

### 3. PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN TIGA METODE PENGUKURAN

#### 3.1. PENGUJIAN ANTIOKSIDAN DENGAN METODE DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil)

Reaksi dari DPPH ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning yang diakibatkan oleh putusya ikatan rangkap DPPH, sehingga satu elektron yang lepas tersebut ditangkap oleh senyawa antioksidan (Hanani *et al.*, 2005).

Penelitian yang dilakukan oleh Zhang *et al.*, (2019) yang mengukur senyawa antioksidan  $\alpha$ -tocopherol. Konsentrasi  $\alpha$ -tocopherol yang digunakan  $500\mu M$ , kondisi parameter yang dilakukan dalam penelitian yaitu pelarut etanol, waktu inkubasi 30 menit serta panjang gelombang pengujian 517 nm. Berdasarkan penggunaan parameter tersebut, diketahui aktivitas antioksidan  $\alpha$ -tocopherol sebesar  $90,37\% \pm 0,04\%$ . Namun di dalam literatur, tidak disebutkan besar suhu inkubasi yang digunakan.

Penelitian lain dilakukan oleh Jack dan Rohman (2005) terhadap senyawa antioksidan Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) yang dijadikan sebagai pembanding (kontrol) dari sampel daun kemuning. Dalam penelitiannya digunakan vitamin E konsentrasi 1%, kondisi parameter yang digunakan yaitu panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan pada sampel ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  dengan hasil sebesar  $8,27\mu g/mL$ . Dalam penelitian tersebut, tidak disebutkan jenis pelarut yang digunakan serta waktu inkubasi yang diperlukan.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Nervita *et al.* (2012) dilaporkan bahwa Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) dijadikan sebagai bahan pembanding (kontrol) aktivitas antioksidan dari sampel ekstrak daun manggis. Dalam penelitiannya, digunakan beberapa konsentrasi vitamin E yaitu 3,96 ppm, 7,92 ppm, 11,87 ppm, 15,84 ppm, 19,8 ppm. Kondisi parameter dalam penelitian menggunakan pelarut metanol, waktu inkubasi selama 30 menit, pengujian dengan panjang gelombang 515,6 nm. Hasil penelitian antioksidan ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$ , diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar  $2,146\mu g/mL$ .

Hasana *et al.* (2017) melaporkan penelitiannya mengenai pengukuran senyawa antioksidan  $\alpha$ -tocopherol yang dijadikan sebagai bahan pembanding (kontrol) pengujian antioksidan sampel daun kelor. Penelitian menggunakan tiga konsentrasi sampel vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) diantaranya adalah 2 ppm, 4 ppm dan 6 ppm. Kondisi parameter yang digunakan adalah pelarut etanol p.a, waktu inkubasi selama 10 sampai 20 menit yang ditentukan berdasarkan hasil penentuan *operating time*, diuji dengan panjang gelombang 514 nm. Berdasarkan kondisi parameter tersebut, diketahui bahwa % inhibisi dari masing-masing konsentrasi 2 ppm, 4 ppm dan 6 ppm yakni 39,4%, 45,11%, dan 54,92%, dilakukan pengukuran lebih lanjut untuk mengetahui efektivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$ , dalam pengujian diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 4,91  $\mu g/mL$ .

Hasil pengujian senyawa antioksidan  $\alpha$ -tocopherol yang diperoleh dari ekstrak minyak Black Cumin (*Nigella sativa L.*), Coriander (*Coriandrum sativum L.*) dan Niger (*Guizotia abyssinica Cass.*) yang diteliti oleh Ramadan *et al.* (2003) untuk mengetahui ekstrak manakah yang memiliki aktivitas antioksidan tocopherol paling baik. Kondisi parameter yang digunakan sama untuk ketiga sampel yakni dengan pelarut toluene, waktu inkubasi 1, 30 dan 60 menit dan pengukuran dengan panjang gelombang 515 nm. Berdasarkan ketiga sampel yang diamati, perolehan % inhibisi tertinggi terdapat pada minyak biji coriander yaitu sebesar 35%, serta yang terendah pada minyak biji niger yang hanya mencapai 14,0%. Sementara itu antioksidan pada minyak biji *black cumin* diperoleh hasil 25,1%. Sementara itu, di dalam penelitian tersebut tidak dijelaskan lebih lanjut mengenai efektivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$ , serta tidak disebutkan besar suhu inkubasi yang digunakan.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Kusmiati *et al* (2018) yang melakukan pengukuran terhadap senyawa antioksidan bentuk  $\alpha$ -tocopherol yang digunakan sebagai pembanding (kontrol) dari ekstrak bunga kenikir dengan metode DPPH. Konsentrasi sampel Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) yang digunakan yakni 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Kondisi parameter pengujian yang digunakan yaitu pelarut metanol p.a, waktu inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C, diukur dengan panjang gelombang 515 nm. Dengan kondisi parameter tersebut, diketahui bahwa % inhibisi antioksidan vitamin E dengan konsentrasi 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm berturut-turut adalah 47,11%, 18,83%, 25,50%, dan 33,83%. Dilakukan pengukuran lebih lanjut untuk mengetahui efektivitas

antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$ , perolehan nilai  $IC_{50}$  dalam pengujian sebesar  $4,684 \mu g/mL$ .

Haryoto dan Frista (2019) melakukan pengukuran terhadap senyawa antioksidan  $\alpha$ -tocopherol yang dijadikan sebagai kontrol positif pada pengujian antioksidan sampel daun mangrove (*Rhizophora apiculata*) menggunakan metode DPPH. Dalam penelitian ini, menggunakan Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) konsentrasi 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm dan 14 ppm. Kondisi parameter pada pengujian ini adalah menggunakan pelarut etanol, pengujian dilakukan pada panjang gelombang 516,1 nm. Dalam penelitiannya dijelaskan bahwa penggunaan etanol sebagai pelarut dikarenakan etanol memiliki kemampuan larut yang lebih baik di dalam DPPH. Hasil penelitian antioksidan vitamin E ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  yakni sebesar  $9,36 \mu g/mL$ . Penggunaan waktu dan suhu inkubasi tidak disebutkan di dalam penelitian tersebut.

Penelitian yang dilakukan oleh Marinova dan Batchvarov (2011) melaporkan bahwa senyawa antioksidan yang terukur yakni dalam bentuk  $\alpha$ -tocopherol yang diuji menggunakan metode DPPH. Dalam pengujiannya, menggunakan dua jenis pelarut yaitu metanol dan etanol untuk mengetahui pula jenis pelarut yang lebih baik.  $\alpha$ -tocopherol yang menggunakan pelarut metanol di inkubasi selama 20 menit dan di uji dengan panjang gelombang 515 nm. Sedangkan,  $\alpha$ -tocopherol yang memakai pelarut etanol di inkubasi selama 30 menit dan di uji dengan panjang gelombang 517 nm. Hasil pengujian antioksidan ditunjukkan dengan parameter  $IC_{50}$ . Berdasarkan nilai  $IC_{50}$ , sampel  $\alpha$ -tocopherol dengan pelarut etanol memiliki nilai  $IC_{50}$  yang lebih rendah yaitu  $29,33 \mu g/mL$  yang mengindikasikan bahwa antioksidan vitamin E lebih kuat dan lebih larut dalam pelarut etanol, dibandingkan dengan  $\alpha$ -tocopherol yang menggunakan pelarut metanol dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $40,30 \mu g/mL$ .

