

#### 4. PENGUKURAN NILAI AKTIVITAS DAN TOTAL ANTIOKSIAN PADA ANTIOKSIDAN NON POLAR

##### NILAI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN NON POLAR

##### METODE DPPH (2,2-diphenyl picrylhydrazyl)

Tabel 8. Uji Aktivitas Antioksidan Non Polar dengan Metode DPPH

No	Sampel	Jenis Antioksidan	Pelarut	Parameter			Daya Antioksidan	Referensi
				Panjang Gelombang (nm)	Waktu (menit)	Suhu (°C)		
1	Vitamin E murni (Sigma Co)	Vitamin E	metanol	517	-	-	12,50 µg/mL.	(Da'i, 2010).
2	Vitamin E murni (2, 4, 6 ppm)	Vitamin E	etanol	514	20	-	4,91 µg/mL.	(Hasanah, 2017).
3	Vitamin E murni (4, 6, 8, 10 ppm)	Vitamin E	metanol	515	30	37 °C	4,684 µg/mL.	(Kusmiati, 2018).
4	Vitamin E murni (6, 8, 10, 12 ppm)	Vitamin E	etanol	516,1	-	-	9,36 µg/mL.	(Haryoto, 2019).
5	Ekstrak Daun Yakon (10, 15, 20, 25, 30µg/mL)	Flavonoid	etanol	517	30	suhu ruang	106,57 µg/mL.	(Nugraha, 2017)
6	Daun tiga genus <i>Artemisia sp</i>	Flavonoid	metanol	517	30	suhu ruang	77,19 µg/mL.	(Budiana, 2017)
7	Alga Coklat <i>Turbinaria decurens</i> (25,50,100, 500, 1000 g/ml)	Karotenoid	metanol	516	30	-	104543 ppm	(Biranti, 2009)
8	25 ml ekstrak Labu kabocha	Karotenoid	metanol	517	30	-	84,38 ppm	(Manasika, 2015)

Macam-macam pengujian nilai aktivitas antioksidan pada antioksidan non polar dengan metode DPPH dapat dilihat pada Tabel 8. Dapat dilihat bahwa sampel yang digunakan adalah sampel yang mengandung senyawa antioksidan non polar baik bahan murni ataupun hasil ekstrak dari bahan lain seperti ekstrak daun yakon, daun tiga genus (*Artemisia sp*), alga coklat (*Turbinaria decurens*) dan labu kabocha.

Berdasarkan hasil review penelitian pada tabel 8., dapat dilihat bahwa nilai aktivitas antioksidan polar yang diuji dengan metode DPPH dan menghasilkan nilai yang relatif tinggi. Parameter-parameter optimum yang digunakan adalah panjang gelombang 515-517 nm, pelarut etanol dan metanol, suhu inkubasi sebesar 37°C (suhu ruang) dengan waktu inkubasi selama 30 menit.

Beberapa penelitian menggunakan bahan yang sama seperti penelitian yang dilakukan oleh Kusmiati (2018) dan Hasanah (2017), dimana penelitian-penelitian tersebut menggunakan sampel berupa vitamin E murni dengan konsentrasi yang hampir identik.

Penelitian Kusmiati (2018) menggunakan sampel vitamin E yang difungsikan sebagai pembanding/kontrol dari ekstrak bunga kenikir menghasilkan nilai aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 4,684 µg/mL. Vitamin E yang digunakan memiliki konsentrasi sampel sebesar 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah, pelarut yang digunakan adalah methanol, suhu inkubasi yang digunakan adalah suhu ruang (37°C), waktu inkubasi yang digunakan selama 30 menit dan panjang gelombang yang digunakan adalah 515 nm.

Hasanah (2017) melakukan penelitian dengan menggunakan sampel vitamin E /  $\alpha$ -*tocopherol* yang digunakan sebagai pembanding/kontrol dari sampel ekstrak etanol daun kelor (*Moringa Oleifera Lamk*). Dari penelitian ini, dihasilkan nilai aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai % inhibisi masing-masing konsentrasi sebesar 39,4%, 45,11%, dan 54,92%, dan diperoleh nilai IC<sub>50</sub> sebesar 4,91 µg/mL. Vitamin E yang digunakan memiliki konsentrasi sampel sebesar 2 ppm, 4 ppm, dan 6 ppm. Parameter-parameter yang digunakan adalah pelarut etanol PA, waktu inkubasi selama 10 - 20 menit dan panjang gelombang yang digunakan adalah 514 nm.

Berdasarkan hasil 2 penelitian tersebut yang menggunakan sampel antioksidan non polar berupa vitamin E dengan konsentrasi yang hampir identik, dapat dilihat bahwa penelitian yang menggunakan pelarut metanol dengan waktu inkubasi selama 30 menit menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Menurut Molyneux (2004), pelarut metanol tidak akan mempengaruhi reaksi antara sampel uji (sebagai antioksidan) dengan larutan DPPH (sebagai radikal). Salamah (2015) pada penelitiannya menyatakan bahwa pelarut metanol adalah pelarut terbaik untuk menguji aktivitas antioksidan non polar. Waktu inkubasi selama 30 menit juga merupakan waktu inkubasi yang paling optimal untuk digunakan pada metode DPPH (Salamah, 2015).

Pada pengujian aktivitas antioksidan terhadap antioksidan non polar lainnya seperti flavonoid dan karotenoid, metode ini juga menunjukkan nilai yang cukup tinggi. Pada Tabel 8. dapat dilihat bahwa sampel yang mengandung flavonoid diteliti dengan pelarut berupa metanol dan etanol. Ahmad (2015) menjelaskan bahwa senyawa flavonoid yang dilarutkan dengan metanol dapat menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang lebih baik. Tetapi, Aminah (2017) menjelaskan bahwa etanol juga merupakan pelarut yang baik untuk menguji nilai aktivitas antioksidan terhadap senyawa flavonoid. Nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan pada suatu penelitian juga dapat dipengaruhi dari besar kecilnya konsentrasi sampel yang digunakan. Untuk sampel karotenoid, Warsi (2013) menyatakan bahwa metanol adalah pelarut yang paling efektif dan paling banyak digunakan untuk mengekstraksi sampel bahan yang mengandung senyawa karotenoid. Hal ini didukung oleh Kusbandari (2016), bahwa metanol adalah pelarut yang baik untuk melarutkan senyawa karotenoid.

