

**PENGEMBANGAN METODE MICROFLUIDIC PAPER-BASED
ANALYTICAL DEVICES (μ PAD) UNTUK UJI AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN DAN TOTAL FENOLIK PADA TEH HIJAU**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Magister



Oleh:

NA'ILAH FAUZIYAH

176090200111013

**PROGRAM STUDI KIMIA
BIDANG MINAT KIMIA ANALITIK**

**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS MIPA
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN

**Pengembangan Metode Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PAD)
untuk Uji Aktivitas Antioksidan dan Total Fenolik pada Teh Hijau**

Oleh:

NA'ILAH FAUZIYAH

176090200111013

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 21 Juni 2019
dan dinyatakan memenuhi Prasyarat
Memperoleh Gelar Magister Sains dalam Bidang Kimia

KOMISI PEMBIMBING

Ketua

Anggota

Akhmad Sabarudin, S.Si., M.Si., Dr. Sc

NIP. 197040418 199702 1 001

Dra. Hermin Sulistyarti, Ph. D

NIP. 19640529 198802 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi S2 Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes

NIP. 19720326 200212 2 001

**PENGEMBANGAN METODE MICROFLUIDIC PAPER-BASED
ANALYTICAL DEVICES (μ PAD) UNTUK UJI AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN DAN TOTAL FENOLIK PADA TEH HIJAU**

Nama Mahasiswa : Nailah Fauziyah

NIM : 176090200111013

Program Studi : Kimia

Minat : Kimia Analitik

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Akhmad Sabarudin, S.Si., M.Si., Dr. Sc

Anggota : Dra. Hermin Sulistyarti, Ph. D

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1 : Anna Safitri, S.Si., M.Sc., Ph. D

Dosen Penguji 2 : Zubaidah Ningsih AS, S.Si., M.Phil

Tanggal Ujian : 21 Juni 2019



LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Na'ilah Fauziyah

NIM : 176090200111013

Jurusan : Kimia

Penulis Tesis yang Berjudul : Pengembangan Metode Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PAD) untuk Uji Aktivitas Antioksidan dan Total Fenolik pada Teh Hijau

Menyatakan bahwa tesis saya merupakan hasil karya sendiri yang didampingi oleh tim pembimbing (Ketua dan Anggota Komisi Pembimbing) dan bukan hasil penjiplakan. Apabila ditemukan unsur penjiplakan dalam tesis ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik dari Universitas Brawijaya. Demikian, pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tidak dipaksa.

Malang,
yang menyatakan



Na'ilah Fauziyah

NIM. 176090200111013

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

DATA PRIBADI

Nama Lengkap : Na'ilah Fauziyah
NIM : 176090200111013
Tempat dan Tanggal Lahir : Malang, 9 Maret 1993
Alamat : Jl. Kebalen Wetan 1040 A
Email : nailahfauziy9@gmail.com

RIWAYAT PENDIDIKAN

- SD Negeri Jodipan II Malang (1999 - 2005)
- SMP Negeri 2 Malang (2005-2008)
- SMA Negeri 2 Malang (2008-2011)
- S1 Pendidikan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Malang (2012-2016)
- S2 Program Studi Ilmu Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang (2017-2019)

KONFEREN DAN PENGHARGAAN

- Presentasi Poster. The 9th Basic Science International Conference 2019, Recent Advance in Basic Science toward 4.0 Industrial Revolution (Instrumentation and measurement). Poster berjudul "Developing a Mickey-Mouse-Designed Microfluidic Paper-Based Analytical Device (μ PAD) to Determine The Antioxidant Activity of Green Tea". Penulis: Na'ilah Fauziyah, Akhmad Sabarudin, Hermin Sulistyarti

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, hidayah dan ridho serta petunjuk-Nya sehingga penyusunan tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.

Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan Nabi kita Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya.

Tesis yang berjudul **Pengembangan Metode Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PAD) untuk Uji Aktivitas Antioksidan dan Total Fenolik pada Teh Hijau** ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Master Sains dalam bidang Kimia fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penyusunan tesis ini tidak lepas dari bantuan yang diberikan oleh berbagai pihak, maka dalam kesempatan ini mengucapkan terima kasih banyak kepada :

1. Bapak Akhmad Sabarudin, S.Si., M.Si., Dr. Sc selaku dosen pembimbing I dan Ibu Dra. Hermin Sulistyarti, Ph. D selaku dosen pembimbing II atas segala bimbingan, ilmu, pengarahan, dukungan, kesabaran serta do'a yang diberikan kepada penulis selama penyusunan tesis ini.
2. Ibu Anna Safitri, S.Si., M.Sc., Ph. D dan Ibu Zubaidah Ningsih AS, S.Si., M.Phil., Ph.D selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran kepada penulis untuk perbaikan naskah tesis ini.
3. Ibu Arie Srihardyastutie, S.Si., M.Kes selaku Ketua Program Studi S2 Kimia Universitas Brawijaya atas semua bimbingan dan saran yang yang diberikan.
4. Seluruh dosen dan staf jurusan kimia yang telah memberikan ilmu, bimbingan, motivasi dan bantuan selama perkuliahan.

5. Kepada Kedua Orang Tuaku Bapak M. Sodiq Husni dan Ibu Indah Hasnawati, mertuaku Bapak Soyo dan Alm. Ibu Munadhifa yang selalu memberikan bimbingan dan yang tiada henti memberikan limpahan do'a dan dukungan untuk keberhasilan putra-putrinya.
6. Kepada Suamiku Yuski Sudana, M.Pd yang selalu dengan sabar membimbing, memberikan semangat, motivasi dan dukungan baik moril maupun materiil bagi penulis. Inas, Abi dan Umi serta seluruh keluarga penulis yang selama ini telah membantu dengan do'a dan dukungannya.
7. Andini, Anneke, Meiria dan Feli yang selalu memberikan semangat dan dukungannya.
8. Semua teman-teman penulis, terutama teman-teman S2 Kimia angkatan 2017 dan 2018 yang telah memberikan ilmu, semangat, dukungan kepada penulis selama penyusunan tesis ini.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan dalam penulisan Tesis ini.

Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan semua pihak yang telah membantu penulis dengan pahala yang berlimpah dan dicatat sebagai amal ibadah. Semoga ilmu yang penulis peroleh dapat bermanfaat dan barokah bagi penulis, masyarakat dan ilmu pengetahuan. Aamiin.

Malang, Juni 2019

SUMMARY

NA'ILAH FAUZIYAH. Brawijaya University Postgraduate Program, June 2019.
"Development of Microfluidic Paper Based Analytical Device Method (μ PAD) to Examine Antioxidant and Total Phenolic Activity for Green Tea". Supervisor: Akhmad Sabarudin, S.Si., M.Sc., Dr. Sc, Co-Supervisor: Dra. Hermin Sulistyarti, Ph. D.

Antioxidant activity and the total amount of phenolic in green tea can be determined using modern instruments through high performance liquid chromatography. This method has limitations, as it is not portable, cannot be used to determine the level of antioxidants directly in the sample (on the spot) and requires relatively expensive costs. One alternative method is to develop a paper-based microfluidic analysis method (μ PADs) that has advantages, i.e. to apply, does not require additional tools and offers cost-effective costs. The principle of the antioxidant activity method is the reduction of ferric ions to colourless ferrous ions by anti-oxidant compounds. In order to obtain specific color the ferrous ion, was added with 1,10-phenanthroline. The ferrous ion will react with 1,10-phenanthroline to form an orange-red complex. Total phenolic test was used to measure the ability of antioxidant represented by phenolic compound which under alkaline formed phenolic anions to reduce Folin-Ciocalteu reagents forming purple color. This study was conducted to optimize the design and conditions of μ PAD and apply the μ PAD to test antioxidant activity and total phenolic in the sample, the validation of μ PAD. The antioxidant activity and total phenolic test using the μ PAD method were started with determining the optimum conditions, involving temperature, time of hydrophobic barrier penetration, as well as optimizing volume of sample and reagents in the hydrophilic zone.

The results of this study showed that the temperature and time optimum for penetration of the hydrophobic barrier was 120°C add 90 seconds. The optimum volume and concentration of reagent used to determine antioxidants were 0.8 μ L FeCl_3 0.2 M solution and 0.8 μ L 1,10-Phenanthroline solution 0.1%. The optimum volume and concentration of reagent for total total phenolic determination was achieved under Folin-Ciocalteu solution:water of 0.8 μ L with ratio of 4:1 and the optimum result of Na_2CO_3 solution was 10%. Antioxidant activity and total phenolic in green tea samples can be directly determined based on colorimetry via RGB color scan results of μ PAD and proceeded with the application of image J. The method antioxidant activity was obtained by interpolating to standard curve. The validation of μ PAD the analysis of antioxidant activity and total phenolic did not show a significant difference to those obtained from standard spectrophotometric method, so the μ PAD method could be used as an alternative method.