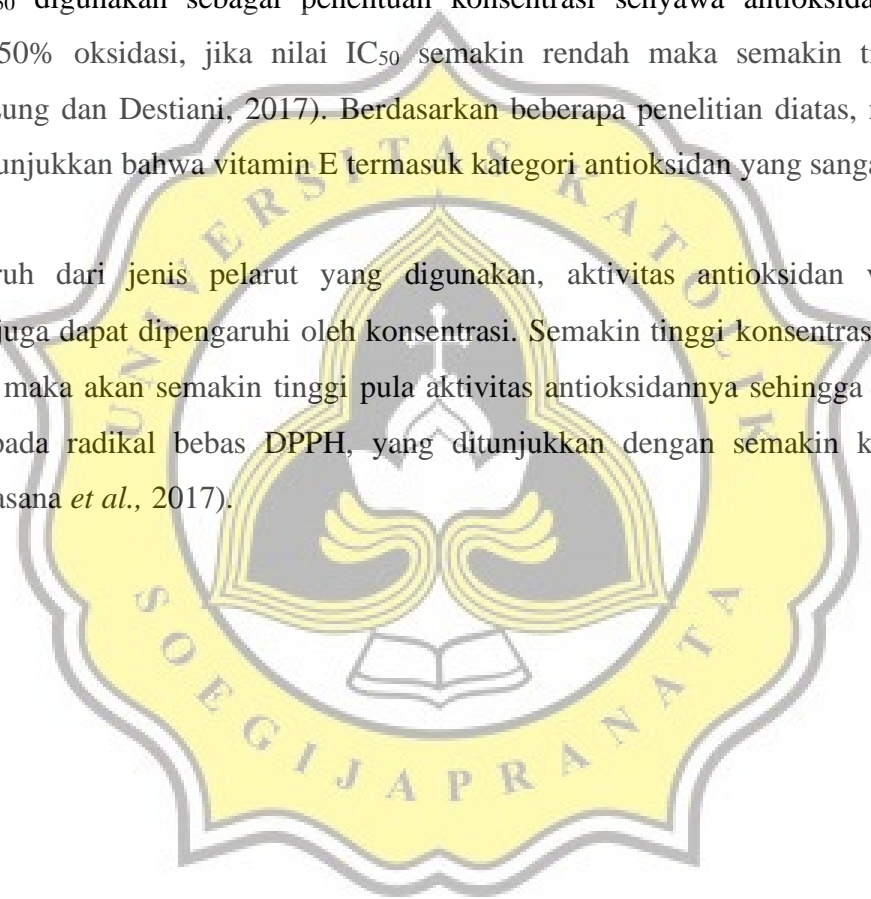
Dari hasil pengujian tersebut dapat diketahui bahwa pelarut juga berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan, dimana penggunaan pelarut etanol memperoleh hasil yang lebih presisi dan menghasilkan persen (%) inhibisi yang lebih tinggi, sehingga dapat mempengaruhi nilai  $IC_{50}$ .

Kojong *et al.*, (2010) meneliti vitamin E yang digunakan sebagai pembanding antioksidan pada tanaman Tuis (*Nicolaia speciosa*). Konsentrasi vitamin E yang digunakan diantaranya 25 ppm, 50

ppm, 75 ppm, 125 ppm dan 150 ppm. Kondisi parameter yang digunakan dalam pengujian yaitu menggunakan pelarut etanol, waktu inkubasi selama 30 menit, di uji dengan panjang gelombang 517 nm. Hasil penelitian menunjukkan nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh adalah 1,31  $\mu\text{g/mL}$ .

Molyneux (2004) menjelaskan jika efektivitas antioksidan dengan parameter  $IC_{50}$  dibagi menjadi lima kategori yaitu jika  $<50 \text{ g/ml}$  (sangat kuat), 500 sampai 100  $\mu\text{g/ml}$  (kuat), 100 sampai 150  $\mu\text{g/ml}$  (sedang), 150 sampai 200  $\mu\text{g/ml}$  (lemah), serta jika  $>200 \mu\text{g/ml}$  (sangat lemah). Parameter  $IC_{50}$  digunakan sebagai penentuan konsentrasi senyawa antioksidan yang dapat menghambat 50% oksidasi, jika nilai  $IC_{50}$  semakin rendah maka semakin tinggi aktivitas antioksidan (Lung dan Destiani, 2017). Berdasarkan beberapa penelitian diatas, nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh menunjukkan bahwa vitamin E termasuk kategori antioksidan yang sangat kuat

Selain pengaruh dari jenis pelarut yang digunakan, aktivitas antioksidan vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) juga dapat dipengaruhi oleh konsentrasi. Semakin tinggi konsentrasi vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), maka akan semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya sehingga semakin besar daya redam pada radikal bebas DPPH, yang ditunjukkan dengan semakin kecilnya angka absorbansi (Hasana *et al.*, 2017).



