

PERBANDINGAN BERBAGAI METODE PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN (DPPH, ABTS DAN FRAP) PADA TEH HITAM (*Camellia sinensis*)

Comparison of Various Methods for Testing Antioxidant Activity (DPPH, ABTS, and FRAP) on Black Tea (Camellia sinensis)

Zerlinda Theafelicia, Siti Narsito Wulan*

¹ Departemen Ilmu Pangan dan Bioteknologi - Fakultas Teknologi Pertanian - Universitas Brawijaya
Jl. Veteran - Malang 65145

Penulis korespondensi, email: wulan_thpub@ub.ac.id

Disubmit: 10 Januari 2023

Direvisi: 28 April 2023

Diterima: 29 April 2023

ABSTRAK

Senyawa antioksidan berperan dalam menghambat atau menunda reaksi oksidasi molekul dengan cara memperlambat proses inisiasi atau propagasi reaksi oksidasi berantai. Hasil pengujian aktivitas antioksidan dapat bervariasi karena perbedaan struktur kimiawi antioksidan, sumber radikal bebas, dan sifat fisikokimia dari sampel yang diuji. Senyawa yang mengandung radikal bebas memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dan bersifat reaktif sehingga dapat merusak sel dan jaringan bila terakumulasi dalam tubuh manusia. Terdapat antioksidan alami dan sintesis yang berfungsi untuk menghambat reaksi oksidasi dan mencegah terbentuknya radikal bebas. Namun, perlu diperhatikan bahwa antioksidan sintesis dapat memodifikasi senyawa menjadi karsinogenik. Oleh karena itu, eksplorasi antioksidan alami dan pengujian aktivitas antioksidannya penting dilakukan. Salah satunya adalah pengujian aktivitas antioksidan teh hitam (*Camellia sinensis*). Teh merupakan salah satu minuman yang paling populer di dunia dan merupakan tanaman yang banyak ditemukan di daerah pegunungan Asia. Teh diketahui memiliki manfaat kesehatan karena mengandung polifenol yang merupakan antioksidan alami. Antioksidan polifenol berperan dalam melawan radikal bebas yang berbahaya bagi tubuh. Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan uji penangkapan radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) dan FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Ketiga metode uji antioksidan berbeda dalam mekanisme reaksinya. Hasil pengujian antioksidan pada teh hitam dengan metode DPPH sebesar 208,83 mgTE/g, ABTS sebesar 217,83 mgTE/g dan FRAP sebesar 42,15 mgTE/g, dimana TE adalah Trolox Ekuivalen.

Kata kunci: ABTS; Aktivitas antioksidan; DPPH; FRAP; Teh hitam

ABSTRACT

*Antioxidants have the ability to delay or prevent molecular oxidation reactions by inhibiting the initiation or propagation of chain oxidation reactions. The activity of antioxidants may produce varying results due to differences in the chemical structure of antioxidants, the sources of free radicals, and the physicochemical properties of the samples being tested. Compounds containing free radicals have unstable and highly reactive unpaired electrons that can damage cells and tissues if they accumulate in the human body. Antioxidants can deactivate oxidation reactions and prevent the formation of radicals. Both natural and synthetic antioxidants shared common properties, but synthetic antioxidants may modify chemical carcinogens. Therefore, it is important to explore natural antioxidants and determine antioxidant activity. One of natural antioxidants is black tea from *Camellia sinensis*. Tea is one of the world's most popular beverages and is commonly grown in the mountainous regions of Asia. Tea is known to have health benefits for the human body due to its antioxidant. Polyphenol antioxidants in tea have a role in*

scavenging free radicals that are harmful to the body. Determination of antioxidant activity was carried out using radical scavenging tests using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil), ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). The three antioxidant test methods were distinguished from one another based on the type of reaction mechanism. The results showed that the antioxidant activity of black tea assessed by DPPH, ABTS and FRAP methods were 208.83 mgTE/g, 217.83 mgTE/g and 42.15 mgTE/g respectively, where TE is Trolox Equivalent.

