

3. PENGUKURAN NILAI AKTIVITAS DAN TOTAL ANTIOKSIDAN PADA ANTIOKSIDAN POLAR

NILAI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN POLAR

METODE DPPH (2,2-diphenyl picrylhydrazyl)

Tabel 2. Uji Aktivitas Antioksidan Polar dengan Metode DPPH

No	Sampel	Senyawa Antioksidan	Parameter			Daya Antioksidan	Referensi	
			Pelarut	Panjang Gelombang (nm)	Waktu Inkubasi (menit)			Suhu Inkubasi (°C)
1	Vitamin C murni (1, 2, 3, 4, 5 ppm)	Vitamin C	metanol	515	30	suhu ruang	2,72 ppm	(Kuntorini, 2013).
2	Vitamin C murni (2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4 ppm)	Vitamin C	metanol	515	30	-	3 ppm	(Jumaetri, 2015).
3	Vitamin C murni (2, 3, 4, 5, 6 ppm)	Vitamin C	etanol	516	30	-	3,8729 ppm	(Amin, 2015).
4	Vitamin C murni (2, 3, 4, 5, 6 ppm)	Vitamin C	metanol	515	30	-	2,97125 µg/mL.	(Ridho, 2013).
5	c	Vitamin C	metanol	515,5	30	suhu kamar	2,973 µg/mL.	(Budilaksono, 2014).
6	Ekstrak daun kemangi (2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ppm)	Vitamin C	metanol	514	30	-	52,68 µg/mL.	(Erviana, 2016).

7	Vitamin C (6, 8, 10, 12, 14 µg/mL)	Vitamin C	metanol	516	-	suhu ruang	9,627 µg/mL.	(Azizah, 2017).
8	Vitamin C (10, 20, 30, 40, 50 mg/ml)	Vitamin C	etanol	517	30	-	30,511 µg/mL.	(Prasetyo, 2016).
9	Asam askorbat (20, 40, 60, 80, 100 ppm)	Vitamin C	metanol	518	30	-	10,2077699 µg/mL.	(Sari, 2013).
10	Vitamin C (8, 16. 32, 64. 128 ppm)	Vitamin C	metanol	515,5	30	37°C	44,115 % 48,675 % 52,869 % 60,148 % 75,956 %	(Irnawati, 2017).
11	200 mg Ekstrak Daun Gaharu	Allamin	metanol	517	60	-	111,31 %	(Mega, 2010)
12	200 mg Ekstrak Daun Gaharu	Se	metanol	516	-	-	111,31 %	(Mega, 2010)
13	Alga Coklat (<i>S. polycystum</i>) (250, 500, 750, 1000 ppm)	Cu, Fe	etanol	515	60	-	3,4 mg/L	(Diachanty, 2017)
14	Ekstrak Buah Tomat (10, 20, 30, 40, 50 ppm)	Zn, Cu, Fe	etanol	515	-	-	114 ppm	(Setyawati, 2019)
15	Akar Alang-alang	Polifenol	metanol	-	30	-	0,32 mg/ml	(Serlahwaty, 2015)
16	Ekstrak makisa ungu dan markisa kuning	Polifenol	metanol	515	30	-	Markisa ungu = 2,74 mg/L Markisa kuning = 5,26 mg/L	(Munda,, 2012)

Macam-macam pengujian nilai aktivitas antioksidan pada antioksidan polar dengan metode DPPH dapat dilihat pada Tabel 2. Dapat dilihat bahwa terdapat berbagai macam sampel yang digunakan. Sampel-sampel tersebut berupa bahan yang mengandung senyawa antioksidan polar baik bahan murni ataupun hasil ekstrak dari bahan lain. Dapat dilihat juga sampel-sampel yang digunakan memiliki konsentrasi yang bermacam-macam. Ekstrak bahan yang digunakan pada beberapa penelitian diatas adalah ekstrak daun kemangi, daun gaharu, alga coklat (*S. polycystum*), buah tomat, akar alang-alang, serta buah markisa ungu dan markisa kuning.

DPPH merupakan metode sederhana untuk evaluasi aktivitas antiradikal bebas (Amic *et al.*, 2003). Metode DPPH biasanya digunakan untuk menguji senyawa yang berperan sebagai *free radical scavenger* atau donor hidrogen pada proses inkubasi dan berfungsi untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari senyawa tersebut dan mengkuantifikasi jumlah kompleks radikal bebas yang terbentuk. Pada metode ini, warna larutan DPPH akan berubah dari warna ungu menjadi kuning. Hal ini disebabkan karena adanya dekolonisasi oleh antioksidan setara dengan jumlah elektron yang tertangkap.

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel 2., dapat dilihat bahwa nilai aktivitas antioksidan polar yang diuji dengan metode DPPH menghasilkan nilai yang relatif tinggi. Parameter-parameter optimum yang digunakan adalah panjang gelombang 515-520 nm, pelarut etanol dan metanol, suhu inkubasi sebesar 37°C (suhu ruang) dengan waktu inkubasi selama 30 menit.

Berdasarkan tabel 2., terdapat beberapa penelitian yang menggunakan bahan yang sama seperti penelitian yang dilakukan oleh Amin (2015), Ridho (2013) dan Budilaksono (2014), dimana penelitian-penelitian tersebut menggunakan sampel berupa vitamin C murni dengan konsentrasi sebesar 2, 3, 4, 5 dan 6 ppm. Penelitian oleh Amin (2015) menggunakan vitamin C murni sebagai sampel pembanding/kontrol dengan konsentrasi sebesar 2, 3, 4, 5 dan 6 ppm. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut etanol dan panjang gelombang yang digunakan 516 nm, waktu inkubasi selama 30 menit. Dari parameter-parameter tersebut dihasilkan nilai aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar 3,8729 ppm.

Penelitian oleh Ridho (2013) menggunakan sampel vitamin C yang difungsikan sebagai sampel pembanding/kontrol dari sampel ekstrak metanol buah lakum dengan konsentrasi sampel sebesar 2, 3, 4, 5 dan 6 ppm. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut metanol, waktu inkubasi selama 30 menit dan panjang gelombang 515 nm. Penelitian ini menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar 2,97125 $\mu\text{g/mL}$.

Penelitian oleh Budilaksono (2014) menggunakan sampel vitamin C dengan konsentrasi sampel sebesar 2, 3, 4, 5 dan 6 ppm menghasilkan nilai aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar 2,973 $\mu\text{g/mL}$. Sampel vitamin C difungsikan sebagai pembanding/kontrol dari fraksi n-heksana kulit buah naga merah (*Hylocereus lemairei*). Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut berupa metanol, waktu inkubasi selama 30 menit, suhu inkubasi yang digunakan adalah suhu kamar dan panjang gelombang yang digunakan adalah 515,5 nm.