Tabel 2. Pengujian Senyawa Antioksidan Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) dengan Metode DPPH

No.	Sampel Terukur	Parameter				Bentuk Penyajian Data	Daya Antioksidan	Referensi
		Jenis <i>Solvent</i>	Panjang Gelombang (nm)	Waktu Inkubasi (menit)	Suhu ( $^{\circ}$ C)			
1.	Vitamin E murni 500 $\mu$ M	Ethanol	517	30	-	Rata-rata % inhibisi $\pm$ SD	90,37% $\pm$ 0,04%	(Zhang <i>et al.</i> , 2019).
2.	Vitamin E murni 1%	-	517	0	-	IC <sub>50</sub>	8,27 $\mu$ g/ml	(Jack dan Rohman, 2005).
3.	Ekstrak biji bunga matahari 3,96 ppm Ekstrak biji bunga matahari 7,92 ppm Ekstrak biji bunga matahari 11,87 ppm Ekstrak biji bunga matahari 15,84 ppm Ekstrak biji bunga matahari 19,8 ppm	Methanol	515,6	30	-	IC <sub>50</sub>	2,146 $\mu$ g/ml	(Nervita dan Diniatik, 2012)
4.	Vitamin E murni 2 ppm Vitamin E murni 4 ppm	Ethanol p.a	514	10-20	-	IC <sub>50</sub>	4,91 8,27 $\mu$ g/ml	(Hasana <i>et al.</i> , 2017)

	Vitamin E murni 6 ppm							
5.	Ekstrak minyak biji coriander 100 $\mu$ l						35%	
	Ekstrak minyak biji black cumin 100 $\mu$ l	Toluena	515	1,30,60	-	% antioksidan	25,10%	(Ramadan <i>et al.</i> , 2003)
	Ekstrak minyak biji niger 100 $\mu$ l						14,00%	
6.	Vitamin E murni 4 ppm						47,11%	
	Vitamin E murni 6 ppm	Metanol p.a	515	30	37	% antioksidan	55,59%	(Kusmiati <i>et al.</i> , 2018)
	Vitamin E murni 8 ppm						64,25%	
	Vitamin E murni 10 ppm						72,92%	
						IC <sub>50</sub>	4,684 $\mu$ g/ml	
7.	Vitamin E murni 6 ppm							
	Vitamin E murni 8 ppm							
	Vitamin E murni 10 ppm	Etanol	516,1	-	-	IC <sub>50</sub>	9,36 $\mu$ g/ml	(Haryoto dan Frista, 2019)
	Vitamin E murni 12 ppm							
8.	Vitamin E murni	Ethanol	515	20	-	IC <sub>50</sub>	29,33 $\mu$ g/mL	(Marinova dan Batchvarov, 2011)
	Vitamin E murni	Methanol	517	30	-	IC <sub>50</sub>	40,30 $\mu$ g/mL.	(Marinova dan Batchvarov, 2011)

---

9.	Vitamin E murni 25 ppm							
	Vitamin E murni 50 ppm							
	Vitamin E murni 75 ppm							
	Vitamin E murni 100 ppm	Ethanol	517	30	-	IC <sub>50</sub>	1,31 µg/mL	(Kojong <i>et al.</i> , 2010)
	Vitamin E murni 125 ppm							
	Vitamin E murni 150 ppm							

---

Keterangan :

- : Data tidak tercantum dalam literatur





### 3.2. PENGUJIAN ANTIOKSIDAN DENGAN METODE FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Analisis antioksidan dengan metode FRAP yaitu dengan menghitung berapa banyak kandungan senyawa antioksidan aktif di dalam bahan, sehingga banyak digunakan untuk mengukur antioksidan pada tanaman dan buah-buahan (Prior *et al.*, 2005). Pengujian antioksidan dengan metode FRAP umumnya menggunakan panjang gelombang 593 nm (Szöllösi dan Varga, 2002; Kusmiati *et al.*, 2018; Ou *et al.*, 2002; Benzie dan Strain, 1996).

Penelitian yang dilakukan oleh Kusmiati *et al* (2018) melaporkan antioksidan yang terukur adalah bentuk  $\alpha$ -tocopherol yang digunakan sebagai pembanding sampel ekstrak lutein bunga kenikir. Dalam pengukuran tersebut, konsentrasi vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) yang digunakan diantaranya 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm. Kondisi parameter yang digunakan yaitu panjang gelombang 595 nm. Hasil pengujian menunjukkan bahwa total antioksidan tertinggi terdapat pada vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) konsentrasi 10 ppm sebesar 33,83  $\mu\text{m}/\text{Fe}(\text{II})/\text{g}$ , sedangkan total antioksidan terendah terdapat pada vitamin E konsentrasi 4 ppm yakni 12,16  $\mu\text{m}/\text{Fe}(\text{II})/\text{g}$ . Sementara itu untuk vitamin E konsentrasi 6 ppm dan 8 ppm, total antioksidan yang diperoleh masing-masing adalah 18,83  $\mu\text{m}/\text{Fe}(\text{II})/\text{g}$  dan 25,50  $\mu\text{m}/\text{Fe}(\text{II})/\text{g}$ .

