Jurnal Farmasi (Journal of Pharmacy) Vol. 13 No. 1, Hal: 39-50
p-ISSN : 2302-7436; e-ISSN : 2656-8950

TINJAUAN ARTIKEL: MACAM-MACAM METODE PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

Article Review: Various Methods for Testing Antioxidant Activity

Tarisa Silvi Nugraheni[1], Iwan Setiawan[1*,] Annisa Ardila Putri[1,] Aprillia Wahyu Sukmawati[1], Latifah Nur Khasanah[1], Logaritma Khoirun Nisa[1], Lu'luin Nufus Hanyokro Putri[1], Sindy Kisma Wulandari[1], Syifa Amelia Riswana[1]

[1]Program Studi Sarjana Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Surakarta

*E-mail Korespondensi: iwan.setiawan02@stikesnas.ac.id

Submit : 18-11-2023 **Diterima** : 05-12-2023 **Terbit** : 30-03-2024

ABSTRAK

Antioksidan adalah zat yang melawan dan mencegah terbentuknya radikal bebas yang dapat merusak tubuh. Struktur kimia, sumber radikal bebas dan sifat fisikokimia preparat yang diperoleh dari sampel yang berbeda dapat menyebabkan hasil uji aktivitas antioksidan yang berbeda pula. Oleh karena itu, metode selektif untuk menganalisis aktivitas antioksidan diperlukan untuk jenis sampel tertentu. Metode pengujian aktivitas antioksidan meliputi metode CUPRAC, DPPH, FRAP, HPLC, ORACFL, CAA, amperometri, voltametri, ABTS. Dari hasil review ini dapat diperoleh kesimpulan bahwa pengujian antioksidan dengan metode DPPH menjadi metode yang paling banyak digunakan karena proses pengukurannya yang cepat, sederhana dan biayanya yang terjangkau dalam mengukur aktivitas antioksidan. Metode DPPH berprinsip pada radikal DPPH atom hydrogen didonorkan oleh senyawa antioksidan yang akhirnya menyebabkan DPPH menjadi bentuk tereduksi bersifat non radikal. Pengujian antioksidan menggunakan metode DPPH dibeberapa bidang seperti bidang analisis kosmetik untuk menangkal radikal bebas yang terbentuk pada lapisan kulit, pada bidang pengujian antioksidan terhadap tanaman yaitu untuk pengukuran radikal bebas untuk menunjukan bahwa ekstrak pada tanaman memiliki aktivitas antioksidan atau tidak dengan menggunakan metode DPPH.

Kata Kunci: Metode, Antioksidan, DPPH

ABSTRACT

Antioxidants are substances that fight and prevent the production of free radicals that can damage the body. The chemical structure, free radical sources, and physicochemical properties of preparations obtained from different samples can lead to different test results of antioxidant activity. Therefore, selective methods for analyzing antioxidant activity are needed for certain types of samples. Test methods for antioxidant activity include CUPRAC,

DPPH, FRAP, HPLC, ORACFL, CAA, amperometric, voltammetric, and ABTS methods. The result from review are Antioxidant testing using the DPPH method is the most widely used method for measuring antioxidant activity as it is a quick, easy, and inexpensive assay. The DPPH method is based on the principle that a hydrogen atom of the DPPH radical is donated by an antioxidant compound, ultimately transferring DPPH to its reduced, non-radical form. Antioxidant testing uses his DPPH method in the field of cosmetic analysis to prevent free radicals that form in layers of the skin. Subsequently, in plant antioxidant tests, especially free radical measurements, the DPPH method is used to determine whether plant extracts have antioxidant activity.

Keywords: *Method, Antioxidant, DPPH*

PENDAHULUAN

Radikal bebas memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan, membuat molekul tidak stabil dan sangat reaktif. Reaksi tersebut terus-menerus terjadi di dalam tubuh dan jika tidak dikendalikan akan menimbulkan penyakit seperti kanker, katarak, penuaan dini, penyakit jantung dan penyakit degeneratif lainnya. Senyawa yang dibutuhkan untuk menetralkan dan mencegah kerusakan akibat radikal bebas adalah antioksidan. Antioksidan dapat melengkapi kekurangan elektron yang dibutuhkan radikal bebas dan mencegah reaksi berantai radikal bebas (Setiawan, 2018)

Antioksidan dipercaya sebagai zat yang dapat mencegah oksidasi sehingga sel terlindungi dari bahaya radikal bebas yang disebabkan oleh metabolisme tubuh dan beberapa faktor eksternal. Secara kimiawi, antioksidan alami yang terdapat pada tumbuhan dan makanan terutama berasal dari golongan senyawa fenolik seperti flavonoid (quercetin), turunan *hydroxamate*, *coumarin*, vitamin, asam empedu dan vitamin C.