Berdasarkan hasil 3 penelitian pada tabel 2. yang menggunakan sampel vitamin C dengan konsentrasi yang sama, dapat dilihat bahwa penelitian yang menggunakan pelarut metanol menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Metanol umumnya dipilih karena mempunyai tingkat kepolaran yang lebih tinggi karena memiliki atom C yang lebih sedikit. Metanol juga dapat melarutkan senyawa metabolit yang terkandung dalam sampel yang diuji (Maria, 2015). Pelarut ini juga tidak mempengaruhi dalam reaksi antara sampel uji (sebagai antioksidan) dengan larutan DPPH (sebagai radikal) (Molyneux, 2004).

Pada hasil penelitian terhadap antioksidan polar lainnya seperti polifenol dan protein pengikat logam, metode ini juga menunjukkan hasil pengujian yang cukup tinggi. Selain dari pengaruh konsentrasi sampel yang digunakan, parameter yang digunakan pada penelitian juga dapat berpengaruh pada nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Berdasarkan hasil penelitian yang terdapat pada tabel 2., dapat dilihat bahwa sampel yang mengandung polifenol diteliti dengan pelarut berupa metanol. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Baikhakki (2015), dimana senyawa polifenol yang dilarutkan dengan metanol dapat menghasilkan nilai yang lebih baik. Namun hasil yang dihasilkan juga terkandung dari jenis sampel yang digunakan karena perbedaan jenis

sampel juga akan memberikan perbedaan kandungan dan jenis polifenolnya. Perbedaan ini akan mempengaruhi kemampuannya untuk meredam radikal bebas (Baihakki, 2015). Nurul (2020), menjelaskan bahwa pelarut metanol adalah pelarut yang paling efektif dan paling banyak digunakan untuk mengekstraksi bahan yang mengandung senyawa antioksidan pada metode DPPH.

Panjang gelombang optimum yang digunakan pada metode ini adalah antara 515-520 nm. Pelarut yang digunakan adalah etanol dan metanol, dimana pelarut ini merupakan pelarut yang cukup baik dalam menguji sampel antioksidan polar. Etanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan karena memiliki kepolaran yang tinggi. Pelarut etanol memiliki titik didih yang rendah, tidak beracun dan memiliki dua sisi yang terdiri dari gugus -OH yang bersifat polar dan CH_2CH_3 yang bersifat non polar (Aziz, 2014). Etanol berfungsi untuk menghindari senyawa-senyawa lain seperti klorofil yang sebenarnya tidak memiliki aktivitas yang berarti namun berpotensi dapat menimbulkan masalah. Metanol juga merupakan pelarut yang cukup baik karena mempunyai tingkat kepolaran yang lebih tinggi dikarenakan memiliki atom C yang lebih sedikit dibandingkan pelarut lainnya seperti etanol. Metanol juga dapat melarutkan senyawa metabolit yang terkandung dalam sampel yang diuji (Maria, 2015).

Suhu inkubasi optimal yang menghasilkan nilai terbaik pada semua sampel adalah suhu ruang atau sebesar 37°C . Hal ini didukung oleh penelitian oleh Saptari (2019) terhadap sampel fenol dan flavonoid, bahwa suhu ruang adalah suhu yang paling optimal dan menghasilkan nilai aktivitas antoksidan yang paling baik. Jika suhu yang digunakan terlalu tinggi maka akan menyebabkan nilai aktivitas antioksidan yang didapat tidak optimal. Rohdiana (2015) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa ketika proses ekstraksi dilakukan pada suhu diatas 55°C , maka kandungan polifenol pada suatu bahan akan menurun. Ketika suhu yang digunakan terlalu tinggi, maka tidak hanya polifenol yang terekstrak, golongan kimia lain termasuk alkaloid juga akan ikut terekstrak. Hal ini menyebabkan nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan tidak optimal. Selain itu, suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan hilangnya komponen bioaktif karena proses oksidasi, sedangkan suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan komponen bioaktif yang terekstrak dari bahan tidak maksimal dan komponen bioaktif yang diperoleh rendah.

Waktu inkubasi optimal yang menghasilkan hasil terbaik adalah 30 menit. Semakin lama waktu inkubasi maka kontak antara sampel dengan pelarut akan lebih lama sehingga senyawa antioksidan yang dihasilkan dari sampel akan semakin meningkat. Waktu inkubasi berbanding lurus dengan hasil ekstraksi dan jumlah rendemen yang dihasilkan sehingga akan mempengaruhi kadar antioksidan yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan penelitian pada sampel asam askorbat yang dilakukan oleh Julizan (2019) dimana waktu ekstraksi yang optimal terhadap sampel vitamin C adalah selama 30 menit. Hal ini juga didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Mella (2020) dimana waktu inkubasi yang paling optimal untuk digunakan terhadap sampel polifenol adalah selama 30 menit. Peningkatan fenolik terjadi bersamaan dengan peningkatan lama ekstraksi. Jika waktu ekstraksi yang digunakan terlalu lama maka akan terjadi penurunan fenolik karena pelarut dan zat terlarut telah mencapai titik kesetimbangan (Margaretta *et al.*, 2011). Alfianti (2012) menyatakan bahwa kandungan fenolik dan flavonoid yang tinggi juga mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi. Chen *et al.* (2017) menyatakan jika peningkatan kandungan total fenolik dan total flavonoid pada suatu sampel juga akan menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan yang ditandai dengan penurunan nilai IC_{50} .

Secara keseluruhan, dapat diamati bahwa hasil pengujian nilai aktivitas antioksidan polar dengan metode DPPH menghasilkan nilai yang relatif tinggi. Oleh sebab itu metode ini merupakan metode yang paling sering dipilih dan dinilai cukup efektif dalam menganalisa nilai aktivitas antioksidan pada senyawa antioksidan polar seperti vitamin C, protein pengikat logam, dan polifenol. Pada beberapa penelitian diatas, nilai koefisien kolerasi dan koefisien determinasi yang dihasilkan cenderung mendekati 1. Menurut Yefrida (2019), jika nilai r (koefisien kolerasi) dan R^2 (koefisien determinasi) yang dihasilkan mendekati 1 menunjukkan bahwa metode tersebut memiliki linearitas yang baik sehingga sampel yang digunakan cocok dengan metode yang ingin dilakukan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rosahdi (2013) yang menggunakan sampel vitamin C dilakukan uji presisi terhadap metode DPPH. Hasil uji presisi yang didapat ditunjukkan dengan nilai RSD dari pengujian ini memiliki presisi yang baik yaitu simpangan baku $\leq 2\%$. Menurut Harmita (2004), nilai simpangan baku relatif (RSD) $< 2\%$ menunjukkan bahwa metode tersebut memiliki tingkat presisi

yang tinggi dan dapat diterima dengan baik. Berdasarkan hasil uji presisi tersebut, metode DPPH terbukti efisien dan cukup valid untuk menguji nilai aktivitas antioksidan polar.