RINGKASAN

NA'ILAH FAUZIYAH. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya, Juni 2019.
Pengembangan Metode Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PAD)
untuk Uji Aktivitas Antioksidan dan Total Fenolik pada Teh Hijau. Komisi
Pembimbing, Ketua: Akhmad Sabarudin, S.Si., M.Si., Dr. Sc, Anggota: Dra.
Hermin Sulistyarti, Ph. D

Aktivitas antioksidan dan penentuan total fenolik pada teh hijau dapat ditentukan menggunakan instrumen modern yaitu melalui kromatografi cair kinerja tinggi. Metode tersebut memiliki keterbatasan yaitu instrumentasi yang tidak *portable*, tidak dapat dilakukannya penentuan aktivitas antioksidan secara langsung pada sampel (*on-site*) dan membutuhkan biaya yang relatif mahal. Salah satu metode alternatifnya yaitu dengan mengembangkan metode analisis berbasis kertas mikrofluida (μ PADs) yang memiliki kelebihan mudah diaplikasikan, tidak membutuhkan alat bantu tambahan dan menawarkan biaya yang ekonomis. Prinsip penentuan aktivitas antioksidan didasarkan pada reaksi reduksi ion ferri menjadi ion ferro oleh senyawa antioksidan yang dapat memberikan warna yang spesifik bila ion ferro dapat ditambahkan 1,10-fenantrolin. Ion ferro akan bereaksi dengan 1,10-fenantrolin membentuk kompleks berwarna jingga-merah. Adapun untuk uji total fenolik digunakan pereaksi Folin-Ciocalteu dimana metode ini mengukur kemampuan sampel dengan senyawa antioksidan yang diwakili dengan senyawa fenolik pada kondisi basa mengalami disosiasi untuk membentuk anion fenolat yang mampu mereduksi pereaksi Folin-Ciocalteu menghasilkan larutan berwarna biru. Penelitian ini dilakukan untuk mengoptimasi μ PADs yang diaplikasikan untuk uji aktivitas antioksidan dan total fenolik pada sampel serta validasi metode μ PADs. Uji aktivitas antioksidan dan total fenolik dengan metode μ PADs diawali dengan menentukan kondisi optimum yaitu optimasi suhu dan waktu penetrasi penghalang hidrofobik serta optimasi volume dan homogenasi reagen pada zona hidrofilik.

Hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa suhu dan waktu optimum untuk penetrasi hidrofobik yaitu pada suhu 120°C selama 90 detik. Hasil optimasi larutan yang digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan yaitu 0,8 μ L larutan FeCl₃ 0,2M dan 0,8 μ L larutan 1,10-Fenantrolin 0,1%. Hasil optimasi larutan Folin-Ciocalteu:air dicapai pada volume 0,8 μ L dengan perbandingan 4 : 1 dan hasil optimum larutan Na₂CO₃ yaitu 10 %. Aktivitas antioksidan dan total fenolik pada sampel teh hijau dapat langsung diidentifikasi didasarkan pada kolorimetri melalui intensitas warna RGB hasil *scan* μ PADs melalui aplikasi *image J*. Nilai aktivitas antioksidan diperoleh dengan cara interpolasi nilai intensitas *R* sampel pada kurva baku hubungan antara intensitas *B* dengan konsentrasi asam galat. Untuk total fenolik diperoleh melalui interpolasi nilai intensitas *B* sampel pada kurva baku hubungan antara intensitas *B* dengan konsentrasi asam galat. Validasi metode μ PADs dalam analisis aktivitas antioksidan dan total fenolik menunjukkan tidak ada perbedaan nilai yang signifikan dengan yang diperoleh dari metode standar spektrofotometri, sehingga metode μ PADs dapat digunakan sebagai metode alternatif.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan berkah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis berjudul. **"Pengembangan Metode Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PAD) untuk Uji Aktivitas Antioksidan dan Total Fenolik pada Teh Hijau"**. Penyusunan naskah tesis ini merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar magister sains dalam bidang kimia fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari atas kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki sehingga tulisan tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan dan penyempurnaan tesis ini. Semoga tesis ini dapat memberikan sumbangsih yang bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Malang, Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR PENGESAHAN TESIS	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	v
UCAPAN TERIMAKASIH.....	vi
SUMMARY.....	viii
RINGKASAN.....	ix
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Batasan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 μ PADs (Microfluidic Paper-Based Analytical Device).....	6
2.1.1 Metode pembuatan μ PADs	6
2.1.2 Pola hidrofobik pada μ PADs	8
2.1.3 Aplikasi Sampel pada μ PADs	11
2.2 Teh Hijau (<i>camelia sinesis</i>).....	14
2.2.1 Taksonomi Teh Hijau (<i>camelia sinesis</i>).....	14
2.2.2 Antioksidan pada Teh Hijau	16
2.3 Analisis Aktivitas Antioksidan dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	18
2.4 Analisis Total Fenolik dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	20



BAB III KERANGKA HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian..... 22

3.2 Skema Konsep Penelitian..... 28

3.3 Hipotesis..... 28

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian..... 29

4.2 Alat dan Bahan Penelitian..... 29

4.3 Tahapan Penelitian..... 29

4.4 Metode Kerja 30

 4.4.1 Pembuatan μ PADs 30

 4.4.2 Optimasi μ PADs 31

 4.4.3 Preparasi Larutan 32

 4.4.3.1 Preparasi Larutan Sampel Teh Hijau 32

 4.4.3.2 Pembuatan Larutan Standar Asam Galat 32

 4.4.3.3 Pembuatan Larutan $FeCl_3$ 0,3M 32

 4.4.3.4 Pembuatan Larutan 1,10-fenantrolin 0,5% 33

 4.4.4 Penentuan Aktivitas Antioksidan dan Total Fenolik dengan μ PADs 33

4.5 Validasi Metode 34

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Desain dan Hasil Pencetakan μ PADs 37

5.2 Optimasi Suhu dan Waktu Penetrasi μ PADs 38

 5.2.1 Hasil Optimasi Suhu pada saat Penetrasi μ PADs 39

 5.2.2 Hasil Optimasi Waktu pada saat Penetrasi Pembatas Hidrofobik 42

5.3 Optimasi Reagen dan Sampel 43

 5.3.1 Hasil Optimasi Konsentrasi Larutan $FeCl_3$ 44

 5.3.2 Hasil Optimasi Konsentrasi Larutan 1,10-fenantrolin.. 45

 5.3.3 Hasil Optimasi Konsentrasi Larutan Na_2CO_3 46

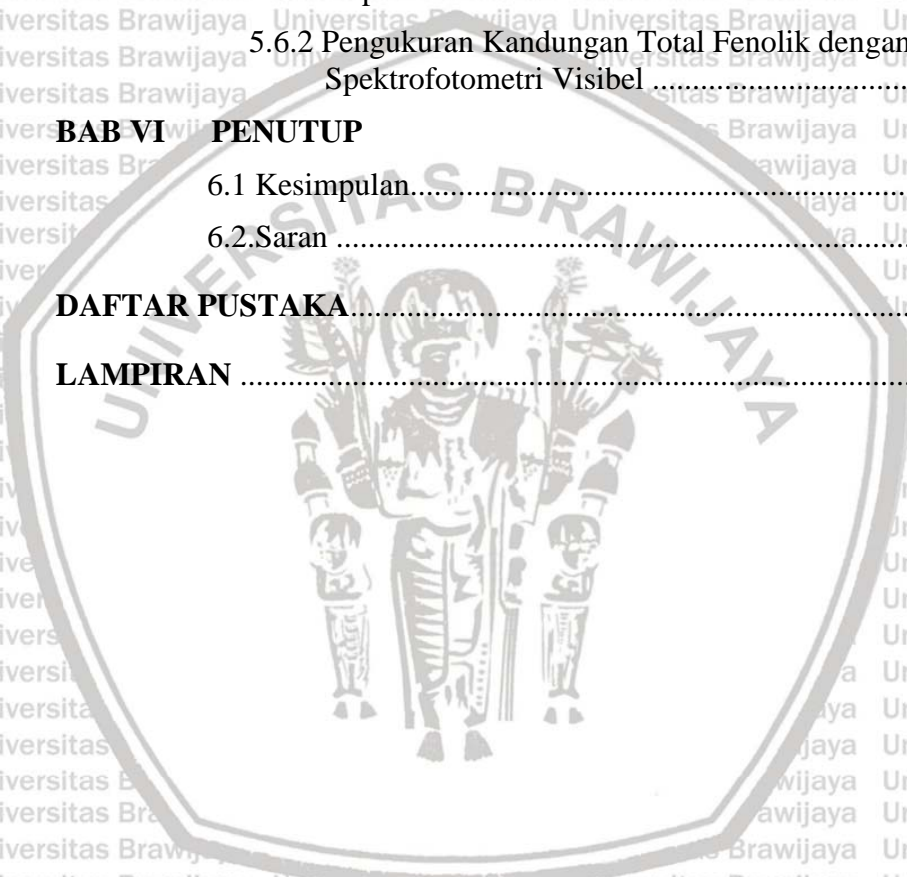
 5.3.4 Hasil Optimasi Konsentrasi Larutan Folin-Ciocalteu .. 48

5.4 Hubungan Konsentrasi Larutan Standar dengan RGB..... 49

 5.4.1 Hubungan Konsentrasi Larutan Standar dengan Intensitas RGB untuk Uji Aktivitas Antioksidan..... 50



5.4.2 Hubungan Konsentrasi Larutan Standar dengan Intensitas RGB untuk Uji Kandungan Total Fenolik	51
5.5 Aplikasi μ PADs pada Sampel Teh Hijau dengan menggunakan Metode RGB	53
5.5.1 Penentuan Aktivitas Antioksidan pada Sampel Teh Hijau	54
5.5.2 Penentuan Total Fenolik pada Sampel Teh Hijau	56
5.6 Validasi Metode	58
5.6.1 Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode Spektrofotometri Visibel	58
5.6.2 Pengukuran Kandungan Total Fenolik dengan Metode Spektrofotometri Visibel	59
BAB VI PENUTUP	
6.1 Kesimpulan.....	62
6.2.Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	68