Peran antioksidan sangat penting bagi kesehatan tubuh manusia, karena tugasnya adalah mencegah dan menetralkan reaksi oksidatif yang melibatkan radikal bebas. Mekanisme penghambatan antioksidan biasanya terjadi pada reaksi awal atau penjalaran pada reaksi oksidasi lemak dan molekul lain di dalam tubuh dengan cara menyerap dan juga menetralkan radikal bebas atau memecah peroksida. Netralisasi ini terjadi melalui pemberian elektron sehingga ikatan menjadi lebih stabil, atau terjadi reaksi akhir dan reaksi radikal berhenti, atau tidak ada stres oksidatif di dalam sel.

Pengujian aktivitas antioksidan pada tumbuhan dan makanan secara umum dapat dilakukan dengan menggunakan metode air sebagai basisnya *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (*DPPH) (reaksi radikal bebas) dan *Ferric Reducing Antioksidan Power* (FRAP) (reduksi-oksidasi), kapasitas antioksidan pereduksi ion tembaga (CUPRAC), *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORACFL), *cellular antioxidant activity* (CAA) dan *2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-A-sulfonic acid* (ABTS). Bermacam ragam metode uji aktivitas antioksidan ini memberikan hasil pengujian yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh pengaruh struktur kimia antioksidan, sumber radikal bebas dan sifat fisikokimia dari berbagai preparat sampel. Oleh karena itu, sangatlah penting untuk menentukan mana metode yang paling tepat dan selektif untuk menganalisa aktivitas antioksidan pada jenis sampel tertentu (Maesaroh, Kurnia and Al Anshori, 2018).

METODE

Pada review artikel ini pencarian sumber literatur dilakukan secara *online* melalui situs *Google Scholar* dengan kata kunci "Metode Uji Antioksidan". Kriteria inklusi literatur yang digunakan yaitu jurnal *Internasional* yang dipublikasikan 10 tahun terakhir yakni tahun 2013 sampai 2023.

HASIL DAN PEMBAHASAN

I. Teknik Spectrometry

A. Metode CUPRAC

1. Larutan Pengujian CUPRAC

Untuk menyiapkan larutan $CuCl_2$, 0,4262 g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ditimbang dan ditempatkan dalam labu 250 mL. Serbuk kemudian dilarutkan dalam air sampai terbentuk noda tepi. *Buffer* yang digunakan adalah ammonium asetat dengan kondisi pH 7, dibuat dengan cara dilarutksn 19,27 gram NH_4Ac dalam labu ukur 250 mililiter kemudian ditepatkan dengan air suling sampai tanda batas. Selain itu, larutan neokuproin (Nc) dibuat dengan melarutkan 0,039 g didalam labu ukur 25 mL Nc dan mengencerkannya dengan etanol hingga p.a. (Maryam et al., 2016).

2. Penentuan λ Maksimum

Panjang gelombang dapat dihitung dengan menambahkan larutan 0,01 M $CuCl_2.2H_2O$, 0,0075 M Nc, 1 M buffer amonium asetat 1 M dan etanol ke dalam 0,1 ml air suling. Selain itu, absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Haeria, 2013). Siapkan larutan blanko dan baca absorbansinya. Larutan blanko, 0,01M $CuCl_2.2H_2O$, 0,0075M Nc, buffer amonium asetat 1M dan etanol AR, masing-masing satu mililiter ditempatkan dalam labu, kemudian ditambahkan 0,1 mililiter air suling. Kemudian, botol diinkubasi di tempat gelap selama 30 menit. Ketika larutan CUPRAC dituangkan ke dalam kuvet, absorbansi maksimumnya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada lamda (λ) maksimum yang diperoleh pada langkah sebelumnya (Haeria, 2013).

3. Kelebihan Metode CUPRAC

Mengenai metode CUPRAC, reagen CUPRAC memiliki daya reduksi yang rendah, reaksi cepat, reagen lebih stabil, dapat diperoleh dari reagen lain seperti DPPH dan ABTS, bisa digunakan untuk jenis antioksidan hidrofilik maupun lipofilik pada pH fisiologis, selain itu metode ini sederhana dan mudah diaplikasikan (Maryam et al., 2016)

4. Kekurangan Metode CUPRAC

Sulit untuk menerapkan metode ini karena suhu rendah sangat berpengaruh terhadap penurunan reproduksi pengujian (Ácsová, Martiniaková and Hojerová, 2019).

B. Metode DPPH

1. Prinsip Uji

Untuk mengetahui aktivitas antioksidan digunakan melalui kemampuan DPPH dalam menangkap radikal bebas. Cara kerjanya DPPH akan memberikan reaksi dengan dua cara yakni mekanisme donor atom hidrogen dan donor elektron, dimana DPPH yang bersifat radikal akan mengambil atom hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron.

2. Kelebihan dan Kekurangan Metode DPPH

Metode DPPH memiliki kelebihan yaitu proses pengukurannya lebih cepat, sederhana, dan juga murah. Salah satu kelemahan metode DPPH adalah radikal DPPH hanya dapat larut dalam pelarut organik (Liaudanskas *et.al.*, 2014).