METODE CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*)

Tabel 3. Uji Aktivitas Antioksidan Polar dengan Metode CUPRAC

No	Sampel	Jenis Antioksidan	Parameter			Daya Antioksidan	Referensi	
			Pelarut	Panjang Gelombang (nm)	Suhu (°C)			Waktu (menit)
1	Vit C kontrol 1, (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 ppm)	Vitamin C	etanol	450	-	30	3,96 ppm	(Amilin, 2018)
2	Alga Coklat (250, 500, 750, 1000 ppm)	Cu	etanol	450	-	-	201 µmol	(Diachanty, 2017)
3	0,5 ml ekstrak Jahe Merah	Cu, Fe	etanol	450	-	30	5,369 ppm	(Amilin, 2018)
4	Ekstrak Daun Yakon (10, 15, 20, 25, 30 µg/mL)	Polifenol	etanol	451	-	60	31407,79 Mmol/g	(Nugraha, 2017)

Macam-macam pengujian nilai aktivitas antioksidan pada senyawa antioksidan polar dengan metode CUPRAC dapat dilihat pada Tabel 3. Dapat dilihat bahwa sampel yang digunakan bersumber dari bahan murni ataupun hasil ekstrak dari bahan lain seperti ekstrak alga coklat, jahem merah, dan daun yakon.

Pada metode ini digunakan reagen khusus berupa reagen copper (II)-neocuproine (Cu(II)-Nc). Metode ini dapat digunakan untuk mengetahui kapasitas antioksidan senyawa-senyawa fenolik. Kelebihan metode ini adalah reagen CUPRAC sebagai pereaksi merupakan pereaksi yang selektif, yang memiliki nilai potensial reduksi yang rendah. metode ini memiliki kelebihan jika dibandingkan dengan metode pengukuran antioksidan yang lain yaitu reagen Cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) cukup cepat untuk mengoksidasi tiol jenis antioksidan. Metode ini memiliki kemampuan dalam mengukur hidrofilik dan lipofilik dari antioksidan misalnya, β -karoten dan α -tokoferol (Apak *et al.*, 2007). Prinsip pengujian dengan metode CUPRAC adalah kemampuan sampel agen antioksidan dalam mereduksi kompleks Cu^{2+} menjadi kompleks Cu^+ yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari biru menjadi kuning pada spot senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan (Widyastuti, 2010).

Berdasarkan hasil pengujian nilai aktivitas antioksidan dengan metode CUPRAC, dapat dilihat bahwa pengujian nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan cukup tinggi. Parameter-parameter optimum yang digunakan adalah d panjang gelombang 450 nm, pelarut etanol, waktu inkubasi selama 30-60 menit.

Panjang gelombang optimum yang biasa digunakan pada metode CUPRAC adalah 450 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Haeria (2018), bahwa panjang gelombang optimum yang digunakan pada metode CUPRAC adalah 450 nm. Pelarut yang digunakan pada metode CUPRAC adalah etanol. Nurcholis (2018) menyatakan bahwa etanol adalah pelarut yang paling efisien untuk digunakan pada metode CUPRAC. Pelarut etanol memiliki titik didih yang rendah dan cenderung aman sehingga nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan optimal. Etanol merupakan senyawa tak beracun dan berbahaya, selain itu etanol juga memiliki tingkat kepolaran tinggi sehingga mudah larut dalam senyawa resin, minyak, lemak, asam lemak, karbohidrat dan senyawa organik lainnya (Hakim, 2021). Etanol juga berfungsi untuk menghindari

senyawa-senyawa lain seperti klorofil yang sebenarnya tidak memiliki aktivitas yang berarti namun berpotensi dapat menimbulkan masalah. Waktu inkubasi optimal pada metode CUPRAC adalah selama 30 menit. Patricia (2013) menyatakan bahwa waktu inkubasi optimal untuk metode CUPRAC adalah selama 30 menit. Namun pada hasil tabel diatas, penelitian oleh Nugraha (2017) waktu inkubasi yang digunakan selama 60 menit. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Djauhari (2016) bahwa lama waktu inkubasi tersebut merupakan waktu inkubasi yang cukup baik untuk digunakan pada metode CUPRAC. Perbedaan lama waktu inkubasi yang digunakan tergantung dari jenis sampel dan banyaknya volume pelarut yang digunakan. Semakin lama waktu inkubasi maka kontak antara sampel dengan pelarut akan lebih lama sehingga senyawa antioksidan yang dihasilkan dari sampel akan semakin meningkat. Namun jika waktu inkubasi yang digunakan terlalu lama dan sudah melewati kondisi optimum, maka hasil senyawa antioksidan yang terekstrak akan cenderung menurun (Aning, 2016). Penggunaan waktu inkubasi yang terlalu lama dan tidak dikontrol juga dapat menyebabkan rusaknya senyawa-senyawa yang terkandung dalam bahan, termasuk senyawa antioksidan yang terdapat didalamnya.

Berdasarkan hasil review pada tabel 3., dapat diamati bahwa metode CUPRAC cukup efektif dalam mengukur nilai aktivitas antioksidan pada senyawa antioksidan polar terutama pada senyawa fenolik. Hal ini didukung dengan pernyataan Apak (2013), dimana metode ini tepat untuk menguji nilai aktivitas antioksidan pada senyawa-senyawa flavonoid dan fenolik. Chassana (2018) dalam penelitiannya yang menggunakan sampel mengandung polifenol, melakukan uji presisi terhadap metode CUPRAC. Berdasarkan hasil uji presisi tersebut, metode CUPRAC memiliki kemampuan yang cukup baik untuk mengidentifikasi nilai aktivitas antioksidan polar. Pada beberapa penelitian diatas, nilai koefisien korelasi yang dihasilkan cenderung mendekati 1, meskipun nilai uji linearitas yang dihasilkan metode CUPRAC tidak setinggi metode DPPH.