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Komposisi Teh Hijau dari Belitz dan Grosh.....	16
2.2 Jenis-jenis Flovanoid.....	17
5.1 Hasil Optimasi Suhu Penetrasi μ PADs.....	41
5.2 Hasil Intensitas Nilai RGB Standar untuk Uji Aktivitas Antioksidan.....	50
5.3 Hasil Intensitas Nilai RGB Standar untuk Uji Total Fenolik.....	52
5.4 Intensitas Nilai R pada Sampel Teh Hijau.....	55
5.5 Intensitas Nilai B pada Sampel Teh Hijau.....	57
5.6 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Sampel dengan Metode Spektrofotometri Visibel.....	59
5.7 Hasil Uji Kandungan Total Fenolik Sampel dengan Metode Spektrofotometri Visibel.....	59
5.8 Hasil Perbandingan Aktivitas Antioksidan dan Total Fenolik antara Metode μ PADs dengan Metode Spektrofotometri Visibel.....	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Pengembangan Metode μ PADs oleh Kaneta.....	7
2.2 Langkah-langkah Pembuatan Pola Hidrofobik di Kertas	8
2.3 Hasil Cetak Hidrofobik sebagai Garis Uji <i>Test Line</i> (<i>TL</i>).....	9
2.4 Hasil Sebelum dan Setelah Penetrasi Tinta Lilin pada Kertas	10
2.5 Ilustrasi Identifikasi Pb pada μ PADs	11
2.6 Ilustrasi Deteksi Kolorimetri Cr(VI) pada μ PADs	12
2.7 Hasil Perubahan Warna pada Formaldehida	15
2.8 Hasil Perubahan Warna untuk Deteksi (a) <i>E. Coli</i> , (b) <i>Salmonella tipimurium</i> , (c) <i>L. monositogen</i>	13
2.9 Skema Prosedur untuk Analisis Aktivitas Antioksidan pada μ PADs	13
2.10 Hasil Uji (a) Glukosa pada μ PAD dengan Variasi Konsentrasi Glukosa 0-2-mmol.L ⁻¹ (b) Multideteksi Glukosa dan Protein.....	14
2.11 <i>Camellia sinensis</i> (<i>L</i>).....	15
2.12 Struktur Katekin dan Rumus Umum Flovanoid.....	17
3.1 Reaksi Pembentukan Senyawa Kompleks Fe ²⁺ dengan Fenantrolin	23
3.2 Reaksi Senyawa Fenolik dengan Reagen Folin-Ciocalteu	24
3.3 Desain μ PADs yang akan dibuat	25
3.4 Tahap Penentuan Aktivitas Antioksidan Sampel Teh Hijau menggunakan μ PADs.....	27

3.5 Tahap Penentuan Aktivitas Total Fenolik Sampel Teh Hijau menggunakan μ PADs.....	27
4.1 Desain μ PADs dengan Program Coreldraw 2018	30
4.2 Contoh Hasil Perubahan Warna untuk uji (a) Total Fenolik (b) Aktivitas Antioksidan	34
5.1 Hasil Pencetakan μ PADs.....	38
5.2. Penetrasi μ PADs dengan menggunakan Hot-plate.....	39
5.3 Hasil Scan (a) Sebelum Pemanasan (b) Setelah Pemanasan dengan Optimasi Suhu.....	40
5.4 Jarak Channel yang diukur dalam Penentuan Kecepatan Rata-rata..	41
5.5 Hasil Scan Setelah Pemanasan dengan Optimasi Waktu.....	42
5.6 Hasil Optimasi Konsentrasi Larutan FeCl ₃ pada (a) Blanko (b) 0,001 M (c) 0,1M (d) 0,2 M (e) 0,3 M.....	45
5.7 Hasil Optimasi Larutan 1,10-fenantrolin (a) Blanko (b) 0,001% (c) 0,05% (d) 0,1% (e) 0,2 %	46
5.8 Hasil Optimasi Larutan Na ₂ CO ₃ (a) 5% (b) 10% (c) 20%.....	47
5.9 Hasil Optimasi Larutan Folin-Ciocalteu : Air (a) Blanko (b) 1:1 (c) 2:3 (d) 3:2 (e) 7:3 (f) 4:1 (g) 1:4	48
5.10 Hubungan Nilai RGB Standar dengan Konsentrasi Asam Galat untuk Uji Aktivitas Antioksidan	51
5.11 Hubungan Nilai RGB Standar dengan Konsentrasi Asam Galat untuk Uji Total Fenolik	53
5.12 Hasil Scan Aplikasi μ PADs pada Sampel Teh Hijau untuk Uji Aktivitas Antioksidan	54
5.13 Hasil Scan Aplikasi μ PADs pada Sampel Teh Hijau untuk Uji Total Fenolik	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. Hasil Pengukuran Serapan Asam Galat.....	68
B. Hasil T-test Uji Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Total Fenolik.....	69
...	
C. Hasil Optimasi dan Intensitas RGB Standar dengan Pereaksi DPPH.....	70
D. Sertifikat Bebas Plagiasi.....	71



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut *World Health Organization* tahun 2011 menunjukkan bahwa di wilayah Asia Tenggara diperkirakan ada 3,6 juta atau seperempat dari seluruh kematian yang terjadi diakibatkan penyakit kardiovaskular. Hal tersebut sesuai dengan yang disampaikan Riskesdes meningkatnya kemungkinan terinfeksi oleh penyakit degeneratif meningkat dari 2013-2018 [1]. Infeksi penyakit degeneratif dapat dicegah dengan mengkonsumsi produk tambahan nutrisi yang mengandung beberapa antioksidan yang utamanya dari sumber daya alam. Antioksidan memiliki peran penting dalam menjaga kesehatan tubuh [2-5]. Antioksidan adalah molekul yang mampu memperlambat atau mencegah oksidasi molekul lain yang dikenal sebagai aktivitas antioksidan.

Teh hijau adalah salah satu produk teh yang memiliki berbagai manfaat bagi kesehatan karena kandungan senyawa fenolik yang tinggi yaitu mencapai 30% [7] dari berat kering daun teh hijau [3, 4]. Senyawa fenolik merupakan kelompok antioksidan yang secara alami terdapat dalam teh. Senyawa aktif pada teh hijau telah dikenal efektif dalam mencegah banyak salah satunya seperti penelitian yang dilakukan oleh Trevisanato dan Kim yaitu peluang untuk terserang penyakit jantung lebih besar pada orang-orang yang tidak mengkonsumsi teh hijau [8].

Aktivitas antioksidan dapat ditentukan melalui metode kolorimetri dengan reaksi redoks [7]. Hal ini dikenali oleh perubahan warna dari indikator kolorimetri sebagai hasil dari kemampuan pengurangan besi oleh antioksidan [9, 10]. Metode

yang telah dikembangkan untuk menentukan aktivitas antioksidan dalam banyak sampel termasuk metode spektrofotometri adalah *1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH), *trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC), *cupric ion reducing antioxidant capacity* (CUPRAC), *oxygen radical absorbing capacity* (ORAC), dan *ferric reducing antioxidant power* (FRAP). Metode FRAP telah dipilih karena kesederhanaannya, cepat, akurat dan sensitivitas dalam penentuan aktivitas antioksidan [2, 9]. Beberapa senyawa aktif fenolik yang terkandung pada teh hijau yaitu asam galat, katekin dan tanin [7]. Banyaknya senyawa fenolik dalam teh ditentukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Penggunaan metode Folin-Ciocalteu karena memiliki banyak kelebihan diantaranya merupakan metode sederhana, sensitif, hasilnya relatif akurat dan telah digunakan secara luas untuk mengukur total fenolik [12,13]. Pada penentuan kadar senyawa fenolik ini digunakan standar asam galat. Hal ini dikarenakan asam galat bersifat stabil dan struktur polifenolnya dapat ditemukan dalam sampel teh hijau.

Aktivitas antioksidan dan penentuan total fenolik pada teh hijau dapat ditentukan menggunakan instrumen modern yaitu melalui kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (4,10). Metode tersebut memiliki kelebihan yaitu dapat mendeteksi asam amino, memiliki kepekaan dan presisi yang tinggi. Namun juga memiliki keterbatasan yaitu instrumentasi yang tidak portable. Tidak dapat dilakukannya penentuan aktivitas antioksidan secara langsung pada sampel (*on-site*) karena harus melakukan preparasi sampel terlebih dahulu yang membutuhkan beberapa reagen organik yang bersifat berbahaya pada lingkungan. Perangkat instrument membutuhkan biaya yang relative mahal sehingga tidak semua laboratorium memiliki perangkat dan operator yang terlatih. Selain itu kendala pada penggunaan

instrument KCKT yaitu sulit untuk mengidentifikasi seluruh puncak kromatogram dengan tepat karena terjadinya tumpang tindih [11].

Berdasarkan beberapa keterbatasan dalam metode analisis yang telah diuraikan tersebut, salah satu solusinya adalah dengan mengembangkan metode analisis berbasis kertas mikrofluida (μ PADs). Hal yang menarik pada μ PADs adalah penggunaan kertas sebagai bahan substrat pergerakan sampel tanpa membutuhkan alat bantu tambahan dengan adanya kekuatan kapiler pada substrat kertas, mudah diaplikasikan, dalam pembacaan hasil analisis dan menawarkan biaya yang ekonomis [12]. Terdapat empat metode pembuatan μ PADs yaitu teknik fotolithografi (*photolithography*) memiliki hasil daerah hidrofobik dan hidrofilik yang baik namun membutuhkan banyak tahapan yang rumit sehingga membutuhkan waktu yang lama. Teknik pemotongan (*craft cutting*) dalam proses pembuatan memiliki tingkat kecepatan yang tinggi namun memiliki harga yang mahal untuk perangkat pemotong, metode sablon (*screen printing*) menawarkan sebagai metode yang mudah namun berpeluang untuk terjadi kebocoran pada hidrofobik yang menimbulkan kontaminasi larutan, dan teknik pencetakan (*wax printing*) merupakan metode yang sering digunakan karena merupakan metode pembuatan yang sederhana dan tercepat jika dilakukan pencetakan secara massal dan menghasilkan daerah hidrofobik yang baik [14].