Selain dari pengaruh konsentrasi sampel yang digunakan, parameter yang digunakan pada penelitian juga dapat berpengaruh pada nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Pada hasil tabel diatas, dapat dilihat panjang gelombang optimum yang digunakan adalah antara 515-517 nm. Pelarut yang digunakan adalah etanol dan metanol, dimana pelarut ini merupakan pelarut yang cukup baik dalam menguji sampel antioksidan non polar. Penggunaan pelarut yang tepat bertujuan untuk menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang optimal. Menurut Haryoto (2019), etanol adalah pelarut yang cocok untuk digunakan untuk menganalisa nilai aktivitas antioksidan yang bersifat non polardengan metode DPPH. Hal ini didukung oleh Aminah (2017) dimana dijelaskan

bahwa etanol memiliki kelebihan dibandingkan dengan air dan metanol. Senyawa antioksidan yang mampu diekstrak dengan etanol lebih banyak dari pada pelarut seperti air dan metanol. Metanol dipilih karena memiliki struktur molekul kecil yang mampu menembus semua jaringan tanaman untuk menarik senyawa aktif keluar. Metanol dapat melarutkan hampir semua senyawa organik baik senyawa polar ataupun non polar dan juga sifatnya yang mudah menguap sehingga mudah dipisahkan dari ekstrak (Rahayu, 2015). Menurut Maria (2015), metanol berfungsi untuk melarutkan senyawa metabolit yang terkandung dalam sampel yang diuji. Salamah (2015) pada penelitiannya juga menjelaskan bahwa metanol adalah pelarut yang cukup baik untuk digunakan pada metode DPPH, terutama pada sampel yang mengandung senyawa flavonoid dan karotenoid.

Pada Tabel 8., dapat dilihat bahwa waktu inkubasi optimal pada metode DPPH terhadap antioksidan non polar adalah suhu ruang atau sebesar 37°C. Handayani (2014) menjelaskan bahwa suhu kamar adalah suhu inkubasi terbaik yang digunakan pada metode DPPH terutama pada sampel yang mengandung flavonoid dan karotenoid. Hal ini jugadidukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Nurma (2017) bahwa suhu ruang adalah suhu yang paling optimal dan menghasilkan nilai aktivitas antoksidan yang paling baik. Jika suhu yang digunakan terlalu panas maka akan menyebabkan peningkatan konsentrasi ekstrak tidak optimal bahkan mengalami penurunan. Selain itu, suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan hilangnya komponen bioaktif karena proses oksidasi, sedangkan suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan komponen bioaktif yang terestrak 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 Haryoto (2019) dimana waktu inkubasi optimal terhadap sampel vitamin E adalah selama 30 menit. Hal ini juga didukung oleh Handayani (2014) dimana waktu inkubasi yang paling optimal untuk digunakan terhadap sampel yang mengandung flavonoid dan

karotenoid adalah selama 30 menit. 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 flavonoid pada suatu sampel juga akan menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan yang ditandai dengan penurunan nilai  $IC_{50}$ .

Secara keseluruhan, dapat diamati bahwa metode DPPH cukup efektif dalam menganalisa nilai aktivitas antioksidan pada senyawa antioksidan non polar seperti vitamin E, flavonoid dan karotenoid. Secara keseluruhan, dapat diamati bahwa hasil pengujian nilai aktivitas antioksidan Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Bakti (2018) yang melakukan uji presisi terhadap metode DPPH. Hasil uji presisi yang didapat ditunjukkan dengan nilai RSD dari pengujian ini memiliki presisi yang baik yaitu simpangan baku  $\leq 2\%$ . Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah flavonoid. Menurut Harmita (2004), nilai simpangan baku relatif (RSD)  $< 2\%$  menunjukkan bahwa metode tersebut menunjukkan 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 non polar. 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. Linearitas dihitung berdasarkan persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi larutan standar yang didapatkan (Suhaili, 2018).

#### 4.1.2 METODE CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*)

Tabel 9. Uji Aktivitas Antioksidan Non Polar dengan Metode CUPRAC

No	Sampel	Jenis Antioksidan	Parameter			Waktu (menit)	Daya Antioksidan	Referensi
			Pelarut	Panjang Gelombang (nm)	Suhu (°C)			
1	Ekstrak batang kelor	Vitamin E	etanol	448	suhu ruang	30	4,82 mgTr/g ekstrak	(Haeria, 2018)
2	Ekstrak Daun Yakon (10, 15, 20, 25, 30 µg/mL)	Flavonoid	etanol	451	-	60	31407,79 Mmol/g	(Nugraha, 2017)
3	0,3 gr Daun Yodium	Flavonoid	etanol	450	-	30	0,784 mg/L	(Maryam, 2015)
4	Ekstrak etanol Batang Kelor (500 ppm)	Flavonoid	etanol	448	suhu kamar	30	4,82 mg/g	(Munadiah, 2017)
5	Ekstrak Klika Anak Dara <i>Croton oblongus</i> Burm (50,100,150, 200, 250µg/ml)	Karotenoid	metanol	452	suhu kamar	60	130 mg/L	(Awaludin, 2019)

Keterangan : Tr = *Total revenue*



Macam-macam pengujian nilai aktivitas antioksidan pada antioksidan non polar dengan metode CUPRAC dapat dilihat pada Tabel 9. Dapat dilihat bahwa terdapat berbagai macam sampel yang digunakan seperti ekstrak batang kelor, daun yakon daun yodium dan klika anak dara (*Croton oblongus* Burm).

Berdasarkan hasil review penelitian pada tabel 9., dapat dilihat pengujian dengan metode CUPRAC pada antioksidan non polar menghasilkan nilai yang cukup tinggi Parameter-parameter optimum yang digunakan adalah panjang gelombang 450 nm, pelarut etanol dan metanol, waktu inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.