METODE FIC (*Ferrous Ion Chelating*)

Tabel 4. Uji Aktivitas Antioksidan Polar dengan Metode FIC

No	Sampel	Jenis Antioksidan	Parameter			Waktu (menit)	Daya Antioksidan	Referensi
			Pelarut	Panjang Gelombang (nm)	Suhu (°C)			
1	Asam Askorbat (40 mg/mL)	Vitamin C	metanol	562	25	10	LoD = 1,68 mg/ LoQ = 5,09 mg/L IC ₅₀ = 210,51 mg/mL	(Maesaroh, 2018)
2	0,5 ml ekstrak Rumput Laut	Cu, Fe	etanol	562	-	10	65,52%	(Djapiala, 2013)
3	2 ml ekstrak Bekatul Beras Hitam	Fe	etanol	562	-	10	39,73%	(Coky, 2014)
4	2 ml ekstrak Bekatul Beras Hitam	Protein	etanol	562	-	10	39,73%	(Coky, 2014)
5	0,5 ml ekstrak Rumput Laut	Polifenol	etanol	562	-	10	65,52%	(Djapiala, 2013)

Keterangan : LoD = *Limit of Detection*
LoQ = *Limit of Quantitation*

Macam-macam pengujian nilai aktivitas antioksidan pada senyawa antioksidan polar dengan metode FIC dapat dilihat pada Tabel 4. Dapat dilihat bahwa sampel yang digunakan berbeda-beda, baik yang berasal dari bahan murni ataupun hasil ekstrak dari bahan lain seperti ekstrak rumput laut dan bekatul beras hitam. LoD (*Limit of Detection*) adalah nilai batas deteksi, sedangkan LoQ (*Limit of Quantitation*) adalah nilai batas kuantitasi.

FIC adalah metode yang digunakan untuk menguji kemampuan suatu senyawa dalam kemampuannya untuk mengkelat logam. Mekanisme dari metode ini adalah mengukur kemampuan antioksidan dan suatu senyawa untuk bersaing dengan ferrozine dalam mengkelat ionbesi (Elmastas *et al.*, 2006). *Ferrozine* memiliki kemampuan dalam mengkelat Fe^{2+} sehingga terbentuk senyawa kompleks. Senyawa kompleks tersebut akan terganggu oleh adanya senyawa pengkelat logam lainnya (Abdulenein *et al.*, 2003). Tingginya nilai daya kelat yang dihasilkan berbanding lurus dengan kemampuan mengkelat suatu ion dalam meredam radikal bebas sehingganya nilai aktivitas antioksidan yang didapat semakin tinggi juga.

Berdasarkan hasil review penelitian pada tabel 4., hasil nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan relatif rendah. Nilai IC_{50} yang dihasilkan pada sampel asam askorbat dengan konsentrasi 40 mg/mL adalah 210,51 mg/mL. Sebagai pembandingan, Mu'nisa (2012) pada penelitiannya menggunakan sampel asam askorbat dengan konsentrasi 40 mg/mL yang diuji dengan metode DPPH menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 2,92 mg/mL. Parameter-parameter optimum yang digunakan pada metode FIC terhadap sampel antioksidan polar adalah panjang gelombang 562 nm, pelarut etanol, waktu inkubasi selama 10 menit. Namun besarnya suhu inkubasi yang digunakan tidak disebutkan pada beberapa jurnal diatas. Tetapi, pada penelitian yang dilakukan oleh Maesaroh (2018), suhu inkubasi yang digunakan pada metode FIC adalah sebesar 25°C.

Pada hasil review penelitian pada tabel 4., dapat diamati metode ini menunjukkan hasil yang relatif rendah sehingga dianggap kurang efektif dalam menganalisa nilai aktivitas antioksidan polar. Hal tersebut dapat disebabkan karena metode ini memiliki tingkat sensitivitas yang cukup rendah (Maesaroh, 2018). Berker *et al.* (2010) menambahkan

bahwa senyawa polifenol dari bahan alam juga mempunyai daya kelat terhadap Fe^{2+} yang relatif lemah dibandingkan terhadap EDTA.

Panjang gelombang optimum yang biasa digunakan pada metode FIC adalah 562 nm. Kemudian pelarut yang paling efisien untuk digunakan pada metode ini adalah etanol. Penggunaan pelarut yang tepat bertujuan untuk menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang optimal. Pelarut etanol umumnya lebih dipilih karena memiliki kepolaritasan yang tinggi. Pelarut etanol juga memiliki titik didih yang rendah, tidak beracun dan memiliki dua sisi yang terdiri dari gugus ^{-}OH yang bersifat polar dan CH_2CH_3 yang bersifat non polar (Aziz, 2014). Etanol juga berfungsi untuk menghindari senyawa-senyawa lain seperti klorofil yang sebenarnya tidak memiliki aktivitas yang berarti namun berpotensi dapat menimbulkan masalah. Lalu, waktu inkubasi optimal yang digunakan pada metode ini adalah selama 10 menit. Pingkan (2020) menyatakan bahwa penggunaan panjang gelombang 562 nm, pelarut etanol, waktu inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang merupakan parameter terbaik untuk digunakan pada metode ini.

Secara keseluruhan, dapat diamati bahwa hasil pengujian nilai aktivitas antioksidan polar dengan metode FIC menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang cenderung rendah dan kurang valid. Pada penelitian Maesaroh (2018) yang menggunakan sampel vitamin C dihasilkan nilai LoD dan LoQ masing-masing sebesar 1,68 mg/ml dan 5,06 mg/ml. Jika dibandingkan 2 metode lainnya pada penelitian tersebut, metode DPPH dan FRAP menghasilkan nilai LoD dan LoQ masing-masing sebesar 0,08 mg/ml dan 0,25 mg/ml. Menurut Harmita (2004), nilai LoD dan LoQ yang semakin rendah menunjukkan bahwa metode tersebut memiliki tingkat presisi yang tinggi dan dapat diterima dengan baik. LoD adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibanding blanko. LoQ adalah jumlah analit terkecil dalam sampel yang masih dapat diukur dengan akurat oleh suatu metode pengujian. Berdasarkan teori tersebut, dapat disimpulkan metode FIC terbukti kurang efisien dan memiliki tingkat presisi yang rendah untuk menguji nilai aktivitas antioksidan polar.