C. Metode FRAP

1. Prosedur Pengujian

Larutan FRAP dibuat dengan 187 mg natrium asetat trihidrat, 270 mg besi klorida ($FeCl_3.6H_2O$), dan 150 mg *2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine* TPTZ. Serbuk natrium asetat trihidrat ditambahkan didalam 16 mL asam asetat (pH 3,6) dan dilarutkan dalam 250 mL air suling. Serbuk $FeCl_3.6H_2O$ dilarutkan dalam 100 mL akuades, sedangkan TPTZ dilarutkan dalam 40 mM HCl hingga 50 mL. Pereaksi FRAP dibuat dengan mencampurkan 25 mL larutan natrium asetat trihidrat, 2,5 mL larutan $FeCl_3.6H_2O$ 20 mM, 2,5 mL larutan TPTZ 10 mM dan kemudian menambahkan air suling hingga 100 mL. Reagen FRAP dan larutan sampel atau larutan standar dipipet dengan perbandingan volume 1:1, kemudian dimasukkan ke dalam 96-well-microplate. Mengukur absorbansi dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 593 nm.

2. Kelebihan Metode FRAP

Penggunaan metode lebih sederhana, cepat, tidak memerlukan alat khusus dan juga penyiapan pereaksinya mudah.

3. Kekurangan Metode FRAP

Kurang stabilnya reagen, sehingga wajib membuat reagen baru dan segera digunakan. Selain itu, tidak spesifiknya metode FRAP bila senyawa lain tidak mengandung antioksidan.

D. Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Kapasitas Penyerapan Radikal Oksigen (ORACFL)

1. Prosedur Pengujian

Kapasitas antioksidan ditentukan menggunakan metodologi fluoresensi ORAC (ORAC-FL). 61–65 Analisis dilakukan menggunakan pembaca pelat polistiren putih 96-sumur (EnSpire multimode PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Reaksi dilakukan dalam buffer fosfat 75 mM (pH 7,4). Sampel dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit dengan 150 µL larutan fluorescein (40 nM, konsentrasi akhir). Fluoresensi terdaftar dengan panjang gelombang eksitasi 485/20 nanometer dan filter emisi 528/20 nanometer pada suhu konstan 37°C dalam pembaca lempeng sinergi HT multideteksi (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Kurva kalibrasi digunakan dengan rentang konsentrasi antara 3 dan 20 µm.

2. Kelebihan Metode ORACFL

Pengukuran akan lebih baik terhadap total aktivitas antioksidan karena kemampuannya dalam pengujian antioksidan *hipophilic* dan *lipophilic*.

3. Kekurangan Metode ORACFL

Suhu sangat berpengaruh dalam pengujian, suhu rendah dapat mengurangi reproduktifitas pengujian.

II. Teknik Electrochemical Techniques

A. Metode Aperometry

Metode amperometri bergantung pada pengukuran arus sebagai hasil dari pengaplikasian potensial *(applied potential)* saat terjadi polarisasi pada indikator elektroda atau elektroda kerja *(working electrode)*. Amperometri sangat penting

untuk pembuatan sensor kimia. Pada tahun 1956, LC Clark mengembangkan sensor amperometri pertama untuk melarutkan oksigen dalam darah. Sensor glukosa adalah contoh amperometer lainnya. (Oliveira et al., 2016). Prinsip aperometry yaitu oksidasi elektrokimia atau reduksi spesies elektroaktif dengan menerapkan potensial yang sesuai dari elektroda yang sesuai menghasilkan arus anodik atau katodik keadaan tunak. Namun, penting untuk dicatat bahwa arus yang diukur secara amperometrik jelas berbeda dari yang diukur dalam apa yang disebut "sel galvanik", yang tidak memerlukan aplikasi potensial. Dalam amperometri, arus yang dihasilkan dari reaksi berbanding lurus dengan konsentrasi analit. (Amine and Mohammadi, 2018).

Karakteristik pengukuran aperometry yaitu memberikan kemampuan untuk membedakan secara selektif antara sejumlah spesies elektroaktif dalam larutan dengan pemilihan yang bijaksana dari potensial yang diterapkan dan/atau pemilihan bahan elektroda. Dalam kasus dimana potensial nonspesifik diterapkan, arus yang dihasilkan mungkin mengandung kontribusi dari beberapa spesi elektroaktif, dengan jumlah spesi teroksidasi cenderung meningkat dengan potensial yang semakin positif dan jumlah spesi tereduksi meningkat semakin negatif potensial yang diterapkan. Jadi, untuk menghindari interferensi, penerapan potensial rendah dalam kisaran -0,2 V hingga + 0,2 V sangat diperlukan untuk deteksi analit. Atas dasar ini, penggunaan mediator yang memiliki potensial redoks rendah sangat dianjurkan. Misalnya, oksidasi langsung hidrogen peroksida memerlukan potensial + 0,65 V versus Ag/AgCl pada elektroda platina dan pada elektroda kaca karbon. Namun, reaksi dengan mediator Prussian Blue memungkinkan penentuan bebas interferensi dilakukan pada 0 V.