Panjang gelombang optimum yang digunakan pada metode ini adalah 450 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Haeria (2018), bahwa panjang gelombang optimum yang digunakan pada metode CUPRAC adalah sebesar 450 nm. Nufus (2020) menambahkan bahwa panjang gelombang 450 nm adalah anjang gelombang yang optimum untuk menguji nilai aktivitas antioksidan dengan metode CUPRAC. Pelarut etanol dan metanol merupakan pelarut yang cukup baik untuk digunakan pada pengujian metode CUPRAC. Penggunaan pelarut yang tepat bertujuan untuk menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang optimal. Pada sampel yang mengandung vitamin E dan flavonoid, digunakan pelarut berupa etanol. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hidayah (2015) bahwa pengujian nilai aktivitas antioksidan terhadap sampel vitamin E dan flavonoid menunjukkan hasil yang lebih tinggi jika diuji dengan pelarut etanol. Hal ini diperkuat oleh penelitian Pratoko (2018) yang menggunakan sampel vitamin E murni dan flavonoid, dimana pelarut etanol cukup baik untuk digunakan pada metode CUPRAC. Aminah (2017) menjelaskan bahwa etanol memiliki kelebihan dibandingkan dengan air dan metanol. Senyawa antioksidan yang mampu diekstrak dengan etanol lebih banyak dari pada pelarut seperti air dan metanol. Untuk sampel yang bersumber dari jenis tanam-tanaman, etanol juga berfungsi untuk menghindari senyawa-senyawa lain seperti klorofil yang sebenarnya tidak memiliki aktivitas yang berarti namun berpotensi dapat menimbulkan masalah. Pada sampel yang mengandung senyawa karotenoid, digunakan pelarut berupa metanol. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Abdullah (2020), dimana pelarut metanol merupakan pelarut yang baik untuk digunakan untuk menguji nilai aktivitas antioksidan pada senyawa karotenoid. Metanol umumnya dipilih karena dapat melarutkan hampir

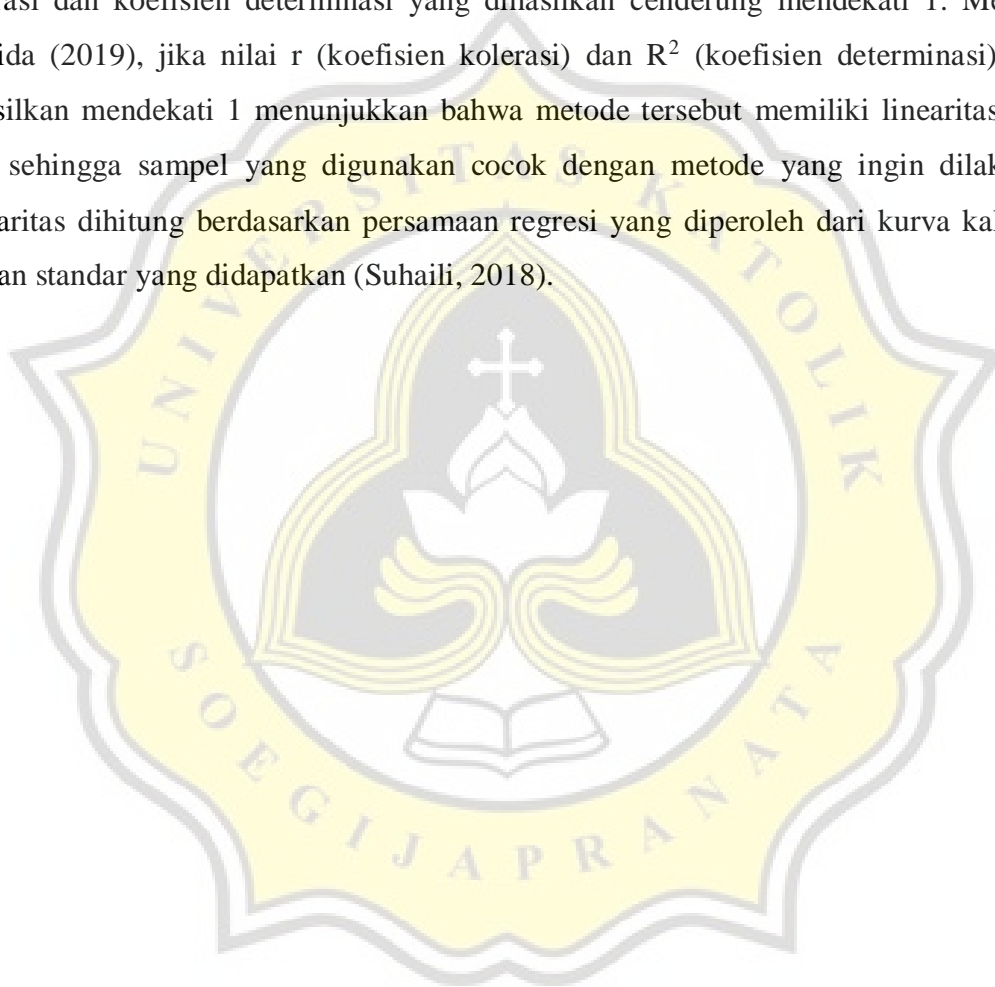
semua senyawa organik baik senyawa polar ataupun non polar dan juga sifatnya yang mudah menguap sehingga mudah dipisahkan dari ekstrak (Rahayu, 2015). Metanol memiliki struktur molekul kecil yang mampu menembus semua jaringan tanaman untuk menarik senyawa aktif keluar. Metanol merupakan pelarut yang mampu mengikat senyawa polar dan non polar, sehingga dapat melarutkan hampir semua senyawa organik baik yang bersifat polar maupun non polar. Hal ini dikarenakan methanol memiliki gugus polar (-OH) dan non polar (-CH) (Astarina, 2013).

Waktu inkubasi optimal yang digunakan pada metode ini adalah 30 menit. Patricia (2013) menyatakan bahwa waktu inkubasi optimal untuk metode CUPRAC adalah selama 30 menit. Hal ini diperkuat oleh Nufus (2020) dimana waktu inkubasi terbaik pada metode CUPRAC terhadap sampel antioksidan non polar adalah selama 30 menit. Namun, pada beberapa penelitian diatas, digunakan waktu inkubasi selama 60 menit. Djauhari (2016) menjelaskan bahwa lama waktu inkubasi 60 menit dapat 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, lama waktu inkubasi yang digunakan harus dikontrol dengan baik. 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 juga dapat menyebabkan rusaknya senyawa-senyawa yang terkandung dalam bahan, termasuk senyawa antioksidan yang terdapat didalamnya. Waktu inkubasi berbanding lurus dengan hasil ekstraksi dan jumlah rendemen yang dihasilkan sehingga akan mempengaruhi kadar antioksidan yang dihasilkan.