Haryoto dan Frista (2019) melaporkan penelitiannya terhadap hasil pengukuran antioksidan  $\alpha$ -tocopherol yang juga sebagai kontrol positif dari sampel daun mangrove (*Rhizophora apiculata*) dengan metode FRAP. Di dalam penelitiannya, digunakan lima konsentrasi vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) yaitu 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm dan 14 ppm. Kondisi parameter sewaktu pengujian adalah waktu inkubasi 95 menit, pengujian dengan panjang gelombang 596,2 nm. Hasil penelitian ditunjukkan dengan nilai  $\text{IC}_{50}$ , perolehan nilai  $\text{IC}_{50}$  yaitu 9,41  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sebab nilai  $\text{IC}_{50} < 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ , dengan demikian diketahui bahwa aktivitas antioksidan pada vitamin E sangat kuat.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Setiawan *et al* (2018), terhadap turunan dari vitamin E yang disebut sebagai Trolox, yang menjadi pembanding antioksidan pada sampel kayu secang. Konsentrasi Trolox yang digunakan yaitu 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm. Kondisi parameter yang digunakan dalam pengujian adalah waktu inkubasi 10 menit pada suhu 37°C, diukur menggunakan panjang gelombang 594 nm. Hasil pengujian antioksidan dinyatakan dengan



nilai  $IC_{50}$ , perolehan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $11,04 \mu g/mL$ . Sehingga Trolox yang merupakan turunan vitamin E ini tergolong sebagai antioksidan sangat kuat karena nilai  $IC_{50}$  kurang dari  $50 \mu g/mL$ .

Marfil *et al* (2011) melaporkan penelitiannya mengenai senyawa antioksidan yang terukur dalam bentuk  $\alpha$ -tocopherol yang diperoleh dari ekstrak *virgin argan oil*. Kondisi parameter penelitian adalah waktu inkubasi 30 menit pada suhu  $37^{\circ}C$ , diuji dengan panjang gelombang 595 nm. Diketahui total antioksidan pada sampel adalah  $1.14 \pm 0.198$  mmol equivalents of Trolox/kg of oil.

Penelitian yang dilakukan oleh Chelghoum *et al* (2020) mengukur senyawa antioksidan  $\alpha$ -tocopherol yang diperoleh dari ekstrak *crude oil* dengan metode FRAP. Kondisi parameter yang dilakukan dengan menginkubasi sampel selama 7 menit di suhu ruang, kemudian dilakukan pengukuran dengan panjang gelombang 596 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa total antioksidan pada sampel adalah  $17.11 \pm 0.215 \mu M$   $\alpha$ -tocopherol equivalents/g dry weight.

*Literature* yang ditulis oleh Pellegrini *et al* (2003) melaporkan di dalam penelitiannya bahwa vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) bersifat non-polar yang dapat ditemukan dari bahan seperti *corn oil*, *extra virgin oil*, *peanut oil*, *soybean oil*, *sunflower oil* dan jenis *oil* lainnya, dimana untuk melarutkan bahan tersebut digunakan tipe pelarut non-polar, di dalam penelitian ini digunakan n-hexana sebagai *solvent*, sehingga metode FRAP dikatakan kurang sesuai untuk menguji sampel berbahan non-polar

Tabel 3. Pengujian Senyawa Antioksidan Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) dengan Metode FRAP