Karena potensi dalam amperometri tidak dipindai, voltammogram harus diperoleh dari eksperimen terpisah. Namun, potensial yang diterapkan harus sedikit lebih besar dari arus voltametri maksimum analit dan di daerah dengan minimal arus sisa dari elektrolit dan elektroda kerja serta harus dilakukan di dalam jendela potensial bahan elektroda. Dengan demikian, dalam media berair, rentang potensial yang tersedia dibatasi di daerah potensial positif (anodik) dengan oksidasi elektrolit atau air menjadi oksigen dan di daerah potensial negatif (katodik) dengan reduksi elektrolit atau pembebasan hidrogen. Jendela potensial ini tergantung pada bahan elektroda seperti yang ditunjukkan pada tabel berikut :

Tabel 1. Contoh Jendela Potensial sebagai Fungsi Material Elektroda Kerja

Electrode material	*Potential window (vs. SCE)*	*Advantages and limitations*
Glassy carbon	−0.8 V to +1.2 V (pH 4.5)	Wide potential range, low background current, inexpensive
Carbon paste	−1.6 V to +1.1 V (pH 4.5)	Wide potential range, low background current Inexpensive Unstable in flow cells and cannot be used in organic solvents
Mercury	−2 V to +0.4 V (pH = 4.5) −1.8 V to +0.25 V in acid or −2.3 V in basic media	Excellent cathodic window Limited anodic window due to mercury oxidation Highly toxic
Platinum	−0.5 V to +1.2 V (pH 4.5)	Available wire, flat plate and tube, large range of sizes Low hydrogen overvoltage so cathodic potential range limited Expensive
Boron-doped diamond	−1 V to +2.5 V (pH = 2)	An extremely wide potential window in aqueous and nonaqueous electrolytes Excellent anodic window An inert surface with low adsorption properties Very low background current Highly expensive

Pemilihan komposisi elektrolit pendukung yang hati-hati juga dapat berguna dalam memperluas jendela potensial metode amperometrik. Dalam kasus di mana reduksi oksigen mengganggu, penghilangannya dengan membersihkan larutan dengan gas inert seperti nitrogen atau argon mungkin diperlukan.

Amperometri adalah metode elektrokimia yang digunakan untuk mengukur arus listrik yang terjadi ketika reaksi redoks terjadi pada elektroda. Dalam konteks pengujian antioksidan, amperometri dapat digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan dalam suatu sampel (Hickey et al., 2016).

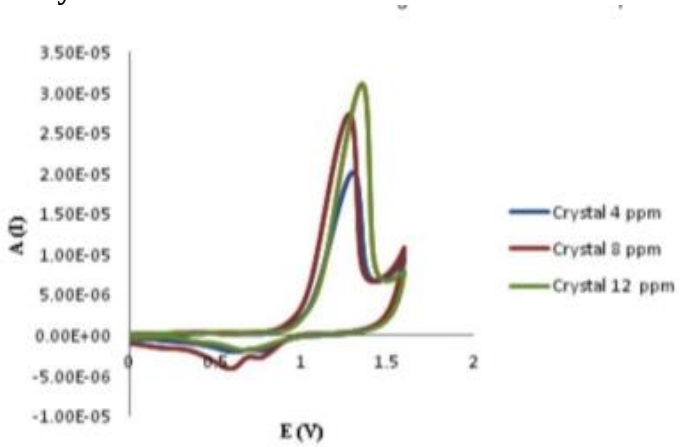
Kelebihan Metode Amperometri :

1. Sensitivitas Tinggi: amperometri memiliki sensitivitas tinggi terhadap perubahan listrik, maka dapat mendeteksi aktivitas antioksidan dalam sampel dengan akurasi tinggi.
2. Selektivitas: amperometri digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan spesifik, dengan memilih elektroda yang cocok dan parameter pengukuran yang tepat. Hal ini memungkinkan pengujian antioksidan yang lebih spesifik dan akurat.
3. Analisis Real-Time: amperometri memungkinkan pengukuran secara langsung dan real-time terhadap aktivitas antioksidan dalam sampel. Hal ini memungkinkan pemantauan yang cepat dan efisien terhadap respons antioksidan terhadap berbagai kondisi percobaan.
4. Kompatibilitas dengan Sampel yang Beragam: amperometri dapat digunakan untuk menguji antioksidan dalam berbagai jenis sampel, termasuk makanan, minuman, suplemen, dan produk farmasi. (El Harrad *et al.*, 2016)