Suhu inkubasi optimal pada uji aktivitas antioksidan non polar dengan metode CUPRAC adalah suhu ruang. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Nufus (2020), dimana suhu inkubasi optimal pada sampel non polar adalah suhu ruang. Namun, penggunaan suhu harus dikontrol dengan baik, karena jika suhu yang digunakan tidak dikontrol dengan baik, maka akan menyebabkan peningkatan konsentrasi ekstrak tidak optimal bahkan mengalami penurunan.



Berdasarkan hasil review pada penelitian-penelitian tersebut, juga dapat diamati bahwa metode CUPRAC cukup efektif dalam mengukur nilai aktivitas antioksidan pada senyawa antioksidan non polar seperti vitamin E, flavonoid dan karotenoid. Hal ini sesuai dengan pernyataan Apak (2013), dimana metode ini tepat untuk menguji nilai aktivitas antioksidan pada senyawa-senyawa flavonoid dan fenolik. Kemudian, metode ini juga dapat mengukur hidrofilik dan lipofilik dari antioksidan misalnya,  $\beta$ -karoten dan  $\alpha$ -tokoferol (Apak *et al*, 2007). 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. Linearitas dihitung berdasarkan persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi larutan standar yang didapatkan (Suhaili, 2018).



### METODE FIC (*Ferrous Ion Chelating*)

Tabel 10. Uji Aktivitas Antioksidan Non Polar dengan Metode FIC

No	Sampel	Jenis Antioksidan	Parameter				Daya Antioksidan	Referensi
			Pelarut	Panjang Gelombang (nm)	Suhu (°C)	Waktu (menit)		
1	Ekstrak jamur lingzhi (100, 120, 140, 160, 180 µg/mL)	Vitamin E	etanol	511	-	10	204,39 µg/mL	(Utami, 2018)
2	Ekstrak bekatul beras hitam (18,33-50 ppm)	Vitamin E	etanol	562	-	10	32,96% - 39,73%	(Coky, 2014)
3	Ekstrak bekatul beras hitam (18,33-50 ppm)	Flavonoid	etanol	562	-	10	32,96% - 39,73%	(Coky, 2014)
4	Kuersetin (5,0 mg/L)	Flavonoid	-	562	25	10	LoD = 0,04 mg/mL LoQ = 0,12 mg/mL IC <sub>50</sub> = 1,44 mg/mL	(Maesaroh, 2018)
5	Ekstrak ubi Jalar Ungu (0,3 – 666,6 ppm)	Flavonoid	etanol	562	-	10	322,08 ppm (31,52 - 73,34%)	(Dewi, 2014)

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

Macam-macam pengujian nilai aktivitas antioksidan pada antioksidan non polar dengan metode FIC dapat dilihat pada Tabel 10. Dapat diamati terdapat berbagai macam sampel antioksidan non polar yang digunakan baik bahan murni seperti kuersetin ataupun hasil ekstrak dari bahan lain seperti ekstrak jamur lingzhi, bekatul beras hitam dan ubi jalar ungu.

Berdasarkan hasil review penelitian pada tabel 10., dapat dilihat pengujian nilai total antioksidan dengan metode FIC, menghasilkan nilai yang cenderung rendah. Penelitian Coky (2014) dengan sampel ekstrak bekatul beras hitam yang mengandung vitamin E menghasilkan persen penghambatan sebesar 32,96%-39,73%. Sebagai pembandingan, penelitian Widarta (2013) yang menggunakan sampel bekatul beras hitam yang juga diekstrak dengan pelarut etanol menghasilkan persen penghambatan sebesar 85,62%. Dari beberapa penelitian yang direview, hanya sampel kuersetin dengan kandungan senyawa flavonoid (5 mg/mL) yang menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang tinggi yaitu  $IC_{50} = 1,44$  mg/mL. Sebagai pembandingan, pada penelitian Maesaroh (2018) yang menggunakan sampel kuersetin dengan konsentrasi 5 mg/mL diuji dengan metode DPPH menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 2,44 mg/mL. Berdasarkan hasil pengamatan pada tabel 9., parameter-parameter optimum yang digunakan adalah panjang gelombang 562 nm, pelarut etanol, suhu inkubasi sebesar 37°C (suhu ruang) dengan waktu inkubasi selama 30 menit.

Panjang gelombang optimum yang digunakan pengujian nilai aktivitas antioksidan non polar dengan metode FIC adalah antara 562 nm. Hal ini didukung oleh Patel (2013), bahwa panjang gelombang optimum pada metode FIC adalah 562 nm. Pelarut etanol merupakan pelarut yang cukup baik untuk mengekstraksi sampel antioksidan non polar pada metode FIC. Saklani (2017) pada penelitiannya menjelaskan bahwa pelarut etanol adalah pelarut yang baik untuk digunakan pada metode FIC, terutama pada bahan non polar. Etanol merupakan pelarut yang cukup baik dalam mengekstraksi senyawa organik dari bahan alam dan dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder dengan sempurna serta memudahkan untuk menarik senyawa yang bersifat polar maupun non polar (Rahayu *et al.*, 2009)

Pada tabel 9., dapat dilihat waktu inkubasi yang digunakan adalah selama 10 menit. Patel (2013) mengatakan jika waktu inkubasi yang tepat untuk digunakan pada metode FIC adalah selama 10 menit. Semakin lama waktu inkubasi maka kontak antara sampel dengan pelarut akan lebih lama sehingga senyawa antioksidan yang dihasilkan dari sampel akan semakin meningkat. Pada penelitian oleh Maesaroh (2018), disebutkan bahwa suhu inkubasi optimal yang digunakan pada metode FIC adalah sebesar 25°C atau suhu ruang. Hal ini diperkuat juga oleh Patel (2013) jika suhu inkubasi pada metode FIC adalah suhu kamar.