Beberapa pengembangan metode μ PADs pada berbagai jenis sampel telah dilakukan seperti penentuan kadar glukosa dalam serum darah [13], penentuan kadar formalin yang terkandung dalam makanan [15] dan analisis antioksidan pada sample minuman [16]. Pengembangan metode μ PADs untuk analisis antioksidan yang telah dilakukan menggunakan perangkat sederhana dan mudah didapatkan

yaitu menggunakan spidol tinta lilin namun dalam penelitian tersebut belum dilakukan optimasi konsentrasi larutan standar dan memiliki keterbatasan dalam pembuatan daerah hidrofobik yang tidak konsisten sehingga dapat menyebabkan kebocoran pada aliran reagen. Masih terbatasnya penelitian mengenai penggunaan μ PADs untuk menguji aktivitas antioksidan yang dipengaruhi senyawa fenolik pada sampel. Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan reaksi FRAP dan total fenolik dengan menggunakan μ PADs melalui metode kolorimetri yang dideteksi melalui scanner. Validasi metode dilakukan dengan menggunakan metode standar spektrofotometri UV-VIS.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana optimasi μ PADs yang digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan dan total fenolik ?
2. Bagaimana cara identifikasi aktivitas antioksidan dan total fenolik pada sampel dengan menggunakan metode μ PADs ?
3. Bagaimana cara validasi metode μ PADs dalam analisis aktivitas antioksidan dan total fenolik ?

1.3 Tujuan penelitian

1. Mengetahui kondisi optimum μ PADs yang dapat digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan dan total fenolik.
2. Analisis aktivitas antioksidan dan total fenolik pada sampel dapat langsung langsung diidentifikasi melalui intensitas warna RGB hasil scan μ PADs melalui aplikasi *image J*.
3. Validasi metode μ PADs dalam analisis aktivitas antioksidan dan total fenolik dilakukan dengan metode spektrofotometri.

1.4 Batasan Masalah

1. μ PADs yang digunakan dalam penelitian ini didesain menggunakan *software* CorelDraw 2018 dan dicetak menggunakan metode *Wax Print* tipe printer Xerox ColorQube 8580 DN.
2. Uji aktivitas antioksidan dan total fenolik sampel masing- masing menggunakan metode *FRAP* dan metode Folin-Ciocalteu.
3. Sampel teh hijau yang digunakan dimaserasi dengan pelarut air pada suhu 25°C dan 90°C.

1.5 Manfaat penelitian

1. Mengembangkan perangkat analisis baru yang dapat digunakan untuk mengontrol kualitas produk tambahan nutrisi yang mengandung antioksidan dengan cara yang mudah, murah dan cepat.
2. Salah satu metode yang tidak banyak menggunakan bahan kimia. Ramah lingkungan dan membutuhkan preparasi sampel yang sederhana.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PADs)

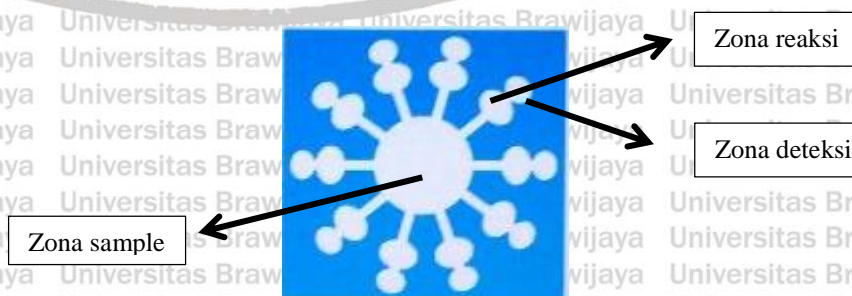
2.1.1 Metode Pembuatan μ PADs

Microfluidic paper based analytical devices atau μ PADs pertama kali dijelaskan oleh Whitesides dkk pada tahun 2007 [17]. μ PADs merupakan suatu perangkat analisis yang sederhana melalui penggunaan volume minimal untuk sampel dan reagen sehingga lebih mudah dibuat. Pembuatan perangkat dapat dibuat melalui pembuatan jaringan serat hidrofilik yang berpori yang dapat menyerap larutan dengan penggunaan jaringan kapiler tanpa menggunakan daya eksternal. Pengendalian aliran reagen dan sampel dilakukan melalui pembuatan pola penghalang hidrofobik dan daerah hidrofilik. Perangkat analisis μ PADs juga bertujuan untuk menyediakan perangkat analitis mudah digunakan dan dapat digunakan sebagai salah satu alternative perangkat analisis di tempat yang memiliki keterbatasan teknis.

Menurut Takeshi ada empat metode pembuatan yaitu metode fotolithografi (*photolithography*), metode pemotongan (*craft cutting*), metode sablon (*screen printing*) dan metode pencetakan (*wax printing*). Masing-masing metode tersebut memiliki kelebihan dan kekurangan. Metode *photolithography* menggunakan paparan sinar UV. Bagian yang tidak diinginkan dihilangkan dengan pelarut untuk membentuk bagian hidrofilik, untuk bagian hidrofobik dilakukan penetrasi. Penetrasi dilakukan dengan menggunakan lampu UV dan *hotplate*. Secara garis besar prinsipnya kertas direndam dalam fotoresis SU-8, dikeringkan, dijepit, dipapir UV, dan dipanaskan. Kelemahan menggunakan metode ini melalui proses

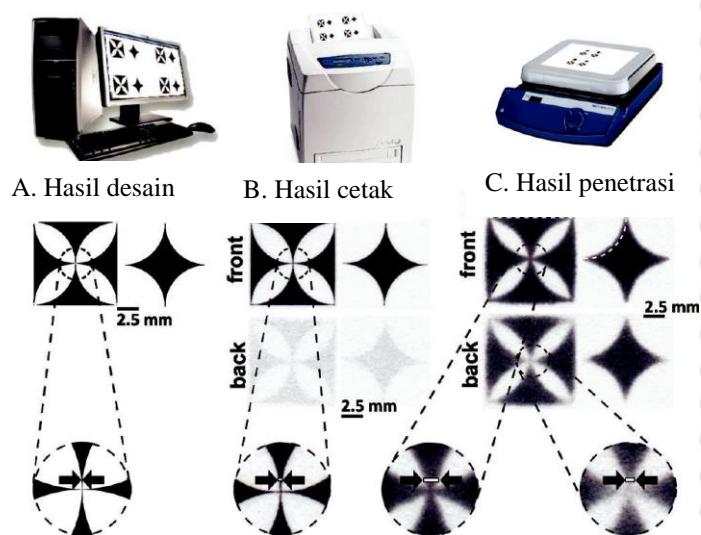
pembuatan panjang sehingga membutuhkan waktu yang lama [19]. Hasil pembuatan μ PADs mudah patah. Metode pemotongan (*craft cutting*) Keuntungan dari metode ini tidak menggunakan pelarut organik saat pembuatan μ PADs. Namun memiliki kekurangan yaitu banyak material yang dibuang, perlu dilakukan stabilitas mekanis seperti ketajaman pisau untuk memotong, keterbatasan pisau untuk memotong pada sudut yang bervariasi tergantung desain yang dibuat dan saat proses pemotongan rentan untuk terjadi kerusakan pada kertas.

Wax screen-printing lebih murah dari beberapa metode sebelumnya karena hanya membutuhkan layar sablon dan hotplate. Namun memiliki kekurangan hilangnya resolusi daerah hidrofilik akibat dari penyebaran lilin setelah dilakukan aktivasi pemanasan pada *hotplate* dan untuk mendapatkan hasil resolusi yang baik harus dilakukan pengulangan dan hasilnya kurang konsisten sehingga menyebabkan kebocoran reagen. *Wax printing* menjadi metode yang paling banyak digunakan karena sederhana, cepat dan menggunakan peralatan yang mudah didapatkan. Sehingga memungkinkan dalam proses pembuatan masal dapat dilakukan dengan cepat [18]. Hasil dari pengembangan μ PADs melalui *wax printing* oleh Kaneta [19,20] terdapat 3 zona yaitu zona sampel, zona reaksi, dan zona deteksi dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Pengembangan Metode μ PADs oleh Kaneta

Pembentukan bagian hidrofilik dan hidrofobik pada μ PAD menurut Emanuel ada 3 langkah dasar yaitu pembuatan desain gambar, mencetak pada kertas Whatman dan hasil cetak desain dipanaskan. Langkah-langkah pembuatan pola hidrofobik di kertas dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Langkah-langkah Pembuatan Pola Hidrofobik di Kertas [21]

Pembuatan desain dapat menggunakan aplikasi *corel draw*, *photoshop* dan *powerpoint 2010*. Printer mencetak lilin padat pada permukaan kertas, dan agar terjadi penetrasi lilin pada kertas maka hasil cetakan pada kertas diletakkan pada *hotplate* dengan pengaturan suhu 120 °C. Selanjutnya untuk terbentuk hidrofobik pada μ PAD maka setelah hasil penetrasi diletakkan pada suhu kamar [21].