METODE ABTS (2,2'-Azinobis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt)

Tabel 5. Uji Aktivitas Antioksidan Polar dengan Metode ABTS

No	Sampel	Jenis Antioksidan	Parameter			Waktu	Daya Antioksidan	Referensi
			Pelarut	Panjang Gelombang (nm)	Suhu (°C)			
1	Purifikasi n-heksan Buah Parijoto	Vitamin C	etanol	734	-	-	19,73 ppm	(Vifta, 2019)
2	Vitamin C (15, 20, 25, 30, 35 µl)	Vitamin C	etanol	750	-	-	6 ppm	(Jumaetri, 2015)
3	0,1 ml larutan ekstrak Pisang Kepok (20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.)	Fe	etanol	734	22-24	12-16 jam	IC ₅₀ = 60,50	(Pantria, 2020)
4	10 µl ekstrak Daun Kelor	Zn	metanol	734	30	12-16 jam	94,99 %	(Fitriana, 2015)
5	Bunga Brokoli (50 , 100, 150, 200 dan 250 µl)	Zn, Fe	etanol	750	-	-	32,129 ppm	(Jumaetri, 2015)
6	Ekstrak buah tomat dan stroberi	Protein	etanol	412	-	6 menit	30,73 bpj	(Serlahwaty, 2016)
7	10 µl ekstrak Daun Kelor	Polifenol	etanol	734	-	12-16 jam	92,12 %	(Fitriana, 2015)
8	Kayu Secang (10, 20, 30, 40, 50 ppm)	Polifenol	etanol	520	Suhu ruang	12 jam	26,70 ppm	(Setiawan, 2018)

Macam-macam pengujian nilai aktivitas antioksidan pada senyawa antioksidan polar dengan metode ABTS dapat dilihat pada Tabel 5. Dapat dilihat bahwa terdapat macam-macam sampel yang digunakan, baik yang bersumber dari bahan murni ataupun hasil ekstrak dari bahan lain seperti ekstrak buah parijoto, pisang kepok, daun kelor, bunga brokoli, buah tomat dan stroberi dan kayu secang.

Mekanisme metode ABTS adalah melihat kemampuan senyawa antioksidan untuk menyetabilkan senyawa radikal bebas dengan mendonorkan radikal proton (Setiawan, 2015). Prinsip pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS adalah penghilangan warna kation ABTS untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung bereaksi dengan radikal kation ABTS. ABTS adalah suatu radikal dengan pusat nitrogen yang mempunyai karakteristik warna biru-hijau, yang bila tereduksi oleh antioksidan akan berubah menjadi bentuk non radikal dari berwarna menjadi tidak berwarna. Metode ABTS sangat sensitif terhadap cahaya, bahkan pembentukan ABTS memerlukan waktu inkubasi selama 12-16 jam dalam kondisi gelap.

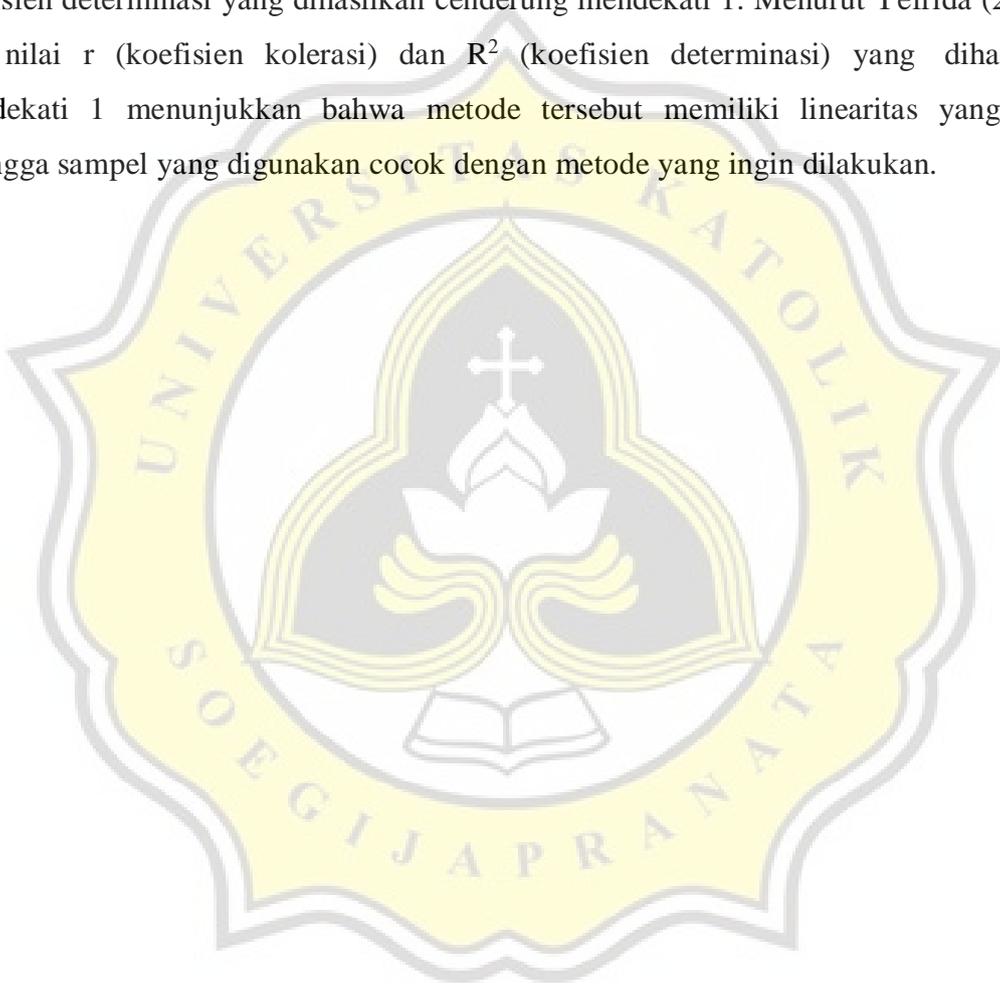
Berdasarkan hasil review penelitian pada tabel 5., parameter-parameter optimum yang digunakan adalah panjang gelombang 734-750 nm, pelarut etanol dan metanol, waktu inkubasi selama 12-16 jam pada suhu ruang. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wahyono (2018) dengan sampel yang mengandung vitamin C dan protein pengikat logam, bahwa parameter terbaik yang digunakan pada metode ABTS adalah panjang gelombang 734-750 nm, pelarut etanol, waktu inkubasi selama 12 jam pada suhu ruang (gelap). Jumaetri (2020) menambahkan bahwa penggunaan pelarut etanol dalam proses ekstraksi dan panjang gelombang 700-750 nm dalam proses pengukuran absorbansi, merupakan parameter optimum yang dapat diterapkan pada metode ABTS.

Pelarut etanol dan metanol merupakan pelarut yang paling efektif dalam menguji sampel antioksidan polar pada metode ABTS. Penggunaan pelarut juga berperan untuk menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang optimal. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Faisal (2019) terhadap sampel vitamin C, dimana etanol adalah jenis pelarut yang cukup baik untuk digunakan pada metode ini. Verdiana (2018) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa etanol merupakan pelarut terbaik yang dapat

digunakan untuk menguji nilai aktivitas antioksidan. Kemudian Imrawati (2017) juga menyatakan bahwa pelarut etanol adalah pelarut yang baik untuk digunakan pada metode ABTS. Etanol mampu menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung antioksidan. Senyawa antioksidan akan larut dalam pelarut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel, sehingga larutan yang lebih pekat akan terdesak keluar (Imrawati, 2017). Etanol memiliki titik didih yang rendah, tidak beracun dan memiliki dua sisi yang terdiri dari gugus $-OH$ yang bersifat polar dan CH_2CH_3 yang bersifat non polar (Aziz, 2014). Etanol juga berfungsi untuk menghindari senyawa-senyawa lain seperti klorofil yang sebenarnya tidak memiliki aktivitas yang berarti namun berpotensi dapat menimbulkan masalah. Metanol umumnya dipilih karena mempunyai tingkat kepolaran yang lebih tinggi karena memiliki atom C yang lebih sedikit. Vifta (2020) dalam penelitiannya juga menyatakan bahwa metanol juga merupakan pelarut yang baik untuk digunakan pada metode ABTS, dimana pada penelitiannya digunakan vitamin C murni sebagai sampel.