Berdasarkan hasil review pada penelitian-penelitian pada tabel 10., juga dapat diamati bahwa pengukuran nilai aktivitas antioksidan non polar dengan metode FIC menunjukkan nilai aktivitas antioksidan yang cenderung rendah, sehingga dianggap kurang valid dalam menguji nilai aktivitas antioksidan non polar. Hal ini disebabkan karena metode ini memiliki tingkat sensitivitas yang cukup rendah dan daya kelatmya cukup kecil, sehingga nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan juga kurang optimal (Maesaroh, 2018). Namun, pada pengujian terhadap sampel kuersetin (5 mg/mL) yang mengandung senyawa flavonoid menghasilkan nilai RSD sebesar 0,05. Harmita (2004) dalam penelitiannya mengatakan bahwa nilai simpangan baku relatif (RSD) < 2% menunjukkan bahwa metode tersebut menunjukkan tingkat presisi yang tinggi dan dapat diterima dengan baik.

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

Tabel 11. Uji Aktivitas Antioksidan Non Polar dengan Metode ABTS

No	Sampel	Jenis Antioksidan	Parameter				Daya Antioksidan	Referensi
			Pelarut	Panjang Gelombang (nm)	Suhu (°C)	Waktu		
1	Ekstrak n-heksan rimpang jahe merah	Vitamin E	etanol	734	-	-	25,27 ppm	(Vifta, 2019)
2	Ekstrak etanol bunga brokoli (50 , 100, 150, 200 dan 250 µl)	Vitamin E	etanol	750	-	-	32,129 ppm	(Jumaetri, 2015)
3	Trolox	Vitamin E	metanol	734	30	12-16 jam	94,99 %	(Fitriana, 2015)
4	20 gr Daun jati putih + etanol 70% (1:2)	Flavonoid	etanol	750	-	12 jam	2,93 mg/ml	(Nur, 2019)
5	Ekstrak Buah Parijoto + Jahe merah	Flavonoid	etanol	740	-	14 menit	16,48 ppm	(Vifta, 2019)
6	Ekstrak bunga brokoli (50 , 100, 150, 200 dan 250 µl)	Flavonoid	metanol	750	-	-	32,129 ppm	(Jumaetri, 2015)
7	0,1 ml larutan ekstrak Pisang kapok (20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%)	Flavonoid	etanol	734	22-24	12-16 jam	IC <sub>50</sub> = 60,50	(Pantria, 2020)



Macam-macam pengujian nilai aktivitas antioksidan pada antioksidan non polar dengan metode ABTS dapat dilihat pada Tabel 11. Dapat dilihat terdapat bermacam-macam sampel antioksidan non polar yang digunakan, baik bahan murni seperti trolox ataupun hasil ekstrak dari bahan lain seperti ekstrak bunga brokoli, daun jati putih, buah pari-joto dan pisang kepok. Dapat dilihat juga konsentrasi bahan-bahan yang digunakan juga berbeda-beda.

Berdasarkan hasil review penelitian pada tabel 11., dapat dilihat bahwa pengujian nilai aktivitas antioksidan dengan metode ABTS, menghasilkan nilai yang cukup tinggi. Parameter-parameter optimum yang digunakan adalah panjang gelombang 734-750 nm, pelarut methanol dan ethanol, waktu inkubasi selama 12-16 jam pada suhu 30°C.

Panjang gelombang optimum yang digunakan pada hasil tabel 11. adalah 734-750 nm. Khanum (2015) mengatakan jika panjang gelombang optimum metode ABTS adalah 734-750 nm. Hal ini diperkuat oleh Burhan (2019) dimana panjang gelombang optimum yang dapat digunakan pada metode ABTS adalah 750 nm. Abdullah (2020) menambahkan bahwa panjang gelombang 734 nm adalah panjang gelombang optimum untuk mengukur absorbansi senyawa karotenoid dan flavonoid. Pelarut metanol dan etanol merupakan pelarut yang efektif untuk menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang optimal pada pengujian nilai aktivitas antioksidan non polar dengan metode ABTS. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Abdullah (2020), dimana metanol merupakan pelarut yang cukup baik dalam melarutkan senyawa flavonoid dan karotenoid. Lalu dalam penelitian oleh Wahyuni (2018), metanol mampu melarutkan senyawa vitamin E dengan baik. Metanol dipilih karena memiliki struktur molekul kecil yang mampu menembus semua jaringan tanaman untuk menarik senyawa aktif keluar. Metanol dapat melarutkan hampir semua senyawa organik baik senyawa polar ataupun non polar karena metanol memiliki gugus polar (-OH) dan non polar (-CH) (Astarina, 2013) dalam (Mohammad, 2017). Pelarut metanol bersifat mudah menguap sehingga mudah dipisahkan dari ekstrak (Rahayu, 2015). Setiawan (2018) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa pelarut etanol memiliki kemampuan yang baik dalam melarutkan senyawa vitamin E. Hal ini diperkuat oleh penelitian Burhan (2019), dimana etanol dapat melarutkan senyawa antioksidan non polar terutama senyawa flavonoid. Etanol merupakan pelarut yang cukup baik dalam mengekstraksi senyawa organik dari bahan

alam dan dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder dengan sempurna serta memudahkan untuk menarik senyawa yang bersifat polar maupun non polar (Rahayu *et al.*, 2009). Aminah (2017) menambahkan bahwa etanol memiliki kelebihan dibandingkan dengan air dan metanol. Etanol mampu mengekstrak lebih banyak senyawa antioksidan dari pada pelarut lain seperti air dan metanol.

Waktu inkubasi optimal yang digunakan pada penelitian-penelitian diatas adalah 12-16 jam. Burhan (2019) mengatakan jika waktu inkubasi optimum senyawa antioksidan non polar pada metode ABTS adalah 12 jam. Hal ini diperkuat oleh Setiawan (2018), bahwa waktu inkubasi terbaik pada metode ABTS adalah antara 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. Tetapi waktu inkubasi pada metode ABTS harus dikontrol dengan cermat, agar nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan lebih optimal. Suhu inkubasi optimal yang digunakan pada penelitian-penelitian diatas adalah suhu ruang. Hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Khanum (2015), dimana didalam penelitiannya yang menguji aktivitas antioksidan non polar digunakan suhu ruang (30°C) pada proses inkubasinya. Burhan (2019) juga mengatakan jika suhu inkubasi optimum pada metode ABTS adalah suhu ruang. Setiawan (2018) menambahkan jika proses inkubasi pada metode ABTS dilakukan pada suhu ruang dalam kondisi gelap.