2.1.2 Pola Hidrofobik pada μ PADs

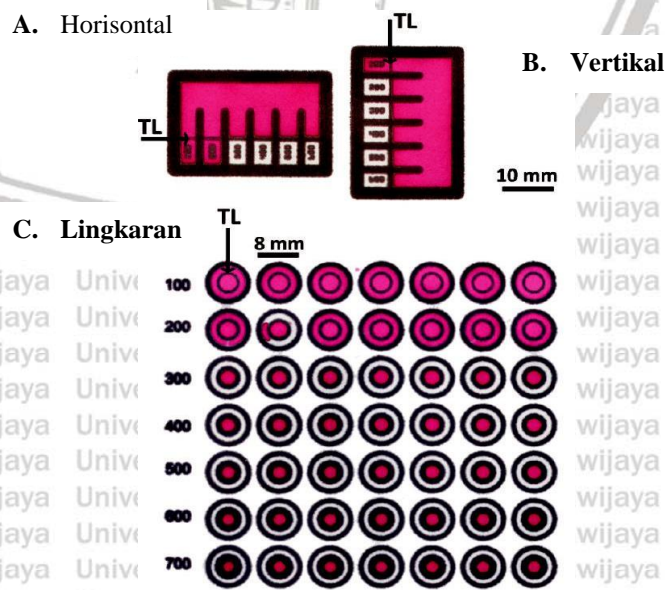
Emanuel Carrilho telah melakukan percobaan pembuatan bagian hidrofobik pada μ PAD dengan menggunakan *wax printer* dan *hotplate*. Pada proses pembuatan pola hidrofobik melibatkan dua proses inti yaitu (i) pola pencetakan lilin pada permukaan kertas dan (ii) melelehkan lilin ke kertas untuk membentuk penghalang hidrofobik. Printer mencetak pola-pola lilin pada permukaan kertas dan hasil pola lilin dilelehkan pada *hotplate* sehingga menembus kertas (penetrasi) [21]. Proses

ini menghasilkan penghalang hidrofobik pada kertas yang menentukan saluran hidrofilik, reservoir cairan, dan zona deteksi. Proses penetrasi lilin di permukaan kertas dipengaruhi serat kertas dan proses aliran kapiler kertas yang terjadi melalui arah horizontal atau vertikal. Penyebaran lilin ke arah horisontal lebih cepat menyebar sehingga dapat menurunkan resolusi pola cetak dan menghasilkan hambatan hidrofobik yang lebih lebar dari ukuran semula.

Hal tersebut terbukti ketika menggunakan printer Xerox Phaser 8560N.

Percobaan yang telah dilakukan dengan ketebalan garis 200 μm . Hasil menunjukkan beberapa perbedaan dalam pola horizontal, vertikal, dan lingkaran. Pencetakan pada garis uji vertikal dengan ketebalan 200 μm menghasilkan hambatan fungsional pada 86%, sedangkan garis uji horisontal dan melingkar lebar 200 μm menghasilkan hambatan fungsional hanya dalam 14%. Pada bentuk lingkaran tercetak secara efektif karena terdapat perpaduan garis vertikal dan horizontal [21]. Hasil cetak hidrofobik sebagai *test line* (TL) dapat dilihat pada

Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Hasil Cetak Hidrofobik sebagai Garis Uji *Test Line* (TL) [21]

Hasil sebelum dan setelah penetrasi lilin pada kertas dapat dilihat pada Gambar 2.4.

Cara yang dapat digunakan untuk mengukur lebar hidrofobik demikian terkait dengan lebar garis dicetak oleh persamaan 1 :

$$W_B = W_P + 2L \quad (1)$$

Keterangan :

W_B = lebar penghalang

W_P = lebar garis dicetak

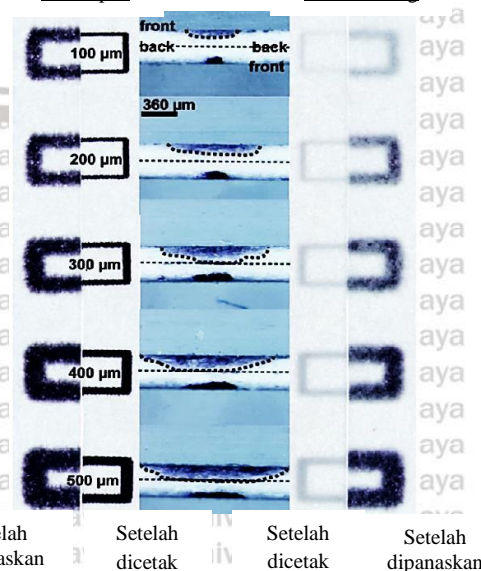
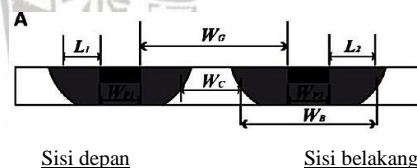
L merupakan jarak lilin menyebar dari tepi garis dicetak (mikrometer) dan nilai L dapat ditentukan secara eksperimen dengan mengukur lebar garis dicetak dan lebar hidrofobik yang dihasilkan. Untuk menghitung lebar hidrofilik menggunakan persamaan 2 :

$$W_C = W_G - 2L \quad (2)$$

Keterangan :

W_C = lebar saluran hidrofilik

W_G = jarak antara dua garis dicetak (mikrometer) diukur di tepi garis.



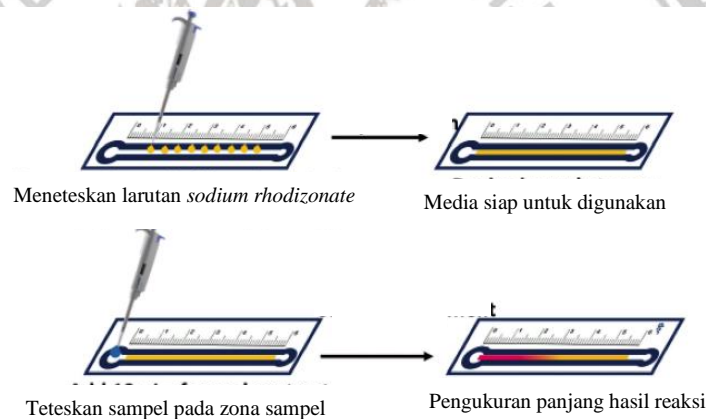
Gambar 2.4 Hasil Sebelum dan Setelah Penetrasi Tinta lilin pada kertas [21]

2.1.3 Aplikasi Sampel pada μ PADs

Aplikasi μ PADs dapat dilakukan untuk mengontrol kualitas lingkungan.

Penelitian yang telah dilakukan Jayawardane berbasis μ PAD dikembangkan untuk penentuan nitrit dan nitrat pada sampel perairan lingkungan dan air minum. Hasil analisis dilakukan dalam keadaan optimum maka didapatkan range konsentrasi Pb yang dapat diidentifikasi 50-100 ppm. Nilai RSD yang didapat kurang dari 2,1%.

Metode yang digunakan adalah metode kolorimetrik dari perubahan warna senyawa kompleks yang menjadi dasar dari penentuan panjang hasil deteksi, membutuhkan waktu yang sangat cepat yaitu 20 - 60 detik [22]. Ilustrasi identifikasi Pb pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Ilustrasi Identifikasi Pb pada μ PADs [22]

Penelitian yang dilakukan yaitu Alahmad pada tahun 2018, yaitu menggunakan metode μ PADs untuk pemantauan kadar Cr (VI) dengan batas deteksi rendah dalam sampel kualitas air. Analisis dilakukan melalui pendekatan kolorimetrik dan kombinasi penyaringan *HF-LPME* saat preparasi sampel.

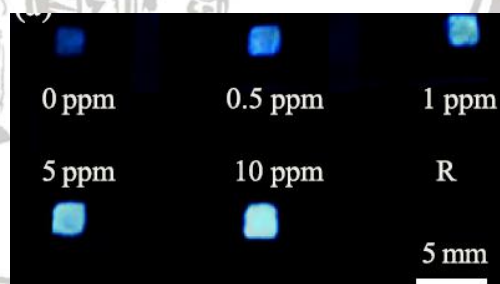
Pembuatan μ PADs menggunakan *wax printer* ColorQube 8570DN, Xerox, CT, USA dan suhu penetrasi 120 °C selama 3 menit. Hasil analisis menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki sensitivitas yang tinggi berdasarkan hasil *LOD*

sebesar $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [23]. Identifikasi Cr (VI) pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Ilustrasi Deteksi Kolorimetri Cr (VI) pada μPADs [23]

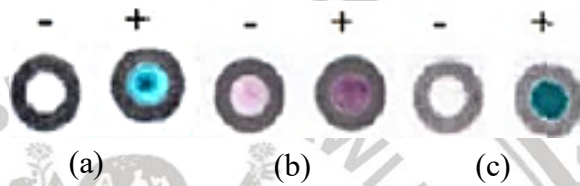
Aplikasi μPADs dapat dilakukan untuk mengontrol kualitas makanan. Penggunaan μPADs yang digunakan untuk mengukur kadar formalin. Hasil dari penelitian (Liu, 2018) menunjukkan ditemukannya warna fluoresen dari formalin yang terkandung dalam makanan. Suhu penetrasi hidrofobik yang digunakan yaitu 180°C dengan proses pencetakan untuk menghindari adanya kebocoran sampel [15]. Hasil perubahan warna pada formaldehida dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Hasil Perubahan Warna pada Formaldehid [15]

Perangkat μPADs telah dikembangkan (Jokerst, 2012) untuk mendeteksi *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, dan *L. monocytogenes* dalam sampel makanan sebagai sistem seleksi makanan. Pada penelitian ini μPADs dibuat dengan menggunakan software *CorelDraw* dan dicetak dengan wax printer pada kertas saring. Memiliki ketebalan garis 4 pt, digunakan dipenetrasi menggunakan *hotplate*

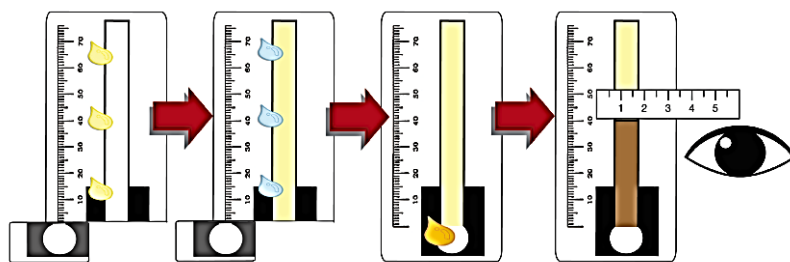
pada suhu 150°C selama 5 menit. Deteksi dicapai dengan mengukur perubahan warna saat enzim pada patogen yang menarik bereaksi dengan substrat. Waktu yang digunakan untuk identifikasi kurang 12 jam pada metode konvensional biasanya dibutuhkan waktu 3-5 hari. Pada hasil analisis dengan metode μ PADs mampu mendeteksi bakteri dalam konsentrasi dalam daging siap makan. Metode ini digunakan sebagai metode alternatif karena hemat, cepat dan mudah digunakan saat analisis [61]. Hasil perubahan warna untuk deteksi *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, dan *L. monocytogenes* dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Hasil perubahan warna untuk deteksi (a) *E. coli*, (b) *Salmonella typhimurium*, dan (c) *L. monocytogenes* [61]