Keyword: ABTS; Antioxydant activity; DPPH; FRAP; Black tea

PENDAHULUAN

Radikal bebas didefinisikan sebagai atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Elektron tersebut tidak stabil dan sangat reaktif sehingga dapat menarik elektron dari molekul lain dalam tubuh untuk mencapai stabilitas yang berpotensi merusak biomolekul seperti: lipid, protein, dan DNA. Hal ini dapat menyebabkan peningkatan stres oksidatif pada tubuh, yang dapat memicu berbagai penyakit seperti: neurodegeneratif, diabetes mellitus, penyakit kardiovaskular, penuaan dini, dan bahkan kanker (Phaniendra *et al.*, 2015). Zat atau senyawa yang dapat menghentikan, mengurangi, atau bahkan mencegah terbentuknya radikal bebas baru dalam tubuh dibutuhkan agar terhindar dari akumulasi radikal bebas yang bisa menyebabkan kanker. Senyawa tersebut berfungsi sebagai pendonor elektron yang dapat mengubah radikal bebas menjadi elektron bebas, sehingga mencegah kerusakan pada tubuh. Senyawa ini disebut antioksidan dan memiliki peran penting dalam menjaga kesehatan tubuh manusia. Antioksidan berfungsi untuk menghambat dan menetralkan reaksi oksidasi yang melibatkan radikal bebas.

Salah satu sumber antioksidan adalah tanaman teh hitam (*Camellia sinensis*). Teh merupakan salah satu minuman yang paling populer di dunia dengan jumlah konsumsi mencapai 4,84 juta ton tahun 2013 (FAO, 2015). Teh yang banyak dikonsumsi di Indonesia pada umumnya terbuat dari seduhan pucuk daun muda tanaman teh (*Camellia sinensis*). Teh hitam diproduksi melalui serangkaian proses termasuk pelayuan, penggilingan, oksidasi enzimatis, dan pengeringan (Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar,

2013). Teh dapat dikelompokkan berdasarkan metode pengolahannya, seperti teh hijau dan teh putih yang tidak mengalami proses fermentasi, teh oolong yang mengalami proses fermentasi sebagian, dan teh hitam yang mengalami proses fermentasi sepenuhnya. Proses pengolahan teh hitam diketahui sebagai proses yang paling rumit jika dibandingkan dengan proses pengolahan teh lainnya (Rohdiana, 2015). Teh hitam dapat dibedakan menjadi dua jenis berdasarkan proses pengolahannya, yaitu teh hitam orthodox dan *crushing-tearing-curling* (CTC) (Anggraini *et al.*, 2016). Teh hitam mengandung lebih banyak kafein dibandingkan dengan teh hijau dengan persentase 3,5%. Selain itu, teh hitam juga mengandung 16,5% polifenol, 4,2% total katekin, 0,26% asam galat, dan 0,94% theaflavin (Rohdiana, 2015). Teh hitam kaya akan senyawa antioksidan yang sangat bermanfaat untuk tubuh (Martono, 2016).

Metode pengukuran aktivitas antioksidan dapat mengetahui karakteristik yang berbeda dari antioksidan dalam sampel. Ada berbagai metode yang dapat digunakan untuk mengukur total karakteristik antioksidan, namun belum ada satu metode pun yang dianggap sebagai yang paling ideal. Berbagai metode pengukuran aktivitas yang berbeda dapat menghasilkan mekanisme kerja antioksidan yang berbeda (Hassanbaglou *et al.*, 2012). Beberapa metode yang dapat digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan meliputi DPPH (2,2-difenil-1-picrylhidrazil), ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) dan FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Ketiga metode tersebut menggunakan prinsip yang sama yaitu kemampuan senyawa antioksidan mereduksi radikal bebas atau

oksidator. Perbedaannya pada senyawa radikal bebas yang digunakan yaitu ABTS dan DPPH, sedangkan FRAP menguji kemampuan senyawa antioksidan mereduksi Ferri yang merupakan katalis oksidasi (oksidator). Metode pengujian aktivitas antioksidan dalam tumbuhan, seperti pada teh hitam, dapat dilakukan dengan berbagai cara. Namun, dalam praktiknya, pengujian tersebut dibagi berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu transfer elektron dan transfer atom hidrogen. (Gupta, 2015; Xiao *et al.*, 2020). Metode yang berbasis transfer atom hidrogen (HAT) digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan dengan menangkap radikal bebas melalui donasi atom hidrogen. Beberapa contoh metode ini termasuk ORAC, TRAP, β -Caroten bleaching assay, dan lain-lain. (Pisoschi *et al.*, 2016; Gupta, 2015). Metode yang berbasis transfer elektron (ET) digunakan untuk mengukur kemampuan antioksidan dalam mengurangi radikal bebas melalui transfer elektron. Beberapa contoh metode ini termasuk FRAP, CUPRAC, FIC, DMPD, dan lain-lain (Pisoschi *et al.*, 2016; Gupta, 2015). Metode DPPH dan ABTS dianggap menggunakan kedua basis, baik transfer atom hidrogen (HAT) maupun transfer elektron (ET) (Pisoschi *et al.*, 2016). Oleh karena itu, pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode pengujian aktivitas antioksidan dengan tiga metode yang berbeda.