Berdasarkan hasil review pada penelitian-penelitian pada tabel 11., dapat diamati bahwa ABTS merupakan metode yang cukup efektif dalam mengukur nilai aktivitas antioksidan pada senyawa non antioksidan polar seperti vitamin E, flavonoid dan karotenoid. Pada beberapa penelitian diatas, nilai koefisien kolerasi dan koefisien determinasi yang dihasilkan cenderung mendekati 1. Menurut Yefrida (2019), jika nilai  $R^2$  (koefisien determinasi) yang dihasilkan mendekati 1 menunjukkan bahwa metode tersebut memiliki linearitas yang baik sehingga sampel yang digunakan cocok dengan metode yang ingin dilakukan. Linearitas dihitung berdasarkan persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi larutan standar yang didapatkan (Suhaili, 2018).

Hal ini didukung oleh penelitian Ilham (2018) yang melakukan uji presisi terhadap metode ABTS dimana sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel dengan kandungan vitamin E dan karotenoid. Berdasarkan hasil uji presisi tersebut, dapat dikatakan bahwa ABTS merupakan metode yang cukup efektif dan valid untuk menguji nilai aktivitas antioksidan.



**TOTAL ANTIOKSIDAN NON POLAR**  
**METODE FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)**

Tabel 12. Uji Total Antioksidan Non Polar dengan Metode FRAP

No	Sampel	Jenis Antioksidan	Parameter			Waktu (menit)	Daya Antioksidan	Referensi
			Pelarut	Panjang Gelombang (mm)	Suhu ( °C)			
1	Vitamin E (4, 6, 8, 10 ppm)	Vitamin E	n-heksan	595	-	-	12,16 µm/Fe(II)/g pada sampel konsentrasi 4 ppm 18,83 µm/Fe(II)/g pada sampel konsentrasi 6 ppm 25,50 µm/Fe(II)/g pada sampel konsentrasi 8 ppm 33,83 µm/Fe(II)/g pada sampel konsentrasi 10 ppm.	(Kusmiati, 2018)
2	Vitamin E (6, 8, 10, 12, 14 ppm)	Vitamin E	etanol	596,2	-	95	9,41 µg/mL.	(Haryoto, 2019)
3	Trolox (20, 40, 60, 80, 100 ppm)	Vitamin E	etanol	594	37	10	11,04 ppm	(Setiawan, 2018)

4	Ekstraksi etanol Batang Kelor (0,05002 ; 0,05001 ; 0,05006 g)	Flavonoid	etanol	590	-	-	2,49 mg/g	(Munadiyah, 2017)
5	Ekstrak etanol Daun Binahong	Flavonoid	etanol	593	-	-	kering : 4,25 mmol/100g basah : 3,68 mmol/100g	(Selawa, 2013)
6	Madu Monoflora (bunga rambutan)	Flavonoid	-	-	-	-	1246 $\mu$ m/Fe(II)/g	(Chayati, 2014)
7	Ekstrak Bawang Putih	Flavonoid	-	594	suhu ruang	8 menit	1,022 mmol Fe (II)/g berat kering	(Yondra, 2014)
8	Ekstrak Buah Semangka	Karotenoid	metanol	750	50	20 menit	0,1329 mg AAE/g ekstrak	(Tahir, 2016)
9	Ekstrak Klika Anak Dara 1 mL ekstrak etanol Buah	Karotenoid	metanol	582	37	30 menit	419,3 mg/ml	(Awaludin, 2019)
10	Merah ( <i>Pandanus conoideus</i> Lam)	Karotenoid	etanol	757	50	20 menit	0,001392 g ATE/g ekstrak	(Wabula, 2019)
11	Ekstrak etanol Daun Kelor(60, 70, 80, 90, 100 ppm)	Karotenoid	etanol	720	50	20 menit	7,923 mg AAE/g ekstrak	(Maryam, 2015)



Macam-macam pengujian nilai total antioksidan pada antioksidan non polar dengan metode FRAP dapat dilihat pada Tabel 12. Dapat dilihat bahwa sampel yang digunakan adalah sampel yang mengandung senyawa antioksidan non polar baik bahan murni seperti trolox dan vitamin E murni ataupun hasil ekstrak dari bahan lain seperti ekstrak batang kelor, daun binahong, madu monoflora (bunga rambutan), bawang putih, buah semangka, klica anak dara, buah merah dan daun kelor.

Berdasarkan hasil review penelitian pada tabel 12., pengujian nilai total antioksidan dengan metode FRAP, menghasilkan nilai total antioksidan yang tinggi. Berdasarkan hasil pengamatan pada tabel diatas,beberapa parameter optimum yang digunakan adalah panjang gelombang 590-596 nm pada sampel yang mengandung vitamin E dan flavonoid, 695-757 untuk sampel yang mengandung karotenoid. Perbedaan ini dapat dikarenakan perbedaan karakteristik masing-masing senyawa yang terkandung dalam sampel. Kemudian pelarut etanol dan metanol, suhu inkubasi sebesar 37-50°C dengan waktu inkubasi selama 10-20 menit.

Beberapa penelitian menggunakan bahan yang sama seperti penelitian yang dilakukan oleh Kusmiati (2018) dan Haryoto (2019), dimana penelitian-penelitian tersebut menggunakan sampel berupa vitamin E murni dengan konsentrasi yang hampir identik.

Haryoto (2019) menggunakan sampel vitamin E dengan konsentrasi masing-masing sebesar 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm menghasilkan nilai total antioksidan ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 9,41  $\mu\text{g/mL}$ . Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah, pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah ethanol, waktu inkubasi selama 95 menit dan panjang gelombang yang digunakan adalah 596,2 nm. Berdasarkan dari nilai  $IC_{50}$  yang dihasilkan dapat disimpulkan bahwa daya aktivitas antioksidan pada sampel Vitamin E cukup kuat.

Kusmiati (2018) menggunakan sampel vitamin E dengan konsentrasi konsentrasi masing-masing sebesar 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm menghasilkan nilai total antioksidan sebesar 12,16  $\mu\text{m/Fe(II)/g}$  pada sampel konsentrasi 4 ppm ; 18,83  $\mu\text{m/Fe(II)/g}$  pada sampel konsentrasi 6 ppm ; 25,50  $\mu\text{m/Fe(II)/g}$  pada sampel konsentrasi 8 ppm ; dan 33,83  $\mu\text{m/Fe(II)/g}$  pada sampel konsentrasi 10 ppm. Pada penelitian ini, vitamin E digunakan sebagai pembanding/kontrol dari ekstrak lutein bunga kenikir

(*Tagetes erecta*). Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut berupa n-heksan, panjang gelombang 595 nm.