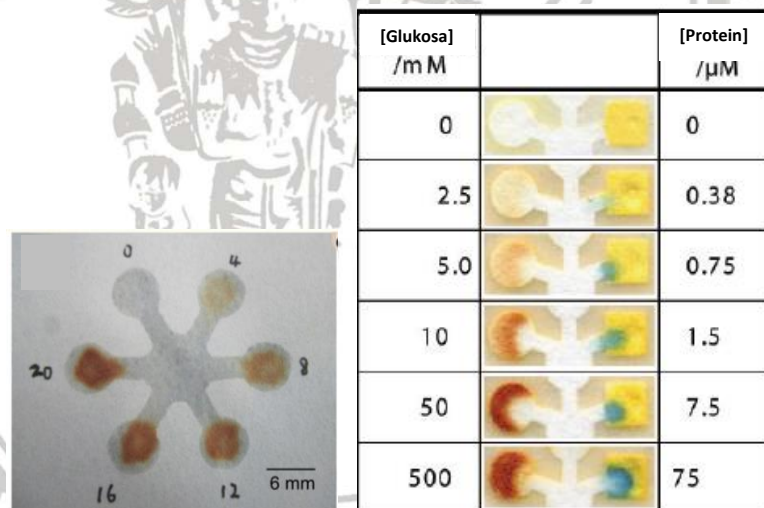
Penelitian pada sampel minuman dilakukan untuk pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel teh hijau. Hasil dari penelitian ini yaitu memiliki kestabilan selama 50 hari baik bila disimpan pada suhu rendah yaitu 6 sampai -20°C. Dibandingkan dengan metode standar yang digunakan yaitu memiliki tingkat kepercayaan 95%. Pengukuran dilakukan berdasarkan hasil jarak reaksi melalui penambahan nanoceria Ce⁴⁺ yang diletakkan di sepanjang saluran deteksi [25].

Ilustrasi pengukuran kadar antioksidan pada sampel dapat dilihat pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9 Skema Prosedur untuk Analisis Aktivitas Antioksidan pada μ PADs [25]

Aplikasi $\mu PADS$ dapat dilakukan untuk mengontrol kesehatan. Penelitian yang dilakukan (Cai, 2014) mengembangkan aplikasi $\mu PADS$ untuk penentuan kadar glukosa pada sampel urin. Pembuatan $\mu PADS$ melalui pembuatan pola hidrofobik dan diprint menggunakan printer inkjet. Hasil analisis dapat dikatakan baik dan sensitive ditinjau dari koefisien korelasi 0,980 dan LOD 2,47 mmol/L [26]. Penelitian (Martinez, 2010) pada $\mu PADS$ dikombinasi dengan prinsip uji *chemiluminescence*. Analisis dilakukan untuk penentuan glukosa dan protein pada sampel urin. Hasil analisis didapat dengan mendapatkan perubahan warna sehingga pengembangan metode ini dapat berlangsung secara multi deteksi dan cepat karena membutuhkan waktu tidak lebih dari 30 menit [27]. Hasil Uji dapat dilihat pada Gambar 2.10.



Gambar 2.10 Hasil A) Uji Glukosa pada $\mu PADS$ dengan Variasi Konsentrasi Glukosa 0-20 mmol.L⁻¹ [26] B) Multi Deteksi Glukosa dan Protein [27]

2.2 Teh Hijau (*camellia sinensis*)

2.2.1 Taksonomi Teh Hijau (*camellia sinensis*)

Camellia sinensis merupakan bahan untuk minuman teh hijau atau *green tea* yang banyak dikonsumsi masyarakat setelah air. Diperkirakan bahwa lebih dari 3,6

juta ton daun teh diproduksi setiap tahun di 40 negara [28]. Menurut Graham taksonomi teh hijau (*camellia sinensis*) dapat diklasifikasikan sebagai berikut dan teh hijau (*camellia sinensis*) dapat dilihat pada Gambar 2.11 [29]:



Gambar 2.11 *camellia sinensis* (L.) [29]

Kingdom : *plantae*

Devisi : *magnoliophyta*

Klas : *magniliopsida*

Ordo : *Ericales*

Family : *teaceae*

Gebus : *camellia*

Spesies : *camellia sinensis*

Nama binomial : *camellia sinensis* L. Kuntze

Tanaman teh *camellia sinensis* tumbuh di daerah tropis dan saat ini banyak dibudidayakan di Asia Selatan dan Tenggara [29]. *Camellia sinensis* tumbuh di semak cemara dan berukuran kecil biasanya ketika dibudidayakan daunnya dipangkas hingga kurang dari dua meter. *Camellia sinensis* memiliki akar tunggang yang kuat, bunganya berwarna kuning terdiri 7 hingga 8 kelopak dan diameter 2,5-4 cm. Banyak sekali olahan *camellia sinensis* yaitu benihnya dapat dijadikan minyak goreng, daunnya diolah menjadi minyak esensial yang serta untuk minuman teh. Teh merupakan salah satu produk olahan yang biasa dikonsumsi masyarakat

[30]. Berdasarkan proses fermentasi ada tiga jenis teh yang diperoleh dari tanaman *camellia sinensis* yaitu teh hijau, teh oolong dan teh hitam.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa teh hijau memiliki beragam aktivitas biologis yaitu antioksidan [31], antimutagenik, antikarsinogenik, antibakteri dan antivirus [29]. Beberapa penelitian telah membuktikan manfaat teh hijau yaitu mengurangi gejala hipertensi [32], mengurangi risiko penyakit kardiovaskular [32, 31], melindungi radiasi ultraviolet [29,32], mengontrol berat badan dan mempertahankan aktivitas neuroprotektif. Komposisi dari teh hijau menurut Belitz dan Grosh dapat dilihat pada Tabel 2.1 [32]

Tabel 2.1 Komposisi (%) dari Teh Hijau dari Belitz dan Grosh [32]

Komponen	Komposisi (%)
Protein	16
Asam amino	4
Serat	26
Karbohidrat	7
Lipid	7
Pigment	2
Mineral	5
Senyawa fenolik	30

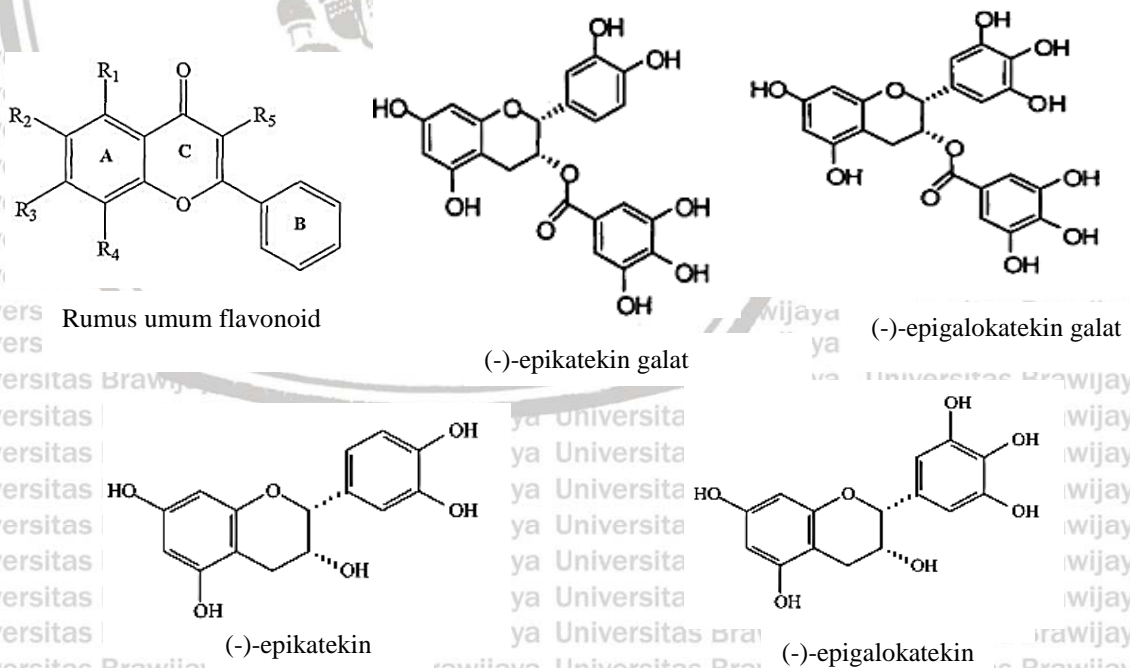
2.2.2 Antioksidan pada Teh Hijau

Menurut Gupta, et al, Hampir 4.000 senyawa bioaktif pada teh dikontribusikan oleh fenolik [29]. Fenolik yang ditemukan dalam teh kebanyakan flavonoid. Flavonoid merupakan komponen senyawa hidrokarbon yang terdiri dari 15 karbon dengan 2 gugus aromatik yang terhubung dengan jembatan 3 atom karbon, seperti pada gambar 2.2. Senyawa flavonoid merupakan senyawa metabolisme sekunder dari tanaman yang berasal dari kondensasi asam sinamat bersama tiga gugus malonyl-CoA [26]. Di dalam teh ada beberapa jenis flavonoid seperti yang tertulis pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Jenis-jenis Flavonoid [26]

Flavonoid	Contoh
Flavanol	EGCG, EG, ECG, dan katekin
Flavonols	Kaempferol dan Quercetin
Antosianidin	Malvidin, sianidin, delphinidin
Flavon	Apigenin dan rutin
Flavonon	Mirisetin
Isoflavonoid	Genistein dan biokanin

Flavonoid dalam teh hijau yaitu katekin (flavan-3-ols) yang memiliki manfaat pada kesehatan [30]. Katekin utama yang terkandung dalam teh hijau adalah (-)-epikatekin yang mewakili sekitar 6,4% dari total katekin; (-)-epigalokatekin sekitar 19%; (-)-epikatekin galat sekitar 13,6% dan (-)-epigalokatekin galat sekitar 59% [25] dapat dilihat pada Gambar 2.2. Teh hijau juga mengandung asam galat dan asam fenolik, asam klorogenat, asam caffeic, dan flavonol seperti kaempferol, myricetin dan quercetin [27].