METODE

Penelitian ini menggunakan bahan utama teh hitam (*Camellia sinensis*) jenis BP (*broken pekoe*) yang didapatkan pada Pabrik Teh Sirah Kencong, Blitar, Jawa Timur. Berat total dari teh hitam sebesar 1,4 g yang kemudian diseduh dengan air panas sebanyak 70 ml. Sebelumnya air dipanaskan hingga mendidih (100 °C). Teh diseduh selama 6 menit. Sampel uji disaring menggunakan penyaring untuk memisahkan filtrat dan residu. Ekstrak minuman teh hitam kemudian diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH, ABTS, dan FRAP.

Bahan lain yang digunakan adalah aquades, larutan asam sitrat 2% (diencerkan 1:50 dengan aquades), larutan NaCl 2% (diencerkan dengan air rasio 1:50), etanol 96%, methanol p.a. (>99,9% purity), NaOH 1 M, DPPH 0,2 mM (Sigma-Aldrich), ABTS, TPTZ (2,4,6 tripyridyl-*s*-triazine), asam asetat, sodium asetat, HCl, FeCl₃.H₂O, kalium persulfat, dan trolox (antioksidan seperti vitamin E, biasa digunakan pada aplikasi biologi atau biokimiawi untuk menurunkan stress oksidatif).

Uji Antioksidan Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Thaipong *et al.*, 2006)

1. Pembuatan reagen DPPH

DPPH dibuat dalam metanol dengan konsentrasi 0,03 mg/ml dengan menimbang trolox 1,5 mg dan dilarutkan dalam 50 ml metanol. Larutan reagen dihomogenkan dengan cara diaduk-aduk dalam *beaker glass*, kemudian dimasukkan dalam botol kaca gelap dan disimpan pada lemari pendingin.

2. Pembuatan kurva standar DPPH

Trolox dicampur dengan metanol dan diencerkan menjadi berbagai konsentrasi yang berbeda, yaitu 0, 50, 100, 150, 200, dan 250 μ M/ml. Kemudian diambil 0,15 ml dari setiap konsentrasi larutan trolox dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Reagen DPPH 0,03 mg/ml ditambahkan sebanyak 2,85 ml. Campuran tersebut dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan dalam kondisi gelap. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm dan dibuat kurva standar trolox DPPH dengan menggunakan persamaan $y = bx + a$, dimana y adalah absorbansi dan x adalah konsentrasi larutan Trolox.

3. Pengujian Sampel

Sampel diambil 0,15 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Reagen DPPH 0,03 mg/ml ditambahkan sebanyak 2,85 ml. Larutan dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan dalam kondisi ruang gelap. Absorbansi diukur pada panjang

gelombang 517 nm. Kemudian dikalibrasi dengan kurva standar trolox untuk mengetahui kadar antioksidan dalam satuan mg trolox/ml. Sampel diukur secara triplo.

Uji Antioksidan Metode ABTS (2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)) (Thaipong *et al.*, 2006)

1. Pembuatan Reagen ABTS

Serbuk ABTS sebanyak 0,0406 g dimasukkan dalam labu ukur 10 ml, ditambahkan aquades hingga batas 10 ml, dan dilarutkan. Kalium persulfate 0,007 g dimasukkan labu ukur 10 ml, ditambahkan aquades hingga volume 10 ml dan dilarutkan. Larutan ABTS dan larutan kalium persulfate masing-masing 1,5 ml dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi 12 jam sebelum digunakan. Reagen ABTS dibuat dengan mengambil 1 ml larutan ABTS-kalium persulfate dan ditambahkan metanol sampai volume 50 ml menggunakan labu ukur.

2. Pembuatan Kurva Standart ABTS

Trolox diencerkan menggunakan methanol hingga mendapatkan konsentrasi yang berbeda, yaitu 0, 50, 100, 150, 200, 250, dan 300 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Setiap konsentrasi larutan Trolox diambil 0,15 ml dan dimasukkan ke tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 2,85 ml reagen ABTS dan diinkubasi dalam keadaan gelap selama 30 menit pada suhu ruang. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 734 nm. Selanjutnya, kurva standar Trolox ABTS dibuat menggunakan persamaan $y = bx + a$, dimana y adalah absorbansi dan x adalah konsentrasi larutan Trolox.

3. Pengujian Sampel

Pengukuran kadar antioksidan dilakukan dengan menambahkan 0,15 ml sampel pada tiap konsentrasi larutan Trolox ke dalam tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan 2,85 ml reagen ABTS dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan dalam keadaan gelap. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang 734 nm. Pengukuran sampel dilakukan secara triplo dan hasilnya dikalibrasi dengan kurva standar trolox

untuk menentukan kadar antioksidan dalam satuan mg trolox/ml.