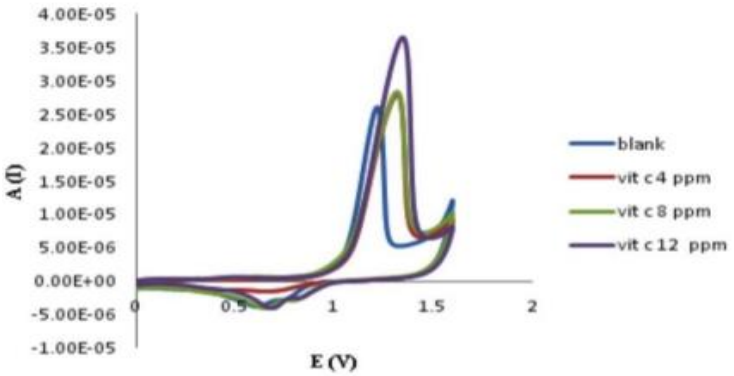
Kelemahan Metode Amperometri :

1. Keterbatasan Kestabilan Elektroda: Elektroda yang digunakan dalam amperometri dapat mengalami kerusakan atau penurunan kinerja seiring waktu. Hal ini dapat mempengaruhi akurasi dan keandalan hasil pengukuran.
2. Pengaruh Interferensi: Beberapa senyawa dalam sampel dapat menyebabkan interferensi dan mengganggu respons amperometri, sehingga mempengaruhi hasil pengukuran aktivitas antioksidan yang sebenarnya.
3. Persiapan dan Perawatan Elektroda: Elektroda yang digunakan dalam amperometri memerlukan persiapan dan perawatan yang cermat. Proses pembersihan, kalibrasi, dan penggantian elektroda harus dilakukan dengan tepat untuk memastikan kinerja yang optimal.
4. Keterbatasan dalam Deteksi Senyawa Tertentu: Amperometri memiliki keterbatasan dalam deteksi beberapa jenis senyawa antioksidan. Beberapa senyawa mungkin tidak menghasilkan respons yang cukup kuat atau terdeteksi oleh metode ini.
5. Hilangnya sensitivitas deteksi secara bertahap dapat terjadi karena reaksi elektrokimia heterogen yang terjadi pada antarmuka antara permukaan elektroda dan larutan. Ini terjadi ketika produk reaksi diserap ke permukaan elektroda dan memblokir transfer elektron
5. Penurunan kualitas permukaan elektroda dan peningkatan kebisingan dasar. (El Harrad et al., 2016)

B. Metode Voltammetry



Gambar 1. Voltammogram silklik RNV-1 yang direkam pada elektroda Pt



Gambar 2. Voltammogram silklik asam askorbat yang direkam pada elektroda Pt

Voltamet merupakan salah satu metode pengukuran yang bersifat elektrokimia sehingga ditampilkannya hubungan antara arus atau tegangan. Pengukuran voltametri didasarkan variasi tegangan awal dan akhir. Menurut Gina Barbosa (2018). *Cyclic Voltammetry* (CV) telah digunakan dalam mengevaluasi kapasitas antioksidan total (terintegrasi) dari antioksidan dengan berat molekul rendah dalam plasma manusia, jaringan hewan dan tumbuhan yang dapat dimakan. Cyclic Voltammetry (CV) kelebihan cepat, sederhana, tidak memerlukan reagen atau pelarut kimia canggih dan persiapan sampel khusus atau canggih.memberikan daya pereduksi total sampel tanpa perlu mengukur antioksidan spesifik, Metodologi CV cocok untuk studi skrining dan sensitivitasnya cukup untuk menentukan konsentrasi fisiologis antioksidan fisiologis antioksidan. (Barbosa, Gomez and Inutan, 2018)

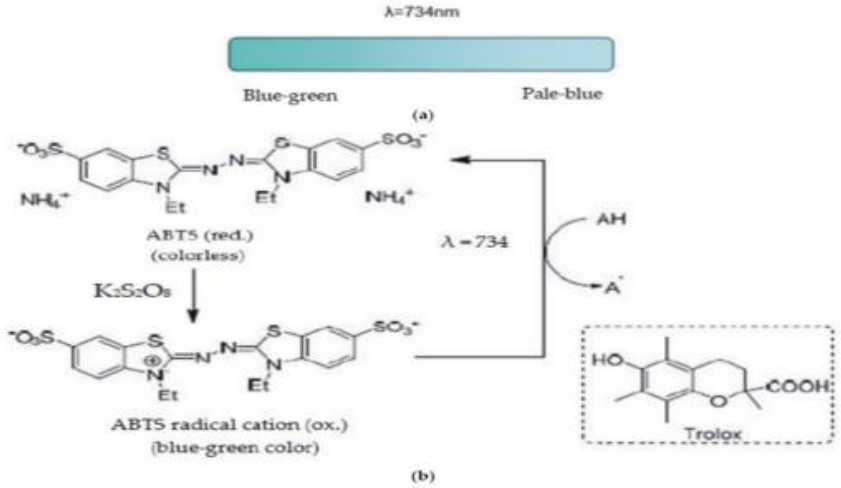
III. Teknik Chromatography

A. Metode HPLC-ABTS

Menurut (Lee et al., 2012) Uji kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC)-ABTS+online menggunakan pemisahan dan identifikasi. Teknik ini mampu dengan cepat mendeteksi senyawa pembersih radikal dengan persiapan sampel minimum dan telah diterapkan pada evaluasi komposisi antioksidan dalam buah dan sayuran.