Suhu inkubasi optimal yang menghasilkan nilai terbaik adalah suhu ruang atau sebesar $37^{\circ}C$ (suhu ruang). Jika suhu yang digunakan terlalu panas maka akan menyebabkan peningkatan konsentrasi ekstrak tidak optimal bahkan mengalami penurunan. Wahyono (2018) pada penelitiannya mengatakan bahwa suhu inkubasi optimum pada metode ini adalah suhu ruang. Waktu inkubasi optimal yang menghasilkan hasil terbaik adalah selama 12-16 jam. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Faisal (2019) bahwa waktu inkubasi optimal pada metode ABTS adalah selama 12-16 jam. Semakin lama waktu inkubasi maka kontak antara sampel dengan pelarut akan lebih lama sehingga senyawa antioksidan yang dihasilkan dari sampel akan semakin meningkat. Waktu inkubasi berbanding lurus dengan hasil ekstraksi dan jumlah rendemen yang dihasilkan sehingga akan mempengaruhi kadar antioksidan yang dihasilkan.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah direview, dapat disimpulkan bahwa ABTS merupakan metode yang cukup efektif dalam mengukur nilai aktivitas antioksidan pada senyawa antioksidan polar seperti vitamin C, protein pengikat logam, dan polifenol. Ilham (2018) dalam penelitiannya melakukan uji presisi terhadap metode ABTS dengan menggunakan sampel yang mengandung vitamin C. Berdasarkan hasil uji presisi tersebut, dapat dikatakan bahwa ABTS merupakan metode yang cukup efektif dan valid untuk menguji nilai aktivitas antioksidan. Pada beberapa penelitian diatas, nilai koefisien determinasi yang dihasilkan cenderung mendekati 1. Menurut Yefrida (2019), jika nilai r (koefisien korelasi) dan R^2 (koefisien determinasi) yang dihasilkan mendekati 1 menunjukkan bahwa metode tersebut memiliki linearitas yang baik sehingga sampel yang digunakan cocok dengan metode yang ingin dilakukan.



TOTAL ANTIOKSIDAN POLAR

METODE FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Tabel 6. Uji Total Antioksidan Polar dengan Metode FRAP

No	Sampel	Jenis Antioksidan	Parameter			Waktu (menit)	Daya Antioksidan	Referensi
			Pelarut	Panjang Gelombang (nm)	Suhu (°C)			
1	Jus Delima (I, II, III)	Vitamin C	etanol	596	37	30	6,123 µg/ TR g sampel 6,0913 µg/ TR g sampel 2,9651 µg/ TR g sampel	(Muflihunna, 2014).
2	Ekstrak kayu secang (10, 15, 20, 25, 30 ppm)	Vitamin C	etanol	594	37	10	11,37 ppm	(Setiawan, 2018).
3	Ekstrak etanol Daun Kersen (65,6 ; 131,2 ; 196,8 ; 252,4 ; 328 ppm)	Vitamin C	etanol	593	-	-	83,149 µM.	(Jumaetri, 2017).
4	Asam askorbat (2, 4, 8, 16, 32 ppm)	Vitamin C	metanol	700	50	20	LoD = 0,08 mg/L LoQ = 0,25 mg/L	(Maesaroh, 2018).

5	Ekstrak buah semangka	Vitamin C	metanol	692	50	20	0,1329 mgAAE/g sampel.	(Tahir, 2016).
6	Vitamin C murni (1, 2, 3, 4, 5 ppm)	Vitamin C	etanol	689,2	50	20	1,001 ppm.	(Winarti, 2020).
7	Ekstrak daun kelor (60, 70, 80, 90, 100 ppm)	Vitamin C	etanol	518	50	20	7,923 mgAAE/g ekstrak.	(Maryam, 2015).
8	Ekstrak metanol <i>E. cottonii</i> (60 %, 70 %, 80%)	Se	metanol	700	50	20	33,43 %	(Damongilala, 2013)
9	Ekstrak Daun mareme	Polifenol	metanol	593	-	30	7,56 ppm	(Sugihartini, 2019)
10	Ekstrak kayu secang (10, 15, 20, 25, 30 ppm)	Polifenol	etanol	594	37	10	11,37 ppm	(Setiawan, 2018).
11	150 µl ekstrak Ikan Gabus	Albumin	-	595	30	8	0,719 Mmol Fe(II)/g ekstrak	(Ekowati, 2015)

Keterangan : LoD = *Limit of Detection*

LoQ = *Limit of Quantitation*

AAE = *Ascorbic Acid Equivalent*

TR = *Total Revenue*

Macam-macam pengujian nilai total antioksidan pada senyawa antioksidan polar dengan metode FRAP dapat dilihat pada Tabel 6. Dapat dilihat bahwa sampel yang digunakan adalah sampel yang mengandung senyawa antioksidan polar baik bahan murni ataupun hasil ekstrak dari bahan lain seperti jus delima, ekstrak kayu secang, daun kersen, buah semangka, daun kelor, daun mareme dan ikan gabus.

Metode FRAP adalah metode yang dapat menentukan berapa jumlah kandungan antioksidan dari suatu bahan pangan berdasarkan kemampuan zat antioksidan tersebut untuk mereduksi ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Prinsip dari uji FRAP adalah reaksi transfer elektron dari antioksidan ke senyawa Fe^{3+} - TPTZ (Halvorsen *et al.*, 2002). Pada metode ini akan terjadi perubahan warna dari warna hijau ke warna biru (biru berlin). Hal ini merupakan daya reduksi yang merupakan indikator potensi adanya senyawa antioksidan.

Berdasarkan hasil review penelitian pada tabel 6., dapat dilihat metode FRAP menghasilkan nilai total antioksidan yang cukup valid dan relatif tinggi. Parameter-parameter optimum yang digunakan adalah panjang gelombang 593 nm, pelarut etanol atau metanol, suhu inkubasi sebesar 50°C dengan waktu inkubasi selama 20 menit.