No.	Sampel Terukur	Parameter			Daya Antioksidan	Referensi
		Waktu Inkubasi	Suhu (°C)	Panjang Gelombang		
1.	Vitamin E murni 4 ppm	-	-	595 nm	12,16 $\mu\text{m}/\text{Fe}(\text{II})/\text{g}$ .	(Kusmiati <i>et al.</i> , 2018)
	Vitamin E murni 6 ppm				18,83 $\mu\text{m}/\text{Fe}(\text{II})/\text{g}$ .	
	Vitamin E murni 8 ppm				25,50 $\mu\text{m}/\text{Fe}(\text{II})/\text{g}$ .	
	Vitamin E murni 10 ppm				33,83 $\mu\text{m}/\text{Fe}(\text{II})/\text{g}$ .	
2.	Vitamin E murni 6 ppm	95 menit	-	596,2 nm	9,41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .	(Haryoto dan Frista, 2019)
	Vitamin E murni 8 ppm					
	Vitamin E murni 10 ppm					
	Vitamin E murni 12 ppm					
	Vitamin E murni 14 ppm					
3.	Trolox 20 ppm	10 menit	37	594 nm	11,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .	(Setiawan <i>et al.</i> , 2018)
	Trolox 40 ppm					
	Trolox 60 ppm					
	Trolox 80 ppm					
	Trolox 100 ppm					

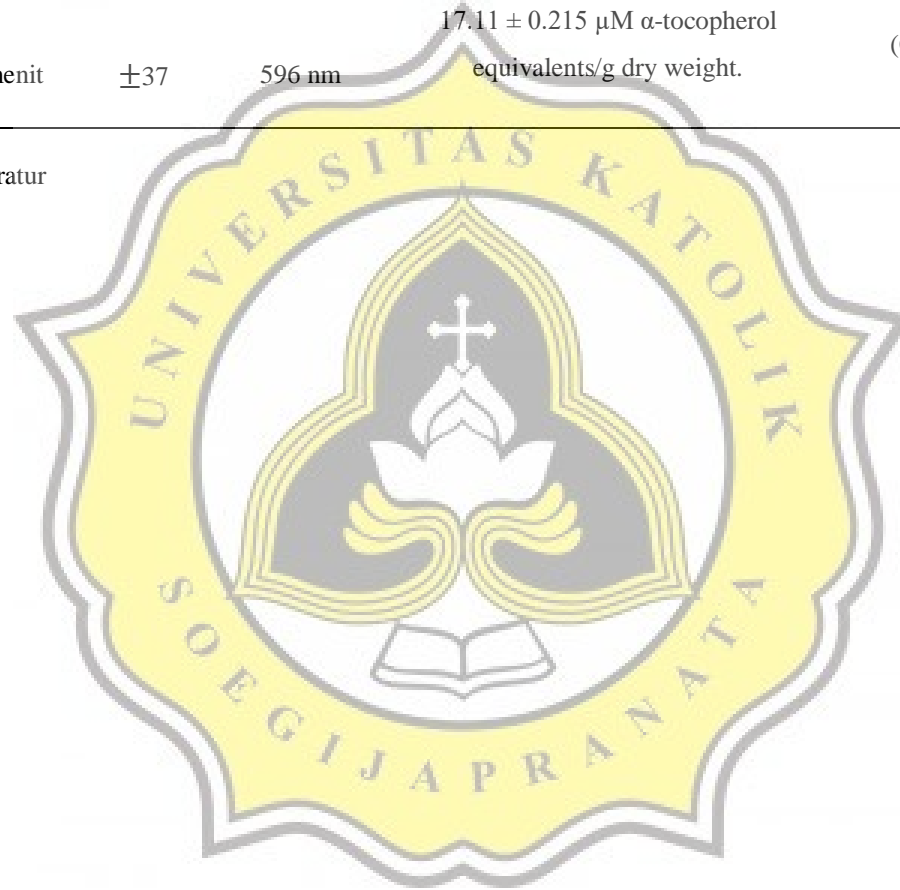
---

4.	Ekstrak Virgin argan oil	30 menit	37	595 nm	$1.14 \pm 0.198$ mmol equivalents of Trolox/kg of oil.	(Marfil <i>et al.</i> , 2011)
5.	Ekstrak Crude oil	7 menit	$\pm 37$	596 nm	$17.11 \pm 0.215$ $\mu$ M $\alpha$ -tocopherol equivalents/g dry weight.	(Chelghoum <i>et al.</i> , 2020)

---

Keterangan :

