

SKRIPSI

**VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS PENANGKAPAN
RADIKAL 2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH)
PRODUK KAPSUL EKSTRAK TEH HIJAU**



CICA MARYUNI BUDIASTUTIK

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN ILMU KEFARMASIAN
SURABAYA**

2022

SKRIPSI

**VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS PENANGKAPAN
RADIKAL *2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL* (DPPH)
PRODUK KAPSUL EKSTRAK TEH HIJAU**

CICA MARYUNI BUDIASTUTIK

051811133045

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN ILMU KEFARMASIAN
SURABAYA**

2022

Lembar Pengesahan

**VALIDASI METODE UJI AKTIVITAS PENANGKAPAN
RADIKAL 2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH)
PRODUK KAPSUL EKSTRAK TEH HIJAU**

SKRIPSI

**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat
Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

2022

Oleh:

Cica Maryuni Budiastutik

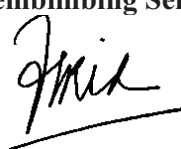
NIM : 051811133045

**Skripsi ini telah disetujui
tanggal 3 Agustus 2022 oleh :**

Pembimbing Utama


Prof. Dr. apt. Djoko Agus Purwanto, M.Si.
NIP. 195908051987011001

Pembimbing Serta


Dr. apt. Asri Darmawati, MS.
NIP. 19561228 198503 2002

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Cica Maryuni Budiastutik

NIM : 051811133045

adalah mahasiswa Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Naskah Tugas Akhir/Skripsi yang saya tulis dengan judul:

Validasi Metode Uji Aktivitas Penangkapan Radikal 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Produk Kapsul Ekstrak Teh Hijau

adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa isi Naskah Skripsi ini merupakan hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 29 Juli 2022

Yang membuat pernyataan,



Cica Maryuni Budiastutik

NIM. 051811133045

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Cica Maryuni Budiastutik

NIM : 051811133045

menyatakan bahwa demi kepentingan perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui abstrak Skripsi yang saya tulis dengan judul:

Validasi Metode Uji Aktivitas Penangkapan Radikal 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Produk Kapsul Ekstrak Teh Hijau

untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik, sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 29 Juli 2022

Yang membuat pernyataan,



Cica Maryuni Budiastutik

NIM. 051811133045

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur bagi sang pencipta semesta, Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul Validasi Metode Uji Aktivitas Penangkapan Radikal *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) Produk Kapsul Ekstrak Teh Hijau dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat guna memperoleh gelar sarjana pada program studi di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Selama proses penyelesaian skripsi ini, penulis mendapat banyak dukungan dan juga bantuan dari berbagai pihak, maka pada kesempatan kali ini tak lupa penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan sedalam- dalamnya kepada:

1. Prof. Dr. apt. Djoko Agus Purwanto, M.Si., selaku pembimbing utama dan Dr. apt. Asri Darmawati, MS., selaku pembimbing serta yang dengan sabar telah memberikan arahan, masukan serta bimbingan selama menyelesaikan skripsi ini.
2. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA., selaku rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk menyelesaikan program pendidikan S-1 Farmasi di Universitas Airlangga.
3. Prof. Junaidi Khotib S.Si., Apt., M.Kes., Ph.D., selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk menyelesaikan program pendidikan S-1 Farmasi di Universitas Airlangga.
4. Prof. Dr. apt. Juni Ekowati, M.Si., selaku ketua Departemen Ilmu Kefarmasian yang telah membantu dan memberikan kesempatan dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Prof. Dr. Bambang Tri Purwanto, MS., Apt. dan Prof. Dr. H. Achmad Syahrani, Apt., MS., selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan sehingga dapat terselesaikannya skripsi ini.
6. Dra. Toetik Aryani, M.Si., Apt., selaku dosen wali yang telah membimbing dan memberi arahan selama menjalankan program pendidikan S-1 Farmasi di Universitas Airlangga.
7. Pak Kustiawan dan Pak Kusairi selaku laboran laboratorium MPL 3 yang telah memberikan bantuan dan semangat dalam proses penelitian ini.