Uji Antioksidan Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (Thaipong *et al.*, 2006)

1. Pembuatan Reagen FRAP

231,25 ml larutan asam asetat 300 mM dan 18,75 ml larutan sodium asetat 300 mM dimasukkan ke dalam labu ukur 250 ml. Larutan dihomogenkan lalu dipindah ke dalam gelas beaker, diukur hingga memiliki pH 3,6. TPTZ diambil 0,0781 g dan diencerkan dalam 25 ml HCl 40 mM. Serbuk FeCl_3 diambil 0,135 g dan ditambahkan 25 ml aquades. Kemudian dilarutkan dalam labu ukur 25 ml dan menjadi larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. 1 ml larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM dan 1ml larutan TPTZ 10 mM dalam HCl dihomogenkan dalam labu ukur 50 ml. Selanjutnya, ditambahkan larutan buffer asetat pH 3,6 pada labu ukur 50 ml sampai garis batas dan dimasukkan kedalam botol coklat. Larutan dipanaskan tidak langsung pada suhu 37 °C.

2. Pembuatan Kurva Standar Trolox FRAP

Trolox diencerkan menggunakan methanol hingga mendapatkan konsentrasi yang berbeda, yaitu 0, 25, 50, 75, 100, 125, dan 150 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Pengukur konsentrasi antioksidan, setiap konsentrasi larutan trolox diambil sebanyak 0,15 ml sampel dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu, ditambahkan 2,85 ml reagen FRAP dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan dalam keadaan gelap. Setelah itu, absorbansi diukur pada panjang gelombang 593 nm. Selanjutnya, kurva standar Trolox FRAP dibuat menggunakan persamaan $y = bx + a$, dimana y adalah absorbansi dan x adalah konsentrasi larutan Trolox.

3. Pengujian Sampel

Pengukuran kadar antioksidan dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 0,15 ml dan dimasukkan tabung reaksi. Kemudian, ditambahkan sebanyak 2,85 ml reagen FRAP. Setelah itu, tabung reaksi dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu

ruang dan kondisi gelap. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 593 nm dan dikalibrasi menggunakan kurva standar trolox untuk menentukan konsentrasi antioksidan dalam satuan mg Trolox/ml. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali (triplo).

Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan uji komparatif antar perlakuan menggunakan T-Test.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Antioksidan Teh Hitam dengan Metode DPPH, ABTS dan FRAP

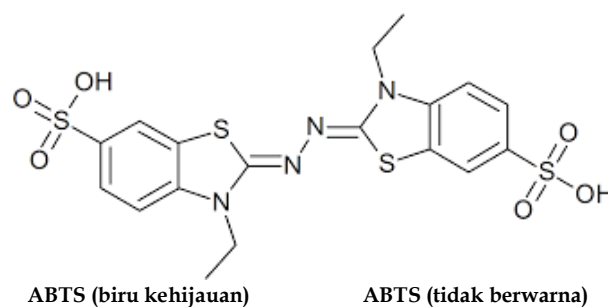
Pengujian aktivitas antioksidan teh hitam dengan metode DPPH mempunyai nilai 208,8 mgTE/g, dengan metode ABTS hasilnya 217,83 mgTE/g, dan dengan metode FRAP sebesar 42,15 mgTE/g. Berdasarkan ketiga metode pengujian antioksidan yang digunakan, dapat dilihat bahwa kandungan antioksidan pada teh hitam terbesar menggunakan metode ABTS. Penelitian yang telah dilakukan oleh Floegel *et al.* (2011) tentang perbandingan uji antioksidan ABTS dan DPPH dalam makanan populer di AS yang kaya akan antioksidan menunjukkan hasil metode ABTS lebih mencerminkan kandungan antioksidan dalam berbagai makanan daripada metode DPPH dan pada penelitian tersebut juga menyatakan bahwa metode FRAP berkorelasi yang lemah jika dibandingkan dengan metode DPPH, ABTS dan ORAC. Floegel *et al.* (2011) juga

menyatakan bahwa uji antioksidan menggunakan metode DPPH dan metode ABTS terdeteksi kuat antiosidannya pada sampel buah-buahan dan minuman.