Berdasarkan hasil 2 penelitian yang menggunakan sampel antioksidan non polar berupa vitamin E dengan konsentrasi hampir identik, dapat dilihat bahwa penelitian yang menggunakan pelarut etanol menghasilkan nilai total antioksidan yang lebih tinggi. Menurut Syarif (2015), pelarut etanol merupakan pelarut yang efektif untuk digunakan menguji nilai total antioksidan non polar berupa vitamin E.

Panjang gelombang optimum yang digunakan pada penelitian nilai total antioksidan non polar dengan metode FRAP adalah 590-596 pada sampel vitamin E dan flavonoid, 757 nm pada sampel karotenoid. Syarif (2015) menjelaskan bahwa panjang gelombang maksimal untuk mengukur nilai total antioksidan vitamin E adalah 600 nm. Kumala (2021) mengatakan jika panjang gelombang optimum untuk mengukur nilai total antioksidan pada senyawa flavonoid adalah 588-598 nm. Suryanto (2019) menambahkan jika panjang gelombang optimum untuk mengukur total antioksidan senyawa flavonoid adalah 593 nm. Pelarut yang paling cocok untuk metode FRAP adalah etanol dan metanol merupakan pelarut yang cukup baik dalam menguji sampel vitamin E, flavonoid dan karotenoid. Hal ini didukung Chayati (2020) bahwa pelarut etanol memiliki kemampuan yang cukup baik untuk melarutkan senyawa flavonoid yang terkandung dalam sampel uji. Suryanto (2019) menambahkan jika pelarut etanol merupakan pelarut yang efektif untuk melarutkan senyawa antioksidan berupa flavonoid. Etanol dipilih karena memiliki titik didih yang rendah dan cenderung aman (Hakim, 2021). Hal ini dapat mengurangi resiko kerusakan yang terjadi pada senyawa antioksidan yang akan diuji nilai aktivitasnya. Pada beberapa penelitian dengan menggunakan sampel yang mengandung karotenoid, digunakan pelarut berupa metanol. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kumala (2021), dimana metanol adalah pelarut yang cukup baik untuk melarutkan senyawa karotenoid. Metanol umumnya dipilih sebagai pelarut karena memiliki kemampuan melarutkan senyawa yang bersifat polar maupun non polar, seperti alkaloid, steroid, flavonoid dan saponin dan dapat lebih banyak senyawa kimia yang terkandung pada sampel (Surahmida, 2019).

Suhu inkubasi optimal yang digunakan pada beberapa penelitian yang telah direview adalah suhu ruang atau sebesar 37-50°C. Fithriani (2015) pada penelitiannya yang menggunakan sampel yang mengandung flavonoid dan karotenoid menjelaskan bahwa suhu ruang (37°C) adalah suhu inkubasi yang cukup baik untuk digunakan pada metode FRAP. Pada penelitian yang dilakukan oleh Mamonto (2014), suhu inkubasi optimal yang digunakan pada metode ini adalah 50°C. 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. Waktu inkubasi optimal yang digunakan pada penelitian di atas adalah 10-20 menit. Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Yefrida (2015), dimana waktu inkubasi optimal metode FRAP adalah 10-30 menit, tergantung dari bahan dan banyaknya pelarut yang digunakan. Fithriyani (2015) menambahkan jika waktu inkubasi yang cocok pada metode FRAP adalah sekitar 10-20 menit. Lalu pada penelitian Mamonto (2014), waktu inkubasi optimal untuk menguji nilai total antioksidan non polar dengan metode FRAP adalah 20-30 menit. Waktu maksimal untuk proses inkubasi pada metode ini adalah selama 90 menit (Yefrida, 2015). 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 review pada penelitian-penelitian pada tabel 12., dapat diamati bahwa metode FRAP cukup efektif dalam mengukur nilai total antioksidan pada senyawa antioksidan non polar seperti vitamin E, flavonoid dan karotenoid. Pada beberapa penelitian di atas, nilai koefisien korelasi dan 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. Linearitas dihitung berdasarkan persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi larutan standar yang didapatkan (Suhaili, 2018). Yefrida (2015) melakukan uji presisi dalam penelitiannya yang menggunakan metode FRAP. Nilai uji presisi yang dihasilkan ditunjukkan dengan nilai  $RSD < 2\%$ . Berdasarkan nilai dari  $RSD$  yang didapatkan, dapat disimpulkan bahwa metode ini memiliki tingkat

presisi yang tinggi untuk menganalisis antioksidan total karena memiliki ketepatan ulangan yang baik. Namun pada beberapa hasil pengujian pada tabel 12., ditunjukkan hasil yang tidak terlalu tinggi. Hal ini dapat disebabkan karena metode FRAP memiliki matriks aquos, sehingga kurang efektif dalam melakukan pengukuran total antioksidan lipofilik yang bersifat non polar.



#### 4.2.2 METODE FOSFOMOLIBDAT

Tabel 13. Uji Total Antioksidan Non Polar dengan Metode Fosfomolibdat

No	Sampel	Jenis Antioksidan	Parameter			Daya Antioksidan	Referensi
			Panjang Gelombang (nm)	Suhu (°C)	Waktu (menit)		
1	ekstrak daun asam kecil ( <i>Oxalis corniculata</i> L).	Vitamin E	695	37	90	948,143 ± 30,148 mg/g ekstrak.	(Borah, 2012).
2	ekstrak daun asam kecil ( <i>Oxalis corniculata</i> L).	Vitamin E	695	37	90	137,36 mg/g.	(Borah <i>et al</i> , 2014).
3	Minyak Biji Jagung	Vitamin E	695	37	90	378.8±20.0 nmol $\alpha$ -tocopherol /g	(Prieto, 1999).
	Minyak Biji Kedelai					248±16.6 nmol $\alpha$ -tocopherol /g.	
4	Ekstrak daun suruhan (0,55 mg/mL)	Flavonoid	695	95	60	118,36 mg QE/mg ekstrak	(Salamah, 2014)
5	5000 mg/kg ekstrak biji jagung	Flavonoid	750	-	30	400 mg/kg	(Sembiring, 2016)
6	Ekstrak etanol <i>A. vulgaris</i> L	Flavonoid	-	-	-	9,84 mgQE/100mg ekstrak	(Budiana, 2017)
7	5000 mg/kg ekstrak biji jagung	Karotenoid	750	-	30	400 mg/kg	(Sembiring, 2016)
8	Ekstrak etanol <i>A. vulgaris</i> L	Karotenoid	-	-	-	0,13 mgBE/100 mg ekstrak	(Budiana, 2017)