Panjang gelombang optimum yang digunakan pada metode ini adalah antara 593 nm. Menurut Panda (2012), panjang gelombang maksimal yang dapat digunakan pada pengujian antioksidan polar dengan metode FRAP adalah 700 nm. Pelarut yang paling efektif dalam perannya menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang optimal untuk metode FRAP adalah etanol dan metanol. Haryoto (2019) menjelaskan bahwa pelarut etanol merupakan pelarut yang efisien untuk digunakan pada metode FRAP. Etanol dipilih karena etanol merupakan pelarut yang bersifat polar dan cukup selektif sehingga semua senyawa antioksidan yang terkandung didalam simplisia sampel dapat terkekstrak dengan sempurna. Etanol merupakan pelarut yang bersifat tidak toksik serta ekonomis (Manu, 2013). Pada sampel yang bersumber dari jenis daun-daunan, etanol juga berfungsi untuk menghindari senyawa-senyawa lain seperti klorofil yang sebenarnya tidak memiliki aktivitas yang berarti namun berpotensi dapat menimbulkan masalah. Metanol umumnya dipilih karena memiliki kemampuan untuk menarik senyawa polar dan beberapa senyawa nonpolar (Pratiwi, 2013). Menurut Chayati (2016), metanol merupakan salah satu jenis pelarut yang efektif untuk digunakan pada metode FRAP.

Pada hasil penelitian yang tercantum pada tabel 6., suhu inkubasi optimal adalah sebesar 50 °C. Namun suhu inkubasi yang digunakan harus dikontrol dengan cermat, jika suhu yang digunakan terlalu panas maka akan menyebabkan peningkatan konsentrasi ekstrak tidak optimal bahkan mengalami penurunan. Pada tabel 6., waktu inkubasi optimal adalah 20 menit. Semakin lama waktu inkubasi maka kontak antara sampel dengan pelarut akan lebih lama sehingga senyawa antioksidan yang dihasilkan dari sampel akan semakin meningkat. Waktu inkubasi berbanding lurus dengan hasil ekstraksi dan jumlah rendemen yang dihasilkan sehingga akan mempengaruhi kadar antioksidan yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Manasika (2020), yang menjelaskan bahwa waktu inkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C merupakan parameter terbaik yang dapat digunakan pada metode ini.

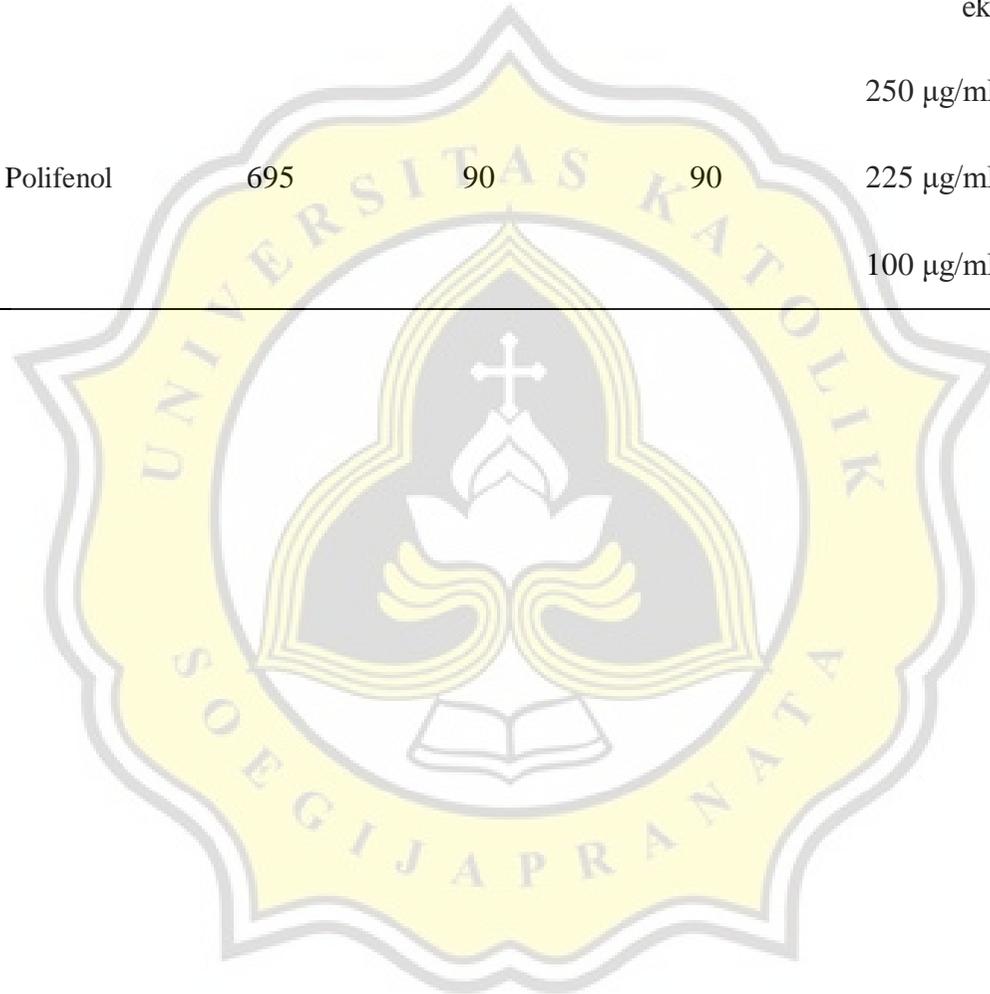
Berdasarkan pada hasil penelitian-penelitian yang telah direview, dapat diamati bahwa metode FRAP cukup efektif dalam mengukur nilai total antioksidan pada senyawa antioksidan polar seperti vitamin C, protein pengikat logam dan polifenol. Pada penelitian Listiya (2015), dilakukan uji presisi terhadap metode FRAP dengan menggunakan sampel yang mengandung senyawa polifenol. Berdasarkan hasil uji presisi tersebut, metode ini memiliki tingkat validitas dan keefektifitasan yang cukup tinggi. Pada beberapa penelitian diatas, nilai koefisien kolerasi dan koefisien determinasi yang dihasilkan cenderung mendekati 1. Menurut Yefrida (2019), jika nilai r (koefisien kolerasi) dan R^2 (koefisien determinasi) yang dihasilkan mendekati 1 menunjukkan bahwa metode tersebut memiliki linearitas yang baik sehingga sampel yang digunakan cocok dengan metode yang ingin dilakukan.