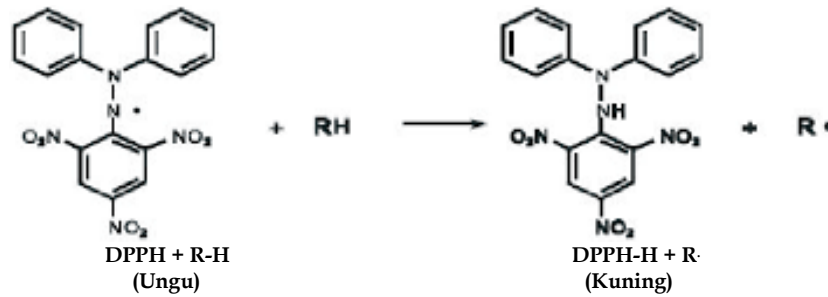
Prinsip metode ABTS ini adalah melihat kemampuan antioksidan dalam menstabilkan radikal bebas yang ditandai dengan pemudaran warna. Warna biru kehijauan dari radikal kation ABTS⁺ akan tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk non radikal yang tidak berwarna (Al-Hmoud *et al.*, 2014). Kemampuan relatif antioksidan untuk mereduksi ABTS diukur menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 734 nm (Sukweenadhi *et al.*, 2020). Reaksi reduksi ABTS dari senyawa radikal bebas dapat dilihat pada Gambar 1.

Metode ABTS dan DPPH memiliki kelebihan masing-masing. Metode ABTS dapat digunakan pada sistem yang berbasis air maupun organik, dan memiliki waktu reaksi yang lebih cepat serta dapat bekerja pada rentang pH yang luas (Apak *et al.*, 2013). Namun, metode ini sangat sensitif terhadap cahaya dan memerlukan waktu inkubasi yang cukup lama, yaitu 12-16 jam dalam kondisi gelap (Maryam *et al.*, 2016).

Metode DPPH dapat digunakan untuk sampel padat maupun cair, namun tidak bekerja secara spesifik untuk komponen antioksidan tertentu. Metode ini mengukur kapasitas antioksidan sampel secara keseluruhan dengan cara mengetahui reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 1. Reduksi ABTS oleh Senyawa Penangkap Radikal Bebas (Antioksidan)



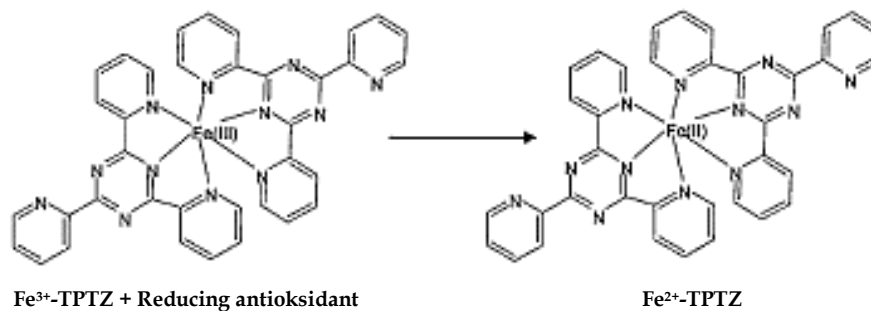
Gambar 2. Reduksi DPPH oleh Senyawa Penangkap Radikal Bebas (Antioksidan)

Metode DPPH bekerja berdasarkan reaksi oksidasi-reduksi, dimana DPPH adalah suatu radikal bebas sintetik yang dapat larut dalam senyawa polar seperti etanol dan metanol (Malik *et al.*, 2017). Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan DPPH dengan cara donor atom hidrogen untuk mendapatkan pasangan elektron (Apak *et al.*, 2013; Malik *et al.*, 2017).

Aktivitas antioksidan pada teh hitam ditandai dengan perubahan warna ungu pada larutan menjadi warna kuning karena tereduksinya DPPH oleh senyawa antioksidan sehingga menjadi DPPH-H (Falah, 2016; Malik *et al.*, 2013; Molyneux, 2004). Perubahan warna DPPH dapat menunjukkan seberapa kuat aktivitas antioksidan pada sampel teh hitam ketika diukur intensitasnya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang

517 nm (Malik *et al.*, 2017; Martono *et al.*, 2016).

Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) beroperasi dengan prinsip reduksi analog ferroin, yaitu kompleks Fe^{3+} dari *tripiridiltriazin* $Fe(TPTZ)^{3+}$ menjadi kompleks $Fe(TPTZ)^{2+}$ yang berwarna biru intensif oleh senyawa antioksidan pada suasana asam. Hasilnya diukur pada panjang gelombang 593 nm (Dontha, 2016). Reagen FRAP tidak berwarna yang terdiri dari campuran TPTZ dan $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ diperlukan untuk membentuk senyawa kompleks Fe^{3+} (Choirunnisa *et al.*, 2016). Mekanisme kerja metode FRAP dengan cara menginaktivasi radikal bebas dengan transfer elektron (Jayanthi dan Lalitha, 2011). Reaksi reduksi dari analog ferroin kompleks Fe^{3+} menjadi kompleks $Fe(TPTZ)^{2+}$ dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Reduksi Fe^{3+} Menjadi Fe^{2+}

Ketiga metode antioksidan yang digunakan pada penelitian ini tentunya memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Metode ABTS memiliki kelebihan diantaranya memungkinkan

penentuan berbagai macam senyawa antioksidan (fenol, asam amino, vitamin C, vitamin E) pada komponen makanan dan sederhana secara operasional. Menurut Prior *et al.* (2005), metode ABTS memiliki

keunggulan karena dapat berinteraksi dengan antioksidan dengan cepat, dapat digunakan pada berbagai pH, dan dapat larut baik dalam air maupun pelarut organik. Kekurangannya adalah dalam uji kinetik, reaksi yang terlibat dalam uji ABTS tidak pasti karena dapat bereaksi dengan oksidator, enzim dan kation radikal sehingga didapatkan hasil yang berlebih, kurangnya relevansi biologis karena penggunaan kation ABTS yang tidak ditemukan dalam makanan atau sistem biologis. Menurut Al-Hmoud *et al.* (2014) Meskipun metode ABTS memiliki keunggulan yang diantaranya lebih sensitif dan dapat digunakan pada berbagai pH, namun metode tersebut memiliki kekurangan yaitu harganya mahal. Dibandingkan dengan metode DPPH, metode ABTS dianggap lebih baik karena metodenya yang lebih sensitif dan dapat digunakan pada pH yang berbeda, sedangkan metode DPPH cenderung lebih peka pada pH asam. Metode DPPH memiliki kelebihan berupa kemudahan melakukan eksperimen dan kekurangannya adalah pada saat pengukuran absorbansi harus dilakukan hati-hati karena setelah DPPH bereaksi dengan sampel dapat menurunkan kadar antioksidan akibat faktor lain (pH, sinar, O₂, jenis pelarut), antioksidan bereaksi lambat, dan uji DPPH tidak cukup untuk

menentukan senyawa antioksidan dan komponen alami yang terkandung pada sampel. Menurut Al-Hmoud *et al.* (2014), metode DPPH memiliki keunggulan karena proses pengukurannya yang cepat, sederhana, dan biayanya terjangkau dalam mengukur kadar antioksidan. Salah satu kekurangan dari metode DPPH adalah bahwa radikal DPPH hanya dapat larut dalam pelarut organik (Liaudanskas *et al.*, 2014). Metode FRAP memiliki kelebihan, yaitu sederhana, cepat, dan tidak memerlukan peralatan khusus. Metode ini memiliki keunggulan karena prosesnya yang sederhana, cepat, murah, dan tidak memerlukan peralatan khusus dalam pengukuran kadar antioksidan (Al-Hmoud *et al.*, 2014). Kekurangannya adalah kecenderungan reagen mengendap sehingga membentuk suspensi dan mengotori alat pengukuran.

Hasil uji T-Test pada ketiga metode analisa antioksidan dapat dilihat pada Tabel 1, 2 dan 3. Tabel 1 menunjukkan hasil uji T-Test antara metode DPPH dengan metode ABTS. Output menunjukkan bahwa Mean metode DPPH sebesar 208,8 mg TE/g dengan standart deviasi 16,1; sedangkan Mean pada metode ABTS sebesar 217,83 mg TE/g dengan standart deviasi 1,56. Hasil uji statistik menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara metode DPPH dengan ABTS.

Tabel 1. T-Test DPPH vs ABTS

Metode Antioksidan	N	Mean	StDev	SE Mean
DPPH	3	208,8	16,1	9,3
ABTS	3	217,83	1,56	0,90

P-value 0,437; T-value -0,96; df 2

Keterangan:

rerata dari 3 kali ulangan

P-value >0,05 tidak berbeda nyata antara metode DPPH dan ABTS

Tabel 2. T-Test DPPH vs FRAP

Metode Antioksidan	N	Mean	StDev	SE Mean
DPPH	3	208,8	16,1	9,3
FRAP	3	42,15	1,17	0,67

P-value 0,003; T-value 17,91; df 2

Keterangan:

rerata dari 3 kali ulangan

P-value <0,05 berbeda nyata antara metode DPPH dan FRAP

Tabel 3. T-Test ABTS vs FRAP

Metode Antioksidan	N	Mean	StDev	SE Mean
ABTS	3	217,83	1,56	0,90
FRAP	3	42,15	1,17	0,67