Uji menggunakan metode HPLC-ABTS dilakukan untuk diukurnya kapasitas antioksidan dalam menetralkan kation radikal stabil *2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid)* (ABTS•+), menghasilkan kromofor biru-hijau yang daya serap maksimumnya pada 734 nanometer, menurunnya intensitas ketika

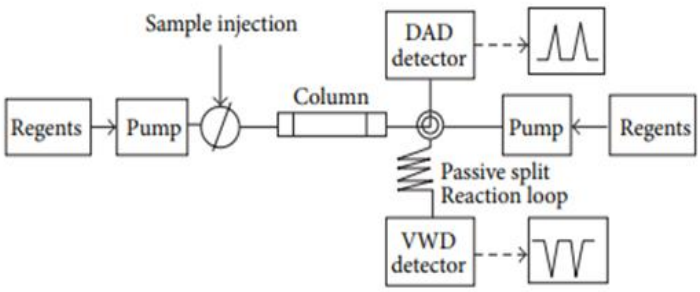
ada antioksidan. ABTS•+ dapat diproduksi dari ABTS dengan adanya agen antioksidan yang kuat (Munteanu dan Apetrei, 2021). Laju perubahan warna biru-hijau, dihitung sebagai penurunan absorbansi tiba-tiba menjadi 734 nm, laju ini bergantung pada durasi reaksi, aktivitas antioksidan intrinsik, dan konsentrasi sampel. Dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 3. Variasi warna pada pengujian ABTS

1. Prosedur Pengujian

Setiap sampel murni disuntikkan ke sistem Dionex Ultimate 3000 HPLC *(Thromo Scientific).* Volume injeksi adalah 10 L, dan laju alir fase gerak adalah 1 ml/menit. Panjang gelombang detektor UV ditetapkan pada 203, 254, dan 320 nm. Komposisi fase gerak adalah sebagai berikut: A, air/ asam trifluoroasetat = 99,9/0,1, vol%, dan B asetonitril 100%. Run time adalah 70 menit dan program pelarut adalah metode gradien linier (90: 10–60: 40, A: B vol%). Gambar 2 merupakan skema yang menunjukkan kopling online HPLC ke DAD *(Dioda Array Detector)* dan pengujian ABTS aliran kontinu. HPLC online kemudian tiba di bagian "T", di mana ABTS ditambahkan. Laju alir ABTS ditetapkan pada 0,5 mL/menit yang dialirkan oleh Pompa Dionex Ultimate 3000. Setelah pencampuran menyeluruh pada suhu 40^{o}C dengan loop 1 mL, absorbansi diukur menggunakan detektor VIS pada 734 nm. Data kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak Chromeleon 7 (Lee *et al.*, 2015).



Gambar 4. Skema penyaringan online sistem HPLC-ABTS

2. Kelebihan ABTS (Munteanu and Apetrei, 2021)

a. Tes TEAC menentukan jenis antioksidan, karena radikal ABTS+ bereaksi cepat dengan antioksidan sintetik dan alami dalam bahan makanan seperti fenol, asam amino, peptida, vitamin E dan C.
b. Tes antioksidan TEAC digunakan pada rentang pH yang luas, tetapi dalam banyak kasus aktivitas antioksidan sampel dapat diukur untuk mempengaruhi pH karena mekanisme reaksi, misalnya pada transfer elektron dipengaruhi oleh kondisi asam.
c. Kelarutan ABTS•+ dalam lingkungan buffer dan organik dapat menyebabkan pengaruh dalam metode ini untuk mengukur aktivitas antioksidan hidrofilik dan lipofilik. menghasilkan pengukuran yang akurat dari kapasitas produk antioksidan.
d. Pengujian TEAC murah dan sederhana secara operasional

3. Kelemahan ABTS (Munteanu and Apetrei, 2021)

Uji kinetika reaksi yang ada pada uji TEAC kurang spesifik, karena zat uji bereaksi dengan zat pengoksidasi, enzim dan juga kation radikal, yang menyebabkan kelebihan nilai. Sementara tes perubahan warna dapat mengatasi masalah ini, kerugian lain terjadi karena masalah prosedur dan mekanisme.

a. TEAC juga telah ditentang karena kurangnya relevansi biologis karena penggunaan kation radikal ABTS buatan yang tidak ditemukan dalam makanan atau sistem biologis.
b. Banyak senyawa fenolik memiliki potensial redoks yang rendah sehingga dapat bereaksi dengan ABTS•+. Selain itu, reaksi TEAC mungkin berbeda untuk reaksi lambat, dan mungkin perlu waktu lama untuk mencapai titik akhir. Dalam kasus tersebut, menggunakan titik akhir durasi pendek (4 atau 6 menit), dapat menyebabkan kapasitas antioksidan tidak akurat karena terbaca sebelum reaksi selesai.