METODE FOSFOMOLIBDAT

Tabel 7. Uji Total Antioksidan Polar dengan Metode Fosfomolibdat

No	Sampel	Jenis Antioksidan	Parameter			Daya Antioksidan	Referensi
			Panjang Gelombang (nm)	Suhu (°C)	Waktu (menit)		
1	Vitamin C (Acid Orange)	Vitamin C	695	95	90	300 Acid Equivalent/mL.	(Fathima, 2018).
2	50 g Empelur sagu baruk (<i>Arenga microcharpha</i>)	Vitamin C	695	90	90	250 µg/mL (hari ke-1)	(Momuat, 2016).
						225 µg/mL (hari ke-2)	
						100 µg/mL (hari ke-3)	
3	Ekstrak buah kiwi (<i>Actinidia deliciosa</i>).	Vitamin C	725	-	-	224,9 mg/100 g ekstrak	(Inggrid, 2014).
4	5% ekstrak buah mengkudu	Fe, Se	-	-	-	47,96 mg GAE/100 gr	(Yuliawaty, 2015)
5	50 g Empelur sagu baruk (<i>Arenga microcharpha</i>)	Fe	695	90	90	250 µg/mL (hari ke-1)	(Momuat, 2016).
						225 µg/mL (hari ke-2)	
						100 µg/mL (hari ke-3)	

6	Ekstrak Daun Suruhan (0,55 mg/ml)	Polifenol	695	95	60	118,36 mgQE/gr ekstrak	(Salamah, 2014)
						250 µg/mL (hari ke-1)	
7	Empelur sagu baruk (<i>Arenga microcharpha</i>)	Polifenol	695	90	90	225 µg/mL (hari ke-2)	(Momuat, 2016).
						100 µg/mL (hari ke-3)	



Macam-macam pengujian nilai total antioksidan pada senyawa antioksidan polar dengan metode fosfomolibdat dapat dilihat pada Tabel 7. Dapat dilihat terdapat bermacam-macam sampel yang digunakan, baik yang bersumber dari bahan murni ataupun hasil ekstrak dari bahan lain seperti ekstrak empelur sagu baruk (*Arenga microcharpha*), buah kiwi (*Actinidia deliciosa*), buah mengkudu dan daun suruhan.

Mekanisme dari metode ini adalah dimana sampel mengandung senyawa yang memiliki daya reduksi. Proses reduksi tersebut akan mengubah fosfomolibdat IV menjadi fosfomolibdat V dan akan menghasilkan senyawa kompleks fosfomolibdenum yang berwarna hijau kebiruan (Monmun., 2017). Senyawa fosfomolibdenum biasanya akan terbentuk pada proses pemanasan 95 °C selama 90 menit. Pada dasarnya, metode ini didasarkan pada kemampuan sampel dalam mereduksi Mo(IV) yang terdapat pada reagen menjadi Mo(V) (Prieto *et al.*, 1999).

Berdasarkan hasil review penelitian pada tabel 7., dapat dilihat bahwa pengujian nilai total antioksidan dengan metode fosfomolibdat menghasilkan nilai yang tidak terlalu tinggi. Nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan relatif tinggi ketika digunakan parameter-parameter berupa panjang gelombang sebesar 695 nm, suhu inkubasi sebesar 90-95°C dengan waktu inkubasi selama 90 menit.

Panjang gelombang optimum yang digunakan pada metode ini adalah antara 695-725 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Warsi (2017), bahwa panjang gelombang optimum untuk menguji kapasitas antioksidan dengan metode fosfomolibdat terhadap senyawa fenol adalah 695 nm. Sahala (2012) mengatakan jika panjang gelombang maksimum metode fosfomolibdat adalah 700-750 nm. Wungkana (2013) pada penelitiannya juga menjelaskan bahwa panjang gelombang maksimum yang dapat diterapkan pada metode ini adalah 750 nm. Suhu inkubasi optimal yang menghasilkan nilai terbaik adalah suhu ruang atau sebesar 90-95°C. Hal ini didukung oleh Ramadan (2020) menjelaskan bahwa suhu inkubasi optimal pada proses ekstraksi metode fosfomolibdat adalah 95°C. Wungkana (2013) juga mengatakan bahwa suhu inkubasi optimum pada metode fosfomolibdat adalah 90°C. Suhu inkubasi yang digunakan harus dikontrol dengan baik, jika suhu yang digunakan terlalu panas maka akan menyebabkan penurunan konsentrasi ekstrak tidak optimal bahkan mengalami

penurunan. Waktu inkubasi optimal yang digunakan pada penelitian-penelitian diatas adalah selama 90 menit. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Warsi (2017) bahwa waktu inkubasi optimum yang digunakan pada metode ini adalah selama 90 menit. Semakin lama waktu inkubasi maka kontak antara sampel dengan pelarut akan lebih lama sehingga senyawa antioksidan yang dihasilkan dari sampel akan semakin meningkat. Waktu inkubasi berbanding lurus dengan hasil ekstraksi dan jumlah rendemen yang dihasilkan sehingga akan mempengaruhi kadar antioksidan yang dihasilkan. Namun, karena pada metode ini suhu inkubasi yang digunakan cukup tinggi dan menggunakan waktu inkubasi yang cukup lama, maka proses ekstraksi sampel harus dikontrol dengan cermat. Jika suhu yang digunakan terlalu tinggi dan waktu inkubasi yang digunakan terlalu lama, maka senyawa antioksidan yang terkandung dalam sampel akan rusak sehingga menghasilkan nilai total antioksidan yang tidak optimal.

Berdasarkan hasil review pada penelitian-penelitian tersebut, juga dapat dilihat bahwa metode fosfomolibdat kurang efektif dalam mengukur nilai total antioksidan pada senyawa antioksidan polar seperti vitamin C, polifenol dan protein pengikat logam. Hal ini dapat disebabkan oleh proses ekstraksi yang tidak dikontrol dengan baik pada beberapa penelitian, terlebih metode ini membutuhkan waktu yang cukup lama pada suhu yang tinggi. Sehingga, nilai total antioksidan yang dihasilkan tidak optimal. Kemudian metode ini memiliki korelasi yang buruk terhadap senyawa fenolik dan flavonoid (senyawa bioaktif). Namun pada beberapa penelitian dengan senyawa-senyawa antioksidan non polar, dihasilkan nilai total antioksidan yang cukup tinggi. Metode ini cukup baik dalam mendeteksi beberapa senyawa antioksidan seperti karoten, asam askorbat, dan *α-tocopherol* (Choirunnisa, 2016) dan (Prieto, 1999). Namun pada penelitian Arikalang (2018), metode ini memiliki tingkat presisi yang cukup baik. Nilai uji presisi yang dilakukan terhadap metode ini adalah 0,06 %. Menurut Harmita (2004), nilai simpangan baku relatif (RSD) < 2% menunjukkan bahwa metode tersebut memiliki tingkat presisi yang tinggi dan yang dapat diterima dengan baik.