- : Data tidak tercantum dalam literatur



### 3.3. PENGUJIAN ANTIOKSIDAN DENGAN METODE FOSFOMOLYBDATE

Pengukuran sampel dengan metode fosfomolybdate dilakukan dengan menambahkan reagen yang diinkubasi pada suhu 95°C selama 90 sampai 95 menit dengan menggunakan panjang gelombang 695 nm, reaksi yang terjadi ditandai dengan terbentuknya warna hijau-kebiruan (Warsi dan Puspitasari, 2017; Prieto *et al.*, 1999; Nagarajan *et al.*, 2008; Dheeba *et al.*, 2010).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Prieto *et al* (1999), yang melaporkan bahwa senyawa antioksidan pada sampel minyak biji jagung dan minyak biji kedelai terukur dalam bentuk vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). Kondisi parameter yang dilakukan saat pengujian yaitu waktu inkubasi 90 menit pada suhu 37°C, sampel diukur menggunakan panjang gelombang 695 nm. Hasil menunjukkan bahwa minyak biji jagung memiliki kemampuan antioksidan lebih tinggi sebesar  $378.8 \pm 20.0$  nmol  $\alpha$ -tocopherol /g dibandingkan dengan minyak biji kedelai yang hanya mencapai  $248 \pm 16.6$  nmol  $\alpha$ -tocopherol /g.

Nagarajan *et al* (2008) melaporkan pengujiannya terhadap ekstrak daun dan kulit batang dari tanaman *Wrightia tomentosa*, bentuk senyawa antioksidan yang terukur dalam sampel tersebut adalah  $\alpha$ -tocopherol, pengujian menggunakan metode Phospomolybdate. Kondisi parameter sewaktu penelitian adalah waktu inkubasi 90 menit pada suhu 95°C, kemudian didinginkan pada suhu ruang lalu di absorbansi dengan panjang gelombang 695 nm. Berdasarkan hasil pengujian diketahui bahwa kemampuan antioksidan pada ekstrak daun *Wrightia tomentosa* adalah  $4,2 \pm 0,03$   $\mu$ g  $\alpha$ -tocopherol equivalent/ mg, sedangkan ekstrak kulit *Wrightia tomentosa* memiliki kemampuan antioksidan yang lebih tinggi yakni sebesar  $8.3 \pm 0.33$   $\mu$ g  $\alpha$ -tocopherol equivalent/ mg.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Yolanda (2015) yang meneliti antioksidan lada hitam diekstrak dengan aquades, etanol, kloroform, etil asetat, minyak atsiri, piperin. Dalam penelitian ini, BHT (*butylated hydroxytoluene*) sebagai kontrol positif sekaligus pembanding. BHT merupakan jenis bahan tambahan pangan yang sejenis dengan vitamin E serta mengandung antioksidan. Hasil penelitian aktivitas antioksidan dinyatakan dengan mmol  $\alpha$ -tocopherol ekuivalen/gr, berdasarkan data penelitian dapat dilihat bahwa minyak atsiri lada hitam menunjukkan kemampuan antioksidan tertinggi yakni sebesar 139,0485 mmol  $\alpha$ -tocopherol ekuivalen/gr sampel, kemudian diikuti

dengan ekstrak etil asetat yang mencapai 124,0788 mmol  $\alpha$ -tocopherol ekuivalen/gr sampel. Keduanya menunjukkan kemampuan antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak aquades, etanol, kloroform, dan piperin, Sementara itu, BHT yang berperan sebagai kontrol menunjukkan kemampuan antioksidan jauh lebih rendah (30,6242 mmol  $\alpha$ -tocopherol ekuivalen/gr sampel) dibandingkan dengan minyak atsiri lada hitam dan ekstrak etil asetat lada hitam. Dalam penelitian tersebut dijelaskan bahwa rendahnya kemampuan antioksidan pada BHT disebabkan karena senyawa fenolik, dimana BHT bukan termasuk golongan polifenol melainkan monofenol sehingga hanya satu gugus OH yang terlibat didalam reaksi reduksi-oksidasi (Huber *et al.*, 2009; Yolanda, 2015).