8. Ibu Rupini selaku orang tua beserta seluruh anggota keluarga yang selalu memberikan dukungan, doa, motivasi dan semangat selama menjalankan program pendidikan S-1 Farmasi di Universitas Airlangga.
9. Sahabat terdekat, Fahmi Nasrullah Azmi yang selalu menemani, memberi semangat, dan mendengarkan segala suka dan duka selama penyusunan skripsi ini.
10. Para sahabat dan teman-teman kelas A angkatan 2018 yang telah memberikan bantuan, doa dan semangat.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu kelancaran pelaksanaan penelitian dan penyusunan naskah skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tak luput dari kekurangan dan jauh dari sempurna karena kebenaran dan kesempurnaan hanya milik Allah SWT, untuk itu penulis mohon maaf sebesar-besarnya. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi siapa saja yang membacanya.

Surabaya, 29 Juli 2022

Penulis



Cica Maryuni Budiastutik

RINGKASAN

Validasi Metode Uji Aktivitas Penangkapan Radikal 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Produk Kapsul Ekstrak Teh Hijau

Cica Maryuni Budiastutik

Kapsul ekstrak teh hijau diyakini memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dan telah banyak digunakan oleh masyarakat untuk menjaga kesehatan. Pengujian aktivitas antioksidan pada produk kapsul ekstrak teh hijau perlu dilakukan karena produk ini diduga memiliki potensi antioksidan tinggi yang bermanfaat bagi kesehatan. Metode DPPH memiliki kelemahan tidak bereaksi spesifik pada antioksidan tertentu menyebabkan pengujian DPPH pada kondisi yang berbeda dapat menghasilkan hasil yang berbeda terutama pada antioksidan dengan struktur yang kompleks, sehingga perlunya dilakukan validasi metode uji aktivitas penangkapan radikal DPPH produk kapsul ekstrak teh hijau. Potensi antioksidan produk kapsul ekstrak teh hijau selanjutnya dibandingkan dengan vitamin C yang juga memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi.

Penelitian ini bertujuan memvalidasi metode uji aktivitas penangkapan radikal DPPH yang digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan kapsul ekstrak teh hijau dengan parameter uji spesifisitas, linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi dan presisi, serta membandingkan aktivitas antioksidan kapsul ekstrak teh hijau yang mengandung EGCG dalam jumlah tertentu dengan vitamin C yang merupakan antioksidan sangat kuat. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menentukan nilai IC_{50} EGCG, vitamin C dan ekstrak teh hijau. Validasi metode analisis yang dilakukan mengacu pada pedoman ICH Q2(R1) dengan menggunakan standar EGCG.

Pada uji spesifisitas dilakukan pengamatan spektra larutan EGCG, vitamin C dan ekstrak teh hijau pada panjang gelombang 400 – 800 nm (daerah *visible*) masing-masing *dioverlay* dengan spektra larutan DPPH 25 ppm. Hasil *overlay* spektra didapatkan bahwa larutan EGCG, vitamin C dan ekstrak teh hijau tidak memiliki puncak/serapan pada panjang gelombang 400 – 800 nm, sehingga pengukuran serapan DPPH pada panjang gelombang 517 nm dapat dilakukan tanpa adanya gangguan senyawa-senyawa tersebut.

Validasi metode yang dilakukan menunjukkan adanya hubungan linier antara peningkatan kadar EGCG, vitamin C dan ekstrak teh hijau dengan peningkatan % inhibisi. Diperoleh nilai koefisien korelasi (r) EGCG, vitamin C dan ekstrak teh hijau secara berturut-turut adalah 0,9983, 0,9995 dan 0,9990 serta $V_{xo} < 5\%$. Nilai batas deteksi (LOD) 0,317 $\mu\text{g/ml}$. Nilai batas kuantitasi (LOQ) 1,056 $\mu\text{g/ml}$. Penentuan akurasi dengan penetapan persen perolehan kembali EGCG sebesar 95,17 %. Simpangan baku relatif (RSD) yang diperoleh untuk keterulangan ekstrak teh hijau sebesar 1,61 %.. Metode uji aktivitas penangkapan radikal DPPH yang telah memenuhi syarat validasi

kemudian diaplikasikan untuk menguji aktivitas antioksidan EGCG, vitamin C dan ekstrak teh hijau. Didapatkan nilai IC_{50} EGCG, vitamin C dan ekstrak teh hijau berturut-turut sebesar 6,99 $\mu\text{g/ml}$, 11,13 $\mu\text{g/ml}$ dan 14,18 $\mu\text{g/ml}$.