B. Metode HPLC-FRAP

Metode *FRAP (Ferric Reducing Antioksidan Power)* merupakan metode untuk menentukan kandungan antioksidan secara spektrofotometri, didasarkan reduksi kompleks Fe^{3+} analog ferroin dari tripyridyltriazine menjadi kompleks Fe $(TPTZ)^{3+}$ $Fe^{2+,}$ Fe $(TPTZ)^{2+,}$ yang warnanya intens akibat aksi antioksidan asam. Hasil pengujian diinterpretasikan menggunakan meningkatnya absorbansi pada panjang gelombang 593 nm. Selain itu, dapat disimpulkan bahwa jumlah Fe^{2+} dalam mikromolekul sebanding dengan antioksidan biasa. Pencampuran reagen FRAP dengan ekstrak sampel digunakan untuk menentukan nilai kapasitas antioksidan (TAC) sampel (Chusak et al., 2018).

1. Keuntungan Metode HPLC-FRAP

Aplikasinya cukup sederhana dan cepat, tidak diperlukan alat khusus dan reagennya juga mudah disiapkan (Chusak et al., 2018).

2. Kekurangan Metode HPLC-FRAP

Reagennya tidak stabil, harus selalu baru dan harus digunakan segera. Metode ini tidak spesifik dalam menemukan senyawa lain yang tidak mengandung antioksidan tetapi memiliki potensi reduksi yang rendah seperti $Fe^{3}+/Fe^{2+}$ namun dapat terdeteksi.

C. Metode HPLC-CUPRAC

Reagen Cu (II)-neocuproin (Cu (II)-$(Nc)_2$) yang digunakan dalam metode HPLC-CUPRAC bertindak sebagai oksidan kromogenik, memungkinkan pengukuran reduksi ion Cu (II). Metode ini sangat populer karena mudah dilakukan, murah, reagen yang digunakan bersifat selektif dan memiliki daya reduksi yang rendah.

1. Kelebihan HPLC-CUPRAC

Menurut (Karaman et al., 2013) CUPRAC memiliki beberapa kelebihan sebagai metode uji aktivitas antioksidan, antara lain:

a. Identifikasi dan pengukuran antioksidan yang akurat: CUPRAC dapat mengidentifikasi dan mengukur semua antioksidan yang terkandung dalam sampel dengan benar menggunakan HPLC.
b. Kompatibilitas dengan campuran nyata: Meskipun tidak ada korespondensi satu-ke-satu antara hasil eksperimental CUPRAC dan hasil komputasi HPLC-CUPRAC dari campuran nyata seperti jus apel, CUPRAC dapat dianggap berhasil jika persentase tinggi dari absorbansi CUPRAC yang diamati dari campuran nyata dapat dikompensasi dengan prosedur komputasi HPLC-CUPRAC.
c. Penggunaan dalam mengenali nilai antioksidan nutrisi: Hasil dari penggunaan metode CUPRAC dapat berguna dalam mengenali nilai antioksidan nutrisi dari jus apel yang diproduksi secara komersial, serta membandingkan kapasitas antioksidannya untuk kemungkinan manfaat kesehatan melalui diet.

2. Kekurangan HPLC-CUPRAC

(Karaman *et al.*, 2013) mengungkapkan bahwa ada beberapa keterbatasan metode CUPRAC, antara lain:

a. Sensitivitas terhadap pH: Metode CUPRAC sensitif terhadap perubahan pH, dan variasi pH dapat mempengaruhi hasil pengujian.
b. Penerapan terbatas pada antioksidan non-fenolik: Metode CUPRAC terutama dirancang untuk mengukur aktivitas antioksidan senyawa fenolik. Ini mungkin tidak cocok untuk mengukur aktivitas antioksidan senyawa non-fenolik.
c. Kurangnya spesifisitas: Metode CUPRAC mengukur kapasitas antioksidan keseluruhan sampel tetapi tidak memberikan informasi tentang antioksidan spesifik yang ada dalam sampel.
d. Interferensi dari senyawa lain: Beberapa senyawa, seperti gula pereduksi dan ion logam, dapat mengganggu uji CUPRAC dan menyebabkan hasil yang tidak akurat.
e. Kurangnya standarisasi: Ada kekurangan protokol standar untuk metode CUPRAC, yang dapat menyebabkan variasi hasil antara laboratorium yang berbeda.