Gambar 2.12 Stuktur Katekin dan Rumus Umum Flavonoid [33]

2.3 Analisis Aktivitas Antioksidan dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas, menghambat terjadinya kerusakan sel dan berperan penting dalam mencegah timbulnya penyakit degeneratif. Produksi radikal bebas pada tubuh dipengaruhi oleh factor lingkungan seperti polusi udara, asap dan sinar matahari. Antioksidan dalam darah, sel dan cairan jaringan berperan penting dalam menurunkan tingkat stres oksidatif. Stres oksidatif adalah suatu keadaan radikal bebas dalam tubuh melebihi kapasitas tubuh untuk menetralkan [28]. Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul reaktif yang memiliki electron tidak berpasangan.

Uji aktivitas antioksidan dapat dibedakan menjadi 3 golongan, yaitu golongan *Hydrogen Atom Transfer Methods (HAT)*, seperti *Lipid Peroxidation Inhibition Capacity Assay (LPIC)* dan *Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)*. Golongan kedua dengan prinsip *Electron Transfer Methods (ET)*, misal *1,1- diphenyl-2- picrylhydrazil (DPPH)* dan *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)*. Adapun yang termasuk golongan ketiga adalah metode seperti *Chemiluminescence, Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC)* dan total aktivitas antioksidan [34].

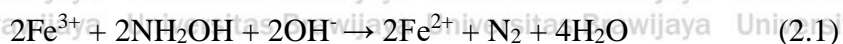
Metode uji aktivitas antioksidan yang dapat digunakan adalah DPPH. Radikal bebas yang digunakan pada metode ini adalah larutan DPPH, yang akan bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga DPPH akan berubah menjadi *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin* yang bersifat non-radikal. Terjadinya perubahan warna dari ungu tua menjadi merah muda atau kuning pucat merupakan tanda adanya peningkatan jumlah *1,1- diphenyl-2-picrylhydrazin* yang terbentuk [42,43].

Kelemahan pada metode ini adalah perubahan warna yang kurang stabil dan kondisi

pH yang harus stabil pada keadaan asam. Selanjutnya diamati absorbansinya dengan spektrofotometer untuk menentukan aktivitas antioksidannya. Prinsip spektrofotometri pada panjang gelombang sinar tampak sekitar 515-517 nm [35].

Metode lain yang sering digunakan untuk uji aktivitas antioksidan yaitu metode *FRAP*. Metode *FRAP* adalah metode penentuan kandungan antioksidan erdasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan untuk mereduksi ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} [36-38]. Metode ini awalnya dikenalkan oleh Benzie dan Strain menggunakan 2,4,6-trypridyl-*s*-triazine (*TPTZ*) yang membuat ion ferro menjadi senyawa kompleks berwarna biru. Reagen lain yang juga dapat memberikan warna spesifik pada ion ferro adalah 1,10-fenantrolin. Ion ferro akan bereaksi dengan 1,10-fenantrolin akan membentuk kompleks berwarna jingga-merah $[(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3.\text{Fe}]^{2+}$ yang intensitas warnanya tidak bergantung pada keasaman dalam rentang pH 2-9 dan stabil dalam waktu yang lama. Senyawa kompleks ini dapat diaplikasikan melalui spektrofotometri pada pemilihan panjang gelombang 400-600 nm [40].

Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan Fransisco dengan menggunakan 0,20% 1, 10-fenantrolin sebanyak 5,0 mL dan 1,0 mL larutan hidroksilamin hidroklorida 10% ke larutan FeCl_3 [39]. Tujuan penambahan hidroksilamin hidroklorida dalam untuk menghindari reaksi samping yang dapat mengganggu pengukuran absorbansi sehingga menyebabkan penyimpangan kimia. Sehingga persamaan ion yang diinginkan adalah seperti yang ditunjukkan dalam persamaan 1 di bawah ini.



Tujuan penambahan 5,0 mL larutan 1, 10-fenantrolin 0,20% ke larutan Fe^{3+} yaitu pada pembentukan senyawa kompleks dan menstabilkan pembentukan warna

senyawa kompleks yang akan dipindai dalam spektrofotometer pada panjang gelombang 350-600nm.



berwarna jingga

2.4 Analisis Total Fenolik dengan Reagen Folin-Ciocalteu Secara

Spektrofotometri UV- Vis

Pengukuran senyawa fenolik total pada tanaman dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri dan kromatografi. Secara spektrofotometri reagen Folin-Ciocalteu (FC) banyak digunakan karena memiliki banyak kelebihan, diantaranya metode sederhana (*simple*), sensitif, dapat diulang (*reproducible*), hasilnya relatif akurat, telah digunakan secara luas untuk mengukur antioksidan fenolik, dan pengaruh matrik dari sampel dapat diminimalkan pada pemilihan panjang gelombang 600-800 nm.

Metode Folin-Ciocalteu adalah reaksi oksidasi reduksi kolorimetrik gugus hidroksil pada sampel dengan larutan kompleks ion polimerik dari asam fosfomolibdat dan asam heteropolifosfat untuk mengetahui kadar fenolik total sampel. Fenolik yang dihasilkan selama reaksi akan membentuk kompleks fosfat-fosfomolibdat yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna dari reagen awal Folin-Ciocalteu yang berwarna kuning jernih berubah menjadi warna biru. Reagen Folin-Ciocalteu merupakan larutan terlarut pada air, natrium tungstat, natrium molibdat, asam fosfat, asam klorida, litium sulfat, dan bromin. Senyawa fenolik bereaksi dengan oksidator fosfomolibdat dibawah kondisi alkalis menghasilkan senyawa fenolat dan molibdenum berwarna biru [51,52].

Tingginya intensitas warna biru yang terbentuk setara dengan banyaknya kandungan senyawa fenolik dalam sampel. Total fenolik dalam sampel diperoleh

dengan memasukkan nilai absorbansi sampel pada persamaan kurva kalibrasi standar asam galat. Penggunaan asam galat sebagai larutan standar dikarenakan asam galat memiliki gugus hidroksil dan ikatan rangkap terkonjugasi pada masing-masing cincin benzena sehingga senyawa ini mudah bereaksi membentuk kompleks dengan reagen Folin-Ciocalteu serta merupakan unit penyusun senyawa fenolik.

Pengukuran total fenolik pada sampel dengan spektrofotometri UV VIS dapat dilakukan melalui 0,1 ml ekstrak sampel ditambahkan 0,5 ml reagen Folin-Ciocalteu, yang diikuti dengan penambahan 2 ml larutan Na_2CO_3 7,5% [41]. Cairan kemudian divortex dan dibiarkan (diinkubasi) selama 30 menit. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 760 nm. Absorbansi yang terbaca merupakan nilai y yang dimasukkan ke dalam persamaan garis yang didapat dari pembuatan kurva standar asam tanat konsentrasi 25-125 mg/L. Dengan demikian akan diperoleh kandungan total fenol (nilai x) sampel yang dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam tanat/g sampel ekstrak.

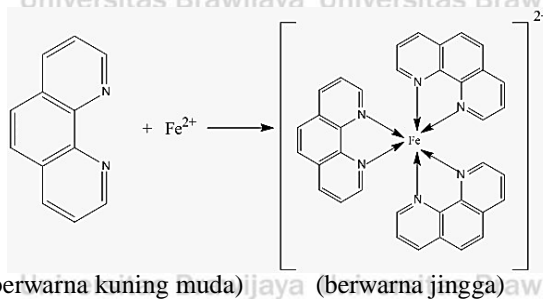
BAB III KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan analisis dengan menggunakan pengembangan metode analisis μ PADs untuk uji aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolik.

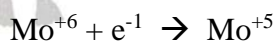
Analisis dengan menggunakan μ PADs memberikan banyak kelebihan dilihat dari segi penggunaan jumlah bahan baik reagen maupun sampel yang efisien, tidak membutuhkan banyak bahan karena jumlah bahan yang digunakan untuk analisis dalam ukuran microliter. Analisis dilakukan dengan pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan metode *FRAP* dan reagen Folin-Ciocalteu untuk menguji total fenolik.

Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan melalui metode *FRAP* (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Prinsip metode *FRAP* adalah adanya reduksi ion ferri menjadi ion ferro oleh senyawa antioksidan sehingga menyebabkan perubahan warna. Agar mendapatkan warna yang spesifik pada ion ferro dapat ditambahkan 1,10-fenantrolin. Ion ferro akan bereaksi dengan 1,10-fenantrolin akan membentuk kompleks berwarna jingga-merah $[(C_{12}H_8N_2)_3.Fe]^{2+}$ yang intensitas warnanya tidak bergantung pada keasaman dalam jangka pH 2-9 dan stabil dalam waktu yang lama [48]. Senyawa kompleks ini dapat dibaca absorbansinya pada λ 510 nm [49]. Metode ini seringkali diaplikasikan menggunakan spektrofotometri UV Vis. Reaksi Pembentukan Senyawa Kompleks Fe^{2+} dengan Fenantrolin dapat dilihat pada Gambar 3.1.