Berdasarkan hasil uji independent t-test untuk perbandingan IC_{50} EGCG dengan vitamin c dan perbandingan IC_{50} vitamin C dengan ekstrak teh hijau diperoleh harga $\text{Sig. (2-tailed)} < 0,05$ yang artinya pada taraf kepercayaan 95% terdapat perbedaan bermakna antara kedua data yaitu IC_{50} EGCG dengan IC_{50} vitamin C dan IC_{50} vitamin C dengan IC_{50} ekstrak teh hijau, sehingga dapat disimpulkan bahwa IC_{50} EGCG lebih rendah daripada IC_{50} vitamin C (aktivitas antioksidan EGCG lebih tinggi daripada vitamin C) dan IC_{50} vitamin C lebih rendah daripada IC_{50} ekstrak teh hijau (aktivitas antioksidan vitamin C lebih tinggi daripada kapsul ekstrak teh hijau).

ABSTRACT**Validation of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Activity
Test Method of Green Tea Extract Capsules**

Cica Maryuni Budiastutik

Green tea extract capsules have strong antioxidant activity and have been widely used to maintain health. This study aims to validate the DPPH method used to determine the antioxidant activity of green tea extract capsules and compare the antioxidant activity of green tea extract capsules with vitamin C. Validation of the analytical method carried out refers to the ICH Q2(R1) guidelines with parameters of specificity, linearity, LOD, LOQ, accuracy, and precision. The antioxidant activity test was carried out by determining the IC_{50} value. Validation of the method showed a linear relationship between increasing levels of EGCG, vitamin C and green tea extract with an increase of % inhibition. The correlation coefficient (r) between EGCG, vitamin C and green tea extract concentration with signals were 0.9983, 0.9995, and 0.9990, respectively. The coefficient of variation of each function (V_{xo}) was $< 5\%$. The detection limit value (LOD) was $0.317 \mu\text{g/ml}$. The quantitation limit value (LOQ) was $1.056 \mu\text{g/ml}$. The accuracy of the method based on the percentage of EGCG recovery was 95.17% . The precision was 1.61% . The validated method was then applied to test the antioxidant activity of EGCG, vitamin C and green tea extract capsules. The IC_{50} values of EGCG, vitamin C and green tea extract capsules were $6.99 \mu\text{g/ml}$, $11.13 \mu\text{g/ml}$ and $14.18 \mu\text{g/ml}$, respectively. As conclusions, the DPPH method for determining the antioxidant activity of green tea extract capsules was fulfill the validation requirements and antioxidant activity potential (IC_{50}) of green tea capsules was lower than vitamin C.

Keyword: antioxidant, DPPH, EGCG, green tea extract capsules, method validation, vitamin C.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	v
RINGKASAN	vii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Antioksidan	5
2.1.1 Klasifikasi Antioksidan	5
2.1.2 Mekanisme Antioksidan.....	6
2.2 Tanaman Teh.....	8
2.2.1 Teh Hijau	9
2.2.2 Teh Oolong.....	12
2.2.3 Teh Hitam	12
2.3 Sediaan Kapsul Ekstrak Teh Hijau.....	12
2.4 Vitamin C	13
2.4.1 Antioksidan Vitamin C.....	13
2.5 Metode DPPH	15
2.5.1 Kelebihan dan Kekurangan Metode DPPH.....	16
2.5.2 Prosedur Kerja Pengukuran Antioksidan dengan DPPH.....	17
2.6 Spektrofotometer UV-Vis	18
2.7 Validasi Metode Analisis	20