KESIMPULAN

Antioksidan adalah zat yang mampu menghambat pembentukan radikal bebas yang berbahaya untuk tubuh. Pengujian antioksidan dapat dilakukan menggunakan beberapa metode. Beberapa metodenya seperti metode CUPRAC, DPPH, FRAP, ORACL, CAA APEROMETRI, VOLTAMETRY, HPLC-ABTS, HPLC-FRAP, HPLC-CUPRAC. Metode pengujian antioksidan dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa teknik pengujian

yang berbeda. Diantara beberapa teknik pengujian antioksidan, metode DPPH merupakan metode yang paling umum digunakan untuk menganalisis aktivitas antioksidan suatu sampel uji. Dalam pengujian antioksidan, metode DPPH didasarkan pada prinsip bahwa senyawa antioksidan mendonorkan atom hidrogennya ke radikal DPPH, yang pada gilirannya menciptakan bentuk tereduksi DPPH, yang bukan merupakan radikal. Hasil uji yang berbeda dapat dilihat dengan banyak metode pengujian aktivitas antioksidan yang beragam. Hal ini disebabkan oleh pengaruh struktur kimia antioksidan, sumber radikal bebas dan sifat fisikokimia dari berbagai preparat sampel. Oleh karena itu, metode analisis uji aktivitas antioksidan dapat ditentukan secara tepat dan selektif untuk jenis sampel yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

Ácsová, A., Martiniaková, S. and Hojerová, J. (2019) 'Selected *in vitro* methods to determine antioxidant activity of hydrophilic/lipophilic substances', *Acta Chimica Slovaca*, 12(2), pp. 200–211. Available at: https://doi.org/10.2478/acs-2019-0028.

Amine, A. and Mohammadi, H. (2018) *'Amperometry',* in Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, p. B9780124095472142000. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14204-0.

Barbosa, G.B., Gomez, E. and Inutan, E.D. (2018) *'Cyclic Voltammetry and Spectrophotometric Determination of Antioxidant Activities of Selected Ginger Species',* Asian Journal of Biological and Life Sciences, 7(3), pp. 98–104. Available at: https://doi.org/10.5530/ajbls.2018.7.12

Chusak, C. et al. (2018) *'Acute effect of Clitoria ternatea flower beverage on glycemic response and antioxidant capacity in healthy subjects: a randomized crossover trial',* BMC Complementary and Alternative Medicine, 18(1), p. 6. Available at: https://doi.org/10.1186/s12906-017-2075-7.

El Harrad, L.; Amine, A. Amperometric Biosensor Based on Prussian Blue and Nafion Modified Screen-Printed Electrode for Screening of Potential Xanthine Oxidase Inhibitors From Medicinal Plants. Enzyme Microb. Technol. 2016, 85, 57–63. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.01.006.

Haeria, H. (2013). *Penetapan Kadar Flavanoid Total dan Uji Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Unggu (Graftophylum pictum L.) Griff).* Alauddin Makasar. Vol.1; No.1. Jurnal Farmasi FIK Alauddin Makasar, 1(1). https://doi.org/10.24252/jurfar.v1i1.2088

Hickey, D. P.; Reid, R. C.; Milton, R. D.; Minteer, S. D. A Self-Powered *Amperometric Lactate Biosensor Based on Lactate Oxidase Immobilized in Dimethylferrocene-Modified LPEI. Biosens.* Bioelectron. 2016, 77, 26–31

Karaman, Ş. *et al.* (2010) 'Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay', *Food Chemistry*, 120(4), pp. 1201–1209. Available at: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.065.

Lee, H.J. *et al.* (2012) 'Online high performance liquid chromatography (HPLC)-ABTS+ based assay and HPLC-electrospray ionization mass spectrometry analysis of antioxidant phenolic compounds in Salsola komarovii', *Journal of the Korean*

Society for Applied Biological Chemistry, 55(2), pp. 317–321. Available at: https://doi.org/10.1007/s13765-012-1153-2.

Lee, K.J. *et al*. (2015) 'Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Determination of One Hundred Kinds of Pure Chemical Compounds Using Offline and Online Screening HPLC Assay', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, pp. 1–13. Available at: https://doi.org/10.1155/2015/165457.

Liaudanskas, et al. (2014). *Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Malus domestica Leaves*. The Scientific World Journal, 1-10.

Maesaroh, K., Kurnia, D. and Al Anshori, J. (2018) 'Perbandingan Metode Uji Aktivitas Antioksidan DPPH, FRAP dan FIC Terhadap Asam Askorbat, Asam Galat dan Kuersetin', *Chimica et Natura Acta*, 6(2), p. 93. Available at: https://doi.org/10.24198/cna.v6.n2.19049.

Maryam, S. M., Pratama, R. Y., Effendi, N., & Naid, T. (2016). *Analisis Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Daun Yodium (Jatropha multifidi L.) dengan Metode Cuprac Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC).* Jurnal Fitofarmaka Indonesia 2(1).

Munteanu, I.G. and Apetrei, C. (2021) *'Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review', International Journal of Molecular Sciences,* 22(7), p. 3380. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms22073380.

Oliveira, G.K.F. et al. (2016) *'Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity',* Food Chemistry, 192, pp. 691– 697. Available at: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.064.

Setiawan, F. (2018) '*Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kayu Secang (Caesalpinia sappan) Menggunakan Metode DPPH, ABTS, dan FRAP'*, 2(2).