P-value 0.000; T-value 156,47; df 3

Keterangan:

rerata dari 3 kali ulangan

P-value <0,05 berbeda nyata antara metode ABTS dan FRAP

Metode DPPH dan ABTS memiliki prinsip yang sama, yaitu mereduksi radikal bebas, mengurangi senyawa aktif redoks, dan menerapkan standart yang sesuai untuk mengukur kapasitas antioksidan dengan menggunakan alat spektrofotometri. Menurut Purwanti *et al* (2019), metode DPPH didasarkan pada reaksi oksidasi-reduksi, dimana DPPH yang merupakan radikal bebas sintetik dapat larut dalam senyawa polar seperti etanol dan metanol. DPPH bereaksi dengan dua cara, yaitu dengan mekanisme donor atom hidrogen dan donor elektron, di mana senyawa antioksidan akan memberikan atom hidrogen atau pasangan elektron pada DPPH yang bersifat radikal. Hal ini akan mengurangi keberadaan radikal bebas dalam sampel. Sementara itu, metode ABTS didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan dalam menstabilkan radikal bebas dengan mendonorkan proton kepada radikal bebas yang ditandai dengan perubahan warna dari biru kehijauan menjadi tidak berwarna. Metode ini memanfaatkan kation radikal ABTS sebagai indikator dan kemudian warna diukur pada panjang gelombang tertentu. Metode DPPH maupun ABTS memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Metode DPPH memiliki kelebihan dalam hal kesederhanaan, kecepatan, kemudahan, dan sensitivitas terhadap sampel dengan konsentrasi kecil. Namun, penggunaan DPPH terbatas karena hanya dapat larut dalam pelarut organik, sehingga sedikit sulit untuk menganalisis senyawa yang bersifat hidrofilik (Karadag *et al.*, 2009). Metode ABTS mempunyai keunggulan bila dibandingkan dengan DPPH, yaitu memberikan absorbansi yang spesifik pada panjang gelombang yang terlihat dan memiliki waktu reaksi yang lebih cepat. Selain itu, ABTS dapat larut dalam pelarut organik maupun air, sehingga dapat

mendeteksi senyawa yang bersifat lipofilik atau hidrofilik. Namun, metode ABTS tidak merepresentasikan sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas, sehingga hanya dapat digunakan sebagai metode pembandingan saja dan tidak mewakili sistem biologis dalam tubuh (Karadag *et al.*, 2009) karena DPPH mampu mencerminkan sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas, maka banyak peneliti yang lebih memilih menggunakan metode DPPH sebagai metode utama dalam menganalisis aktivitas antioksidan.

Tabel 2 menunjukkan bahwa Mean metode DPPH adalah 208,8 mg TE/g dengan standar deviasi 16,1 dan Mean metode FRAP sebesar 42,15 mg TE/g dengan standart deviasi 0,67. Mean metode DPPH lebih tinggi dibandingkan metode FRAP dengan selisih 166,68. Hasil uji t-hitung sebesar 17,91 pada *degree of freedom* (df) 2 dengan p-value 0,003 (<0,05) sehingga terdapat perbedaan signifikan antara metode DPPH dengan FRAP.

Tabel 3 menunjukkan Mean metode ABTS sebesar 217,83 mg TE/g sampel dengan standart deviasi 1,56 dan Mean metode FRAP sebesar 42,15 mg TE/g dengan standart deviasi 1,17. Mean metode ABTS lebih tinggi dibandingkan metode FRAP dengan selisih 175,67. Uji statistik menunjukkan nilai t-hitung 156,47 pada *degree of freedom* (df) 3 dengan p-value 0,000 (<0,05) sehingga terdapat perbedaan signifikan antara metode ABTS dengan FRAP.

Berdasarkan pengukuran aktivitas antioksidan dengan ketiga metode tersebut, Mean tertinggi terdapat pada metode ABTS dan DPPH yang tidak berbeda nyata sehingga banyak peneliti yang lebih memilih menggunakan metode DPPH sebagai metode utama dalam menganalisis aktivitas antioksidan karena DPPH mampu mencerminkan sistem pertahanan

tubuh terhadap radikal bebas (Karadag *et al.*, 2009).