2.7.1	Linieritas.....	21
2.7.2	Akurasi	22
2.7.3	Presisi	22
2.7.4	Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	23
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL.....		25
3.1	Uraian Kerangka Konseptual	25
3.2	Bagan Kerangka Konseptual.....	27
3.3	Hipotesis.....	27
BAB 4 METODE PENELITIAN		28
4.1	Rancangan Penelitian	28
4.2	Alat dan Bahan Penelitian.....	28
4.2.1	Alat	28
4.2.2	Bahan.....	29
4.3	Kerangka Operasional	29
4.4	Prosedur Penelitian.....	29
4.4.1	Penyiapan Larutan DPPH.....	29
4.4.2	Penyiapan Larutan EGCG	29
4.4.3	Penyiapan Larutan Vitamin C	30
4.4.4	Penyiapan Larutan Ekstrak Teh Hijau.....	30
4.4.5	Penetapan Panjang Gelombang (λ) Maksimum	31
4.4.6	Validasi Metode Uji Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH.....	31
4.4.7	Penentuan Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH.....	33
4.4.8	Perbandingan Nilai IC ₅₀ EGCG, Vitamin C dan Ekstrak Teh Hijau..	33
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN		34
5.1	Hasil Penelitian	34
5.1.1	Penetapan Panjang Gelombang Maksimum.....	34
5.1.2	Spesifisitas.....	35
5.1.3	Pengaruh Penambahan EGCG, Vitamin C dan Ekstrak Teh Hijau Terhadap Serapan DPPH.....	36
5.1.4	Linieritas.....	37
5.1.5	Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	41
5.1.6	Akurasi	43
5.1.7	Presisi	43
5.1.8	Pengujian Aktivitas Antioksidan EGCG	44

5.1.9 Pengujian Aktivitas Antioksidan Vitamin C	45
5.1.10 Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Teh Hijau.....	45
5.1.11 Perbandingan Aktivitas Antioksidan EGCG dan Vitamin C	46
5.1.12 Perbandingan Aktivitas Antioksidan Vitamin C dan Ekstrak Teh Hijau.....	47
5.2 Pembahasan	47
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	53
6.1 Kesimpulan.....	53
6.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Kategori tingkat kekuatan antioksidan	18
Tabel 2.2 Panjang gelombang warna-warna pada daerah sinar tampak	20
Tabel 2.3 Karakteristik metode uji dan parameter validasi	21
Tabel 2.4 Kriteria penerimaan akurasi.....	22
Tabel 2.5 Kriteria penerimaan presisi.....	23
Tabel 5.1 Panjang gelombang maksimum DPPH.....	34
Tabel 5.2 Hubungan konsentrasi EGCG dengan serapan DPPH dan % Inhibisi	37
Tabel 5.3 Hubungan konsentrasi vitamin C dengan serapan DPPH dan % inhibisi	39
Tabel 5.4 Hubungan konsentrasi ekstrak teh hijau dengan serapan DPPH dan % inhibisi	40
Tabel 5.5 Konsentrasi ekstrak teh hijau vs serapan DPPH dan % inhibisi pada pengukuran batas deteksi dan batas kuantifikasi.....	41
Tabel 5.6 Data perolehan kembali (% <i>recovery</i>) EGCG	43
Tabel 5.7 Data presisi keterulangan larutan ekstrak teh hijau	44
Tabel 5.8 Data hasil uji aktivitas antioksidan EGCG	44
Tabel 5.9 Data hasil uji aktivitas antioksidan vitamin C	45
Tabel 5.10 Data hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak teh hijau.....	46
Tabel 5.11 Nilai IC ₅₀ EGCG dan vitamin C	46
Tabel 5.12 Nilai IC ₅₀ vitamin C dan ekstrak teh hijau.....	47

