tabel 3) menunjukkan bahwa IC_{50} kuersetin sebanding dengan IC_{50} AA dan 2 kali kurang efektif dibandingkan terhadap IC_{50} AG. Berdasarkan strukturnya, senyawa kuersetin memiliki kemampuan lebih baik menstabilkan radikal melalui delokalisasi elektron radikal ke dalam sistem poliaromatik fenol dibandingkan AG dan AA (Gambar 2). Akan tetapi kurang efektifnya daya hambat senyawa kuersetin dibandingkan dengan AG dimungkinkan akibat adanya halangan sterik yang sama-sama dimiliki oleh senyawa kuersetin dan DPPH. Kuersetin merupakan senyawa flavonoid utama yang termasuk ke dalam golongan flavonol. Kuersetin banyak ditemukan dalam berbagai tanaman dan bahan makanan, buah-buahan, juga bermanfaat untuk kesehatan (Lakhanpal & Rai, 2007)(Materska, 2008). Ketika flavonol kuersetin bereaksi dengan radikal bebas, kuersetin mendonorkan protonnya dan menjadi senyawa radikal. Elektron tidak berpasangan yang dihasilkan didelokalisasikan ke dalam sistem aromatik sehingga senyawa radikal kuersetin memiliki energi yang sangat rendah dan relatif kurang reaktif (Nuengchamnonng et.al., 2004), oleh karena itu senyawa ini sangat baik menghambat radikal bebas DPPH.

Metode Uji FRAP terhadap senyawa AA, AG, dan kuersetin

Metode ini berdasarkan pada reaksi reduksi dalam suasana asam terhadap senyawa kompleks Fe^{3+} (Kalium heksasianoferrat) yang berwarna kuning menjadi senyawa kompleks Fe^{2+} yang berwarna hijau kebiruan akibat donor elektron dari senyawa antioksidan. Metode uji aktivitas antioksidan dengan metode FRAP ini dapat dimonitor dengan pengukuran serapan senyawa kompleks Fe^{2+} yang terbentuk dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal 700 nm (Panda 2012). Uji antioksidan dengan metode FRAP sangat singkat prosesnya, sehingga hasilnya dapat diperoleh dengan cepat. Berdasarkan perbandingan data hasil uji FRAP terhadap senyawa AA, AG dan kuersetin pada rentang konsentrasi 2 - 32 mg/L (Gambar 3), menunjukkan bahwa Secara umum AG mempunyai kemampuan daya reduksi terhadap Fe^{3+} dua kali lebih

kuat dibandingkan AA dan kuersetin. Sedangkan kuersetin hanya sedikit lebih kuat daya reduksinya dibandingkan dengan AA. Seperti halnya pada metode uji DPPH, rentang konsentrasi standar disesuaikan dengan reaktivitas daya reduksi masing-masing standar terhadap Fe^{3+} yang relatif berbeda satu sama lain, dan juga berdasarkan pada batas nilai serapan minimum dan maksimum sampel yang masih dapat dibaca dengan spektrofotometer UV/tampak secara akurat dan presisi.



Gambar 3. Perbandingan daya reduksi AA, AG, dan kuersetin terhadap Fe^{3+} ($\mu M Fe^{2+}/g$)

Tabel 4. Nilai LoD dan LoQ pembentukan Fe^{2+} hasil reduksi AA, AG, dan kuersetin terhadap ion Fe^{3+} (FRAP)

Sampel	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)
AA	0,08	0,25
AG	1,64	4,96
Kuersetin	0,89	2,69

Kondisi asam pada uji FRAP secara umum dapat menurunkan kemampuan reduksi senyawa antioksidan akibat protonasi asam (Sharma & Bhat 2009). Berdasarkan hasil simulasi perangkat lunak Chem Axon, bentuk ionisasi ketiga senyawa antioksidan tersebut pada pH 6,6 dapat diperkirakan seperti terlihat pada (Gambar 2). Senyawa AA dan AG pada pH 6,6 diperkirakan terionisasi 100% membentuk monoanion, sedangkan kuersetin hanya terionisasi sebagian membentuk senyawa netral dan monoanion (1:1). Kemampuan kuersetin mereduksi Fe^{3+} pada kondisi pH 6,6 diperkirakan berkurang akibat elektron pada atom oksigen yang terionisasi terstabilkan dengan lebih baik oleh sistem aromatik daripada AA dan AG. Pada senyawa AA, elektron pada atom oksigen yang terionisasi terstabilkan oleh proses konjugasi dengan sistem karbonil tak jenuh dan ikatan hidrogen intramolekuler (1,6) dengan proton dari gugus hidroksi alifatik.