SIMPULAN

Berdasarkan ketiga metode pengujian antioksidan, Mean tertinggi terdapat pada metode ABTS dan DPPH sehingga kedua metode tersebut dapat saling menggantikan (alternatif) untuk menguji aktivitas antioksidan teh hitam karena hasilnya tidak berbeda nyata. Hasil antioksidan pada teh hitam dengan metode DPPH 208,83 mgTE/g, ABTS 217,83 mgTE/g dan FRAP 42,15 mgTE/g namun, banyak peneliti yang lebih memilih menggunakan metode DPPH sebagai metode utama dalam menganalisis aktivitas antioksidan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai sebagian oleh Hibah Riset Inovasi 2022 Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya untuk Dr. Siti Narsito Wulan dengan SK Dekan FTP No. 40/Th. 2022 tanggal 11 April 2022.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Hmoud, H, -A., Ibrahim, N, -E., El-Hallous, E, -I. 2014. Surfactants solubility, concentration and the other formulations effects on the drug release rate from a controlled-release matrix. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 8(13), 364-371. <https://doi.org/10.5897/AJPP2013>
- Apak, -R., Gorinstein, -S., Böhm, -V., Schaich, K, -M., Özyürek, -M., Güçlü, -K. 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>
- Choirunnisa, A, -R., Fidrianny, -I., Ruslan, -K. 2016. Comparison of five antioxidant assays for estimating antioxidant capacity from three *Solanum SP.* extracts. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 9, 123-128. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13155>
- Dewi Anjarsari, I, -R., 2016. Katekin teh Indonesia: prospek dan manfaatnya. *Kultivasi*. 15(2), 99-106. <https://doi.org/10.24198/kultivasi.v15i2.11871>
- Dontha, S. 2016. A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 9(2), 14-32. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13092>
- FAO. 2015. *World Tea Production and Trade: Current and Future Development*. <http://www.fao.org>
- Floegel, -A., Kim, D, -O., Chung, S, -J., Koo, S, -I., Chun, O, -K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24(7), 1043-1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- Gupta, -D. 2015. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 6(2), 546-566. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(2\).546-66](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66)
- Hassanbaglou, -B., Hamid, A, -A., Roheeyati, A, -M., Saleh, N, -M., Abdulamir, A, -S., khatib, -A. 2012. Antioxidant activity of different extracts from leaves of *Pereskia bleo* (Cactaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(15), 2932-2937. <https://doi.org/10.5897/jmpr11.760>
- Jayanthi, -P., Lalitha, -P. 2011. Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(3), 126-128. <https://innovareacademics.in/journal/ijpps/Vol3Suppl3/2155.pdf>
- Karadag, -A., Ozcelik, -B., Saner, -S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*. 2(1), 41-60. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>
- Malik, -A., Ahmad, A, -R., Najib, -A. 2017.

- Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak terpurifikasi daun teh hijau dan jati Belanda. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 4(2), 238–240. <https://doi.org/10.33096/jffi.v4i2.267>
- Martono, -B., Falah, -S., Nurlaela, -E. 2016. Aktivitas antioksidan teh varietas GMB 7 pada beberapa ketinggian tempat. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*. 3(1), 53–60. <https://media.neliti.com/media/publications/140710-ID-none.pdf>
- Maryam, -S., Pratama, -R., Effendi, -N., Naid, T. 2016. Analisis aktivitas antioksidan ekstrak etanolik daun yodium (*Jatropha Multifida L.*) dengan metode cupric ion reducing antioxidant capacity (Cuprac). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 2(1), 90–93. <https://doi.org/10.33096/jffi.v2i1.185>
- Phaniendra, -A., Jestadi, D, -B., Periyasamy, -L. 2015. Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pisoschi, A, -M., Pop, -A., Cimpeanu, -C., Predoi, -G. 2016. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016, 1-36. <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>
- Purwanti, -L., Dasuki, U, -A., Imawan, A, -R. 2019. Perbandingan aktivitas antioksidan dari seduhan 3 merk teh hitam (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) dengan metode seduhan berdasarkan SNI 01-1902-1995. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*. 2(1), 19–25. <https://doi.org/10.29313/jiff.v2i1.4207>
- Rohdiana, D. (2015). Teh: proses, karakteristik & komponen fungsionalnya. *Jurnal Foodreview Indonesia*, 10(8), 34–37. https://www.researchgate.net/publication/286460235_Teh_Proses_Karakteristik_Komponen_Fungsionalnya
- Sukweenadhi, -J., Yunita, -O., Setiawan, -F., Kartini, Siagian, M, -T., Danduru, A, -P., Avanti, -C. 2020. Antioxidant activity screening of seven Indonesian herbal extract. *Biodiversitas*. 21(5), 2062–2067. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210532>
- Thaipong, -K., Boonprakob, -U., Crosby, -K., Cisneros-Zevallos, -L., Byrne, D, -H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- Xiao, -F., Xu, -T., Lu, -B., Liu, -R. 2020. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*. 1(1), 60–69. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>