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Reaksi <i>catechin/epicatechin</i> dengan DPPH.....	8
Gambar 2.2 Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh polifenol	10
Gambar 2.3 Senyawa <i>catechin</i> teh hijau.....	11
Gambar 2.4 Produk Kapsul ULTEA®.....	13
Gambar 2.5 Struktur vitamin C.....	13
Gambar 2.6 Mekanisme aktivitas penangkapan radikal bebas oleh vitamin C	14
Gambar 2.7 Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan AH.....	15
Gambar 5.1 Spektra DPPH	34
Gambar 5.2 Profil <i>overlay</i> spektra DPPH 25 ppm dan EGCG 20 ppm.....	35
Gambar 5.3 Profil <i>overlay</i> spektra DPPH 25 ppm dan vitamin C 20 ppm.....	35
Gambar 5.4 Profil <i>overlay</i> spektra DPPH 25 ppm dan ekstrak teh hijau 30 ppm	36
Gambar 5.5 Profil <i>overlay</i> spektra DPPH (a), DPPH+ekstrak teh hijau (b), DPPH+vitamin C (c) dan DPPH+EGCG (d).....	37
Gambar 5.6 Kurva hubungan kadar EGCG dengan serapan DPPH.....	38
Gambar 5.7 Kurva hubungan kadar EGCG dengan %inhibisi terhadap serapan DPPH.....	38
Gambar 5.8 Kurva hubungan kadar vitamin C dengan serapan DPPH.....	39
Gambar 5.9 Kurva hubungan kadar vitamin C dengan % inhibisi terhadap serapan DPPH	39
Gambar 5.10 Kurva hubungan kadar ekstrak teh hijau dengan serapan DPPH	40
Gambar 5.11 Kurva hubungan kadar ekstrak teh hijau dengan % inhibisi terhadap serapan DPPH.....	41
Gambar 5.12 Kurva penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi (kadar vs serapan DPPH).....	42
Gambar 5.13 Kurva penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi (kadar vs %inhibisi)	42

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Hasil Keseragaman Bobot Kapsul Ekstrak Teh Hijau	57
Lampiran 2 Perhitungan Linieritas	59
Lampiran 3 Perhitungan Batas Deteksi Dan Batas Kuantitasi	65
Lampiran 4 Perhitungan Akurasi.....	66
Lampiran 5 Perhitungan Presisi	68
Lampiran 6 Perhitungan IC_{50} EGCG	69
Lampiran 7 Perhitungan IC_{50} Vitamin C	70
Lampiran 8 Perhitungan IC_{50} Ekstrak Teh Hijau.....	71
Lampiran 9 Hasil Uji Independent Sample t – Test IC_{50} EGCG dan Vitamin C	72
Lampiran 10 Hasil Uji Independent Sample t – Test IC_{50} Vitamin C Dan Ekstrak Teh Hijau.....	73

DAFTAR SINGKATAN

ABTS	: <i>2,2-Azinobis-(3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid</i>
AAPH	: <i>2,2'-azobis- (2-amidino-propana) dihidroklorida</i>
BHA	: <i>butylated hydroxy anisole</i>
BHT	: <i>butylated hydroxy toluene</i>
CTC	: <i>crushing-tearing-curling</i>
DPPH	: <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
EC	: <i>(-)-epicatechin</i>
ECG	: <i>(-)-epicatechin-3-gallate</i>
EGC	: <i>(-)-epigallocatechin</i>
EGCG	: <i>(-)-epigallocatechin-3-gallate</i>
EPR	: <i>Electron Paramagnetic Resonance</i>
FRAP	: <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GC	: <i>(+)-galocatechin</i>
GPx	: <i>Glutation Peroksidase</i>
IC ₅₀	: <i>Inhibitory Concetration 50</i>
KV	: <i>Koefisien Variasi</i>
LOD	: <i>Limit Of Detection</i>
LOQ	: <i>Limit Of Quantification</i>
ORAC	: <i>Oxygen Radical Absorption Capacity</i>
PG	: <i>propyl gallate</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RSD	: <i>Relative Standard Deviation</i>
TBHQ	: <i>tertiary butyl hydroquinone</i>
TPTZ	: <i>2,4,6-tri-(2-pyridyl)-1,3,5-triazin</i>
SOD	: <i>Superoksida Dismutase</i>
UV-Vis	: <i>Ultra Violet – Visible</i>