Macam-macam pengujian nilai total antioksidan pada senyawa antioksidan non polar dengan metode fosfomolibdat dapat dilihat pada Tabel 13. Dapat dilihat bahwa terdapat bermacam-macam sampel yang digunakan. Kemudian konsentrasi masing-masing sampel yang digunakan juga bervariasi. Sampel-sampel tersebut berupa hasil ekstrak seperti ekstrak daun masam kecil, minyak biji jagung, minyak biji kedelai, daun suruhan dan biji jagung.

Berdasarkan hasil review penelitian pada tabel 13., dapat dilihat bahwa pengujian nilai total antioksidan dengan metode fosfomolibdat menghasilkan nilai yang cukup tinggi. Parameter-parameter optimum yang digunakan adalah panjang gelombang 695 dan 750 nm tergantung masing-masing bahan, suhu inkubasi sebesar 90-95°C dan suhu ruang (37°C) dengan waktu inkubasi selama 30 menit dan 90 menit tergantung dari masing-masing sampel yang digunakan.

Panjang gelombang optimum yang digunakan pada metode ini adalah antara 695 dan 750 nm. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Rondonuwu (2017), bahwa panjang gelombang optimum untuk menguji kapasitas antioksidan dengan metode fosfomolibdat terhadap senyawa non polar adalah 695 nm. Lumempouw (2012) dan Jeremy (2017) pada penelitiannya yang menggunakan vitamin E mengatakan jika panjang gelombang optimum metode fosfomolibdat adalah 750 nm. Ismail (2012) pada penelitiannya juga menjelaskan bahwa panjang gelombang optimum untuk mengukur total antioksidan pada senyawa flavonoid adalah 750 nm. Hal ini diperkuat oleh Susanty (2016), dimana panjang gelombang optimum yang digunakan untuk mengukur total antioksidan pada senyawa flavonoid dan karotenoid adalah 750-765 nm.

Suhu inkubasi optimal yang menghasilkan nilai terbaik adalah suhu ruang atau sebesar 90-95°C. Hal ini didukung oleh Ismail (2012) yang menjelaskan bahwa suhu 37°C (suhu ruang) adalah kondisi suhu yang baik untuk digunakan pada proses inkubasi sampel. Khadijah (2017) juga mengatakan bahwa suhu ruang adalah suhu inkubasi yang cukup baik untuk digunakan pada metode fosfomolibdat. Lumempouw (2012) mengatakan bahwa suhu 78-90 °C merupakan suhu inkubasi yang optimal untuk metode ini. Hal ini diperkuat oleh Rondonuwu (2017), dimana dikatakan jika suhu 90 °C adalah suhu inkubasi yang tepat untuk digunakan untuk proses inkubasi sampel pada metode fosfomolibdat. Ketika proses inkubasi yang dilakukan dengan suhu yang cukup tinggi,

maka suhu inkubasi yang digunakan harus dikontrol dengan baik, jika suhu yang digunakan terlalu panas maka akan menyebabkan peningkatan konsentrasi ekstrak tidak optimal bahkan mengalami penurunan.

Waktu inkubasi optimal yang digunakan pada penelitian-penelitian yang telah direview adalah selama 30 dan 90 menit. Ismail (2012) mengatakan bahwa waktu inkubasi optimum yang digunakan pada metode ini adalah selama 30 menit. Hal ini didukung penelitian oleh Jeremy (2017) yang menjelaskan bahwa waktu inkubasi selama 30 menit merupakan waktu inkubasi yang cocok untuk digunakan pada metode ini. Rondonuwu (2017) menyatakan bahwa waktu inkubasi yang optimal untuk digunakan pada metode ini adalah selama 90 menit. Hal ini diperkuat oleh Susanty (2016), dimana didalam penelitiannya dikatakan bahwa waktu inkubasi selama 90-120 menit merupakan waktu inkubasi yang cukup tepat untuk digunakan pada metode fosfomolibdat. Pada penelitian-penelitian pada tabel diatas, dapat dilihat bahwa senyawa karotenoid diuji dengan waktu inkubasi yang lebih singkat, yaitu selama 30 menit. Perbedaan lama waktu inkubasi yang digunakan dapat disebabkan oleh kekompleksan dan banyaknya jaringan sel yang harus dipecah untuk mengeluarkan senyawa antioksidan dari sampel. Proses pemecahan ini terjadi ketika adanya kontak langsung antara pelarut dengan sampel yang digunakan (Siregar, 2018). Semakin lama waktu inkubasi yang digunakan, 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 pada hasil beberapa hasil penelitian yang telah direview, dapat dilihat bahwa metode fosfomolibdat cukup efektif dalam mengukur nilai total antioksidan pada senyawa antioksidan non polar seperti vitamin E dan flavonoid. Sahala (2012) menjelaskan bahwa metode ini memiliki tingkat presisi yang cukup baik dalam

kemampuannya menguji nilai total antioksidan pada suatu bahan. Namun pada beberapa penelitian terhadap senyawa karotenoid, dihasilkan nilai total antioksidan yang lebih baik. Hal ini sesuai dengan teori yang dikemukakan oleh Choirunnisa (2016) dan Prieto (1999) bahwa metode ini memiliki korelasi yang buruk terhadap senyawa fenolik dan flavonoid (senyawa bioaktif), tetapi metode ini cukup baik dalam mendeteksi beberapa senyawa antioksidan seperti karoten, asam askorbat, dan *α-tocopherol*. Tetapi pada tabel 13., dapat diamati pengujian pada sampel yang mengandung vitamin E menghasilkan nilai total antioksidan yang relatif rendah. 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. Menurut Huang *et al* (2005), reagen yang digunakan pada metode ini bukan merupakan senyawa antiradikal yang efektif.