Metode Uji FIC terhadap AA, AG, dan Kuersetin

Prosentase daya hambat standar antioksidan AA dan AG terhadap senyawa kompleks besi(II)ferozin untuk rentang konsentrasi 1,2-20 mg/mL adalah 0-5%. Adapun untuk senyawa kuersetin, rentang konsentrasi uji yang digunakan pada rentang 0,03-0,5 mg/mL menghasilkan daya khelat sebesar 0,5-18%. Rentang konsentrasi standar yang digunakan sesuai dengan reaktivitas daya khelat masing-masing standar terhadap ion Fe^{2+} yang relatif berbeda satu sama lain, dan disesuaikan dengan batas nilai serapan minimum dan maksimum sampel yang masih dapat dibaca dengan spektrofotometer UV/tampak secara akurat dan presisi. Berdasarkan nilai IC_{50} daya khelat ketiga senyawa antioksidan tersebut terhadap ion Fe^{2+} (Tabel 5), kuersetin mempunyai daya khelat 140 kali lebih kuat dibandingkan kedua senyawa antioksidan lainnya (AA dan AG). Akan tetapi, secara umum hasil uji FIC ketiga senyawa standar antioksidan terhadap Fe^{2+} mempunyai daya hambat di bawah 20%, hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh lemahnya kemampuan ikatan koordinasi senyawa polifenol terhadap logam besi akibat adanya resonansi sistem aromatik dan elektronegatifitas atom oksigen dari fenol yang cukup kuat menahan pasangan elektron bebas dari atom oksigen. Hal ini secara umum sesuai dengan hasil yang telah dilaporkan oleh Andjelkovic *et al.* (2006). Senyawa polifenol dari bahan alam dilaporkan mempunyai daya khelat terhadap Fe^{2+} yang relatif lemah dibandingkan terhadap EDTA (Berker *et al.* 2010). Sehingga uji FIC dinilai relatif kurang sensitif terhadap uji aktivitas antioksidan dibandingkan dengan metode uji yang lainnya.

Tabel 5. Nilai IC_{50} , LoD dan LoQ daya khelat senyawa AA, AG dan kuersetin terhadap ion Fe^{2+} (FIC)

Sampel	$\text{IC}_{50} \pm \text{RSD} (n)$ (mg/mL)	LoD (mg/mL)	LoQ (mg/mL)
AA	210,51 \pm 8,27 (15)	1,68	5,09
AG	202,39 \pm 8,37 (15)	1,22	3,69
Kuersetin	1,44 \pm 0,05 (15)	0,04	0,12

Berdasarkan nilai LoD dan LoQ ketiga metode uji aktivitas antioksidan terhadap sampel pada (Tabel 4.1, 4.2, dan 4.3), metode uji DPPH terbukti lebih efektif dan efisien daripada metode FRAP. Adapun metode FIC terbukti sangat tidak efektif dan efisien karena nilai LoD dan LoQ nya 700-20000 kali lebih rendah sensitivitasnya terhadap sampel dibandingkan terhadap metode uji FRAP dan DPPH. Untuk menguji hubungan antara ketiga metode uji aktivitas antioksidan terhadap ketiga standar senyawa antioksidan, maka dilakukan analisa regresi (koefisien korelasi, R). Korelasi yang sangat signifikan telah ditemukan pada semua metode uji untuk ketiga standar antioksidan ($R > 0,98$) khususnya

antara FRAP dan DPPH. Koefisien korelasi yang signifikan ini menunjukkan bahwa potensi antioksidan ketiga standar antioksidan tersebut mempunyai keterkaitan dengan kemampuan reaksi reduksi dan oksidasi serta stabilisasi radikal oleh senyawa tersebut melalui resonansi sistem aromatik fenol. Selain itu, daya khelat juga dapat mencegah radikal yang terbentuk, walaupun tidak berperan dominan.

KESIMPULAN

Metode uji aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH ditemukan paling efektif dan efisien diantara tiga metode uji yang digunakan, sedangkan metode FIC paling tidak efektif dan efisien karena sensitivitasnya yang sangat rendah dan daya khelatnya lebih kecil dari 20%. Ketiga metode uji mempunyai korelasi yang sangat tinggi ($R > 0,98$), khususnya antara FRAP dan DPPH. Hal ini mengindikasikan adanya keterkaitan sangat kuat antara daya hambat radikal bebas dengan potensial reduksi senyawa polihidroksi (polifenol) terhadap ion besi. Secara umum kedua metode ini sangat dimungkinkan bisa saling mempengaruhi bahkan dapat menggantikan. Standar antioksidan AG terbukti relatif paling reaktif sebagai antioksidan diantara AA dan kuersetin, sehingga bisa menjadi alternatif standar antioksidan disamping AA yang sudah menjadi standar acuan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas dukungan bahan dan fasilitas penelitian dari Laboratorium Aplikasi Kimia dan Pelayanan, Departemen Kimia, FMIPA Unpad.