Borah *et al.*, (2014) melakukan penelitian terhadap kemampuan antioksidan dari senyawa antioksidan  $\alpha$ -tocopherol yang diekstrak dari tanaman *Oxalis corniculata L* menggunakan pelarut hexana dengan metode Phospomolybdate. Kondisi parameter yang dilakukan dengan waktu inkubasi 90 menit pada suhu 37°C, pengujian dilakukan dengan panjang gelombang 695 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan antioksidan pada vitamin E sebesar 137.36 mg/g dry wt.

Sethiya *et al.* (2014) melaporkan penelitiannya terhadap vitamin E murni dengan konsentrasi 10; 20; 30; 40; 50  $\mu$ g/ml. Kondisi parameter yang dilakukan dalam penelitian dengan waktu inkubasi 90 menit pada suhu 37°C, pengujian dilakukan dengan panjang gelombang 695 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan antioksidan vitamin E pada masing-masing konsentrasi adalah 35%; 75%; 90%; 125%; 140%.

Tabel 4. Pengujian Senyawa Antioksidan Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) dengan Metode Phosphomolybdate

No.	Sampel Terukur	Parameter			Daya Antioksidan	Referensi
		Waktu Inkubasi (menit)	Suhu	Panjang Gelombang		
1.	Minyak biji jagung	90	37°C	695 nm	378.8±20.0 nmol $\alpha$ -tocopherol /g	(Prieto <i>et al.</i> , 1999)
	Minyak biji kedelai				248±16.6 nmol $\alpha$ -tocopherol /g.	
2.	Ekstrak metanol daun <i>Wrightia tomentosa</i>	90	95°C	695 nm	4,2±0,03 $\mu$ g $\alpha$ -tocopherol equivalent/ mg	(Nagarajan <i>et al.</i> , 2018)
	Ekstrak etanol kulit batang <i>Wrightia tomentosa</i>				8,3±0,33 $\mu$ g $\alpha$ -tocopherol equivalent/ mg	
3.	Ekstrak aquades lada hitam	90	95°C	695 nm	20,6848 mmol $\alpha$ -tocopherol ekuivalen/gr sampel	(Yolanda, 2015)
	Ekstrak etanol lada hitam				119,5939 mmol $\alpha$ -tocopherol ekuivalen/gr sampel	
	Ekstrak kloroform lada hitam				113,5939 mmol $\alpha$ -tocopherol ekuivalen/gr sampel	
	Ekstrak etil asetat lada hitam				124,0788 mmol $\alpha$ -tocopherol ekuivalen/gr sampel	
	Ekstrak minyak atsiri lada hitam				139,0485 mmol $\alpha$ -tocopherol ekuivalen/gr sampel	
	Piperin				91,5939 mmol $\alpha$ -tocopherol ekuivalen/gr sampel	
	BHT				30,6242 mmol $\alpha$ -tocopherol ekuivalen/gr sampel	
4.	Ekstrak <i>Oxalis corniculata L</i>	90	37°C	695 nm	137.36 mg/g dry wt.	(Borah <i>et al.</i> , 2014)
5.	Vitamin E murni 10; 20; 30; 40; 50 $\mu$ g/ml	90	37°C	695 nm	35; 75; 90;125; 140 %	(Sethiya <i>et al.</i> , 2014)

Tabel 5. Perbandingan Metode DPPH, FRAP dan Phosphomolybdate

No.	Metode	Pelarut	Antioksidan Terukur	Satuan	Faktor Pembatas
1	DPPH	Etanol		% scavenging capacity	Pelarut Konsentrasi sampel Waktu inkubasi Cahaya
		Methanol	Tocopherol	$\mu\text{g/ml}$	
		Toluena		$\mu\text{m/Fe(II)/g}$	
2.	FRAP	Reagen FRAP	Tocopherol	mmol equivalents of Trolox/kg of oil. $\mu\text{M } \alpha\text{-tocopherol equivalents/g dry weight.}$	Pelarut pH Suhu inkubasi Waktu inkubasi
		Reagen Phosphomolybdenum		$\mu\text{g } \alpha\text{-tocopherol equivalent/ mg}$	
		Etanol		$\mu\text{g } \alpha\text{-tocopherol equivalent/ mg}$	
3.	Phosphomolybdate	Methanol	Tocopherol	mmol $\alpha\text{-tocopherol ekuivalen/gr sampel}$	Suhu inkubasi Waktu inkubasi
		Hexana		$\text{mg/g dry wt.}$	