DAFTAR PUSTAKA

- Andjelković, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M. & Verhe, R. (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*. 98(1): 23-31.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M. & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 85(5): 957-998.
- Benzie, I.F. (1996). An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clinical Biochemistry*. 29(2): 111-116.
- Berker, K.I., Güçlü, K., Demirata, B. & Apak, R. (2010). A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods*. 2(11): 1770-1778.
- Calliste, C.A., Trouillas, P., Allais, D.P., Simon, A. & Duroux, J.L. (2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative

- behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(7): 3321-3327.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7): 933-956.
- Chaillou, L.L. & Nazareno, M.A. (2006). New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(22): 8397-8402.
- Chen, J.H. & Ho, C.T. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(7): 2374-2378.
- Kontogiorgis, C.A., Savvoglou, K. & Hadjipavlou-Litina, D.J. (2006). Antiinflammatory and antioxidant evaluation of novel coumarin derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 21(1): 21-29.
- Crozier, A., Clifford, M.N. & Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.
- Davey, M.W., Montagu, M.V., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D. & Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7): 825-860.
- Dinis, T.C., Madeira, V.M. & Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 315(1): 161-169.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M. & Mérillon, J.M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(5): 1768-1774.
- Dolatabadi, J.E.N., Mokhtarzadeh, A., Ghareghoran, S.M. & Dehghan, G. (2014). Synthesis, characterization and antioxidant property of quercetin-Tb (III) complex. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 4(2): 101-104.
- Fang, Y.Z., Yang, S. & Wu, G. (2002). *Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition*. Elsevier Science Inc. United State.
- Golumbic, C. & Mattill, H.A. (1942). The antioxidant properties of gallic acid and allied compounds. *Oil & Soap*. 19(8): 144-145.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*. 18(1): 125-126.
- Heo, S.J., Park, E.J., Lee, K.W. & Jeon, Y.J. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*. 96(14): 1613-1623.
- Kamal-Eldin, A. & Appelqvist, L.Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*. 31(7): 671-701.
- Kaur, C. & Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International Journal of Food Science & Technology*. 36(7): 703-725.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A. & Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*. 91(2): 187-192.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K. & Taniguchi, H. (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(7): 2161-2168.
- Lai, H. & Lim, Y. (2011). Evaluation of antioxidant activities of the methanolic extracts of selected ferns in Malaysia. *International Journal of Environmental Science and Development*. 2(6): 442-447.
- Liu, H., Xiang, B. & Qu, L. (2006). Structure analysis of ascorbic acid using near-infrared spectroscopy and generalized two-dimensional correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. 794(1-3): 12-17.
- Liu, Y.H., Lin, S.Y., Lee, C.C. & Hou, W.C. (2008). Antioxidant and nitric oxide production inhibitory activities of galacturonyl hydroxamic acid. *Food Chemistry*. 109(1): 159-166.
- Liu, T.Z., Chin, N., Kiser, M. & Bigler, W. (1982). Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbate oxidase. *Clinical Chemistry*. 28(11): 2225-2228.
- Mandal, S., Yadav, S., Yadav, S. & Nema, R.K. (2009). Antioxidants: a review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 1(1): 102-104.
- Masoud, M.S., Hagagg, S.S., Ali, A.E. & Nasr, N.M. (2012). Synthesis and spectroscopic characterization of gallic acid and some of its azo complexes. *Journal of Molecular Structure*. 1014: 17-25.
- Materska, M., 2008. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 58(4): 407-413.
- Moon, J.K. & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(5): 1655-1666.
- Nuengchamnong, N., Hermans-Lokkerbol, A. & Ingkaninan, K. (2004). Separation and detection of the antioxidant flavonoids, rutin and quercetin, using HPLC coupled on-line with colorimetric

- detection of antioxidant activity. *Naresuan University Journal: Science and Technology*. 12(2): 25-37.
- Panda, S.K. (2012). Assay guided comparison for enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities with special reference to medicinal plants. In El-Missiry, M.A. (ed.). *Antioxidant Enzyme*. IntechOpen. Rijeka.
- Pokorny, J. & Korczak, J. (2001). Preparation of natural antioxidant. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. (eds.). *Antioxidants in Food: Practical Applications*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge.
- Schuler, P. (1990). Natural Antioxidant Exploited Commercially. In: Husdant, B.J.F. (ed.). *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science. New York.
- Sharma, O.P. & Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113(4): 1202-1205.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. & Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(6-7): 669-675.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*. 28(1): 25-30.
-