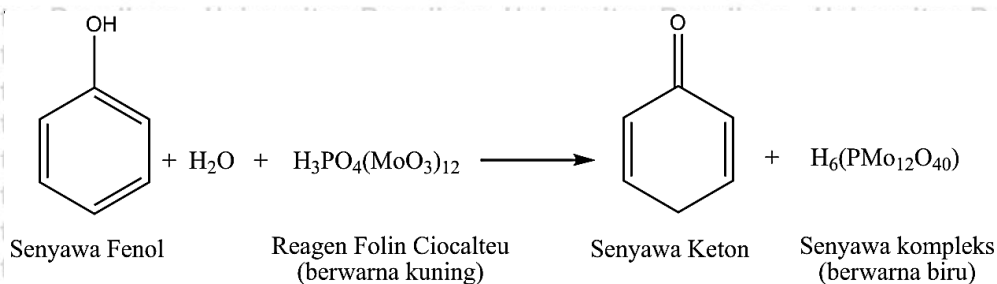


Gambar 3.1 Reaksi Pembentukan Senyawa Kompleks Fe^{2+} dengan Fenantrolin [39]

Kandungan fenol dari sampel yang mengandung antioksidan dapat diketahui dengan mengukur kapasitas reduksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu menggunakan spektrofotometri UV Vis. Pereaksi Folin-Ciocalteu ini terbuat dari air, natrium tungstat, natrium molibdat, asam fosfat, asam klorida, litium sulfat, dan bromin [51]. Metode ini mengukur kemampuan sampel pada kondisi basa dengan menambahkan larutan buffer Na_2CO_3 [51-52]. Selain bertujuan sebagai buffer ditamhkannya larutan Na_2CO_3 menyebabkan senyawa antioksidan yang diwakili dengan senyawa fenolik mengalami disosiasi untuk membentuk anion fenolat yang mampu mereduksi pereaksi Folin-Ciocalteu yang menghasilkan larutan berwarna biru.



Tingginya intensitas warna biru yang terbentuk setara dengan banyaknya kandungan senyawa fenolik dalam sampel. Terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru yang dapat diukur pada panjang gelombang 775 nm [41]. Total fenolik dalam sampel diperoleh dengan memasukkan nilai absorbansi sampel. Reaksi antara fenolik dalam sampel dengan reagen Folin Ciocalteu dapat dilihat pada Gambar 3.2.



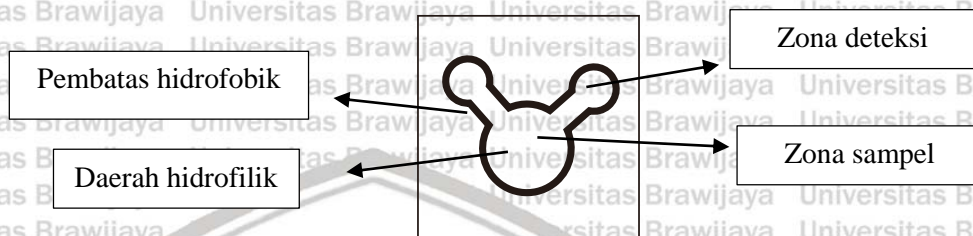
Gambar 3.2 Reaksi senyawa fenolik dengan reagen Folin-Ciocalteu [51]

Pada penelitian ini memberikan metode alternatif untuk mengidentifikasi aktifitas antioksidan dan kandungan total fenolik melalui metode μ PADs. Dengan prinsip yang sama, metode ini memiliki kelebihan diantaranya yaitu metode ini adalah metode analisis yang inovatif [46]. Penggunaan metode μ PADs untuk analisis dapat memberikan banyak kelebihan dilihat dari segi penggunaan jumlah bahan baik reagen maupun sampel yang efisien, tidak membutuhkan banyak bahan karena jumlah bahan yang digunakan untuk analisis dalam ukuran mikroliter. Kelebihan lainnya dari metode ini adalah biaya pembuatannya yang murah dan cepat [47].

Banyaknya kelebihan yang dimiliki oleh metode μ PADs diharapkan dapat banyak kemudahan pada ilmu pengetahuan dan teknologi terutama dibidang kimia analisis. Salah satu kemudahannya seperti pada metode alternative pada penelitian ini memberikan metode yang dapat digunakan mengetahui aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolik yang terkandung dalam sampel teh hijau ini meminimalisir menggunakan larutan kimia berbahaya dan peralatan *glassware* dalam pelaksanaannya sehingga akan menghasilkan proses analisis yang cepat, lebih mudah dan ramah lingkungan dalam pelaksanaannya.

Teknik yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan teknik pencetakan lilin dalam pembuatan pola μ PADs. Teknik pencetakan lilin merupakan teknik

pembuatan pola μ PADs 2 dimensi yang cepat dan tidak mahal [12] dimana pola akan tercetak menggunakan *printer wax* Xerox Colorqube 8580 pada kertas kromatografi Whatman no. 1 dan untuk menentukan daya rambat optimum pada sampel dilakukan optimasi suhu dan waktu penetrasi.



Gambar 3.3. Desain μ PADs yang kan dibuat

Pola desain dibuat dengan menggunakan *software CorelDraw* 2018, dapat dilihat pada Gambar 3.3. Desain dibuat dengan dua bagian yaitu bagian yang pertama adalah daerah hidrofilik sebagai media untuk tersimpannya reagen, sampel dan terjadinya reaksi kimia. Bagian yang kedua yaitu pola yang dibentuk dari pembatas hidrofobik yang bertujuan sebagai pembatas daerah hidrofilik sesuai desain yang diharapkan dan agar tidak terjadi kebocoran *channel*. Bagian pembatas hidrofobik harus dilakukan pemanasan pada *hotplate* agar terjadi penetrasi sempurna maka perlu dilakukan optimasi suhu dan waktu penetrasi.

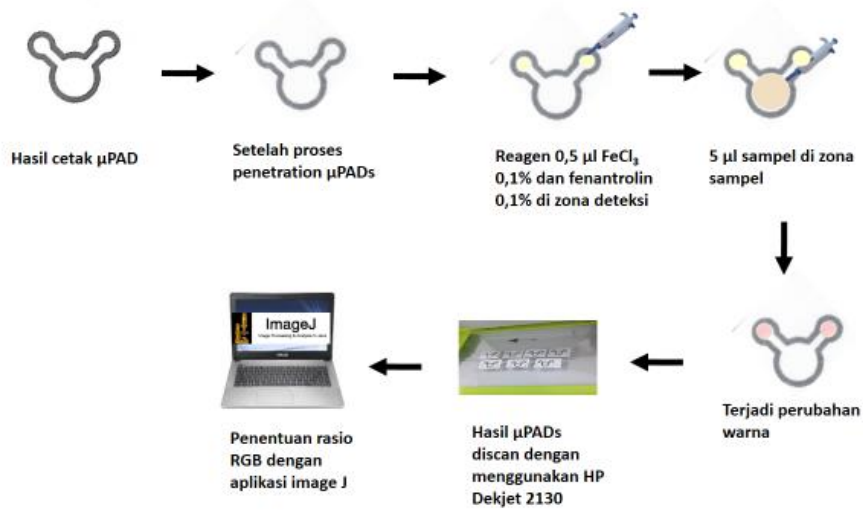
Preparasi sampel teh hijau komersial yaitu untuk mendapatkan ekstraknya melalui proses maserasi dengan menggunakan suhu 25°C dan 90°C. Sampel ekstrak teh hijau diiteteskan pada zona sampel merambat melalui cabang saluran dan akan bertemu dengan reagen dan bereaksi pada zona deteksi. Perubahan warna yang terjadi pada zona deteksi akan diamati perubahan warnanya. Pengukuran intensitas warna *RGB* pada zona deteksi akan menunjukkan aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolik pada sampel teh hijau. Beberapa parameter yang dioptimasi

yaitu volume sample, konsentrasi reagen dan konsentrasi larutan standard.

Berdasarkan hasil optimum yang diperoleh diharapkan pengembangan metode ini dapat digunakan untuk menguji antioksidan dan menentukan total fenolik dengan mudah dan akurat.

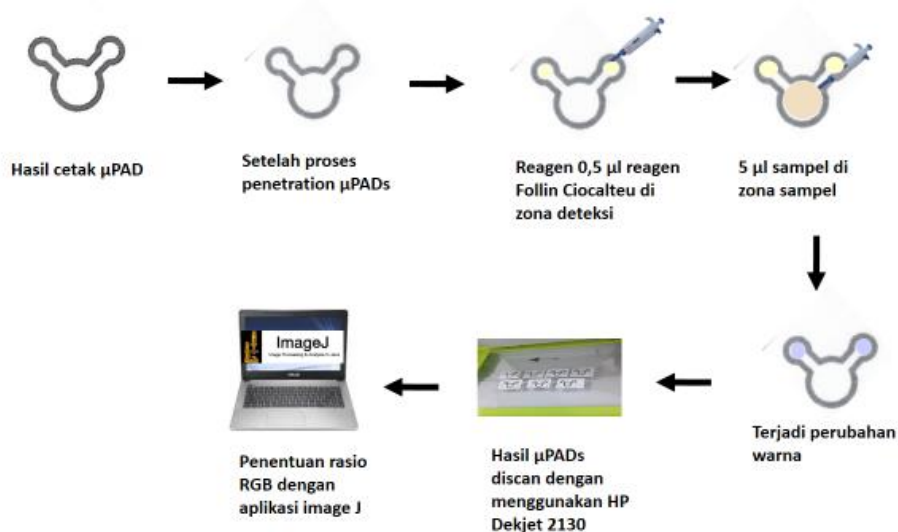
Hasil yang didapatkan dari analisis ini akan memberikan perubahan warna yang dengan mudah diukur dari hasil *scanning*. Aktivitas antioksidan dan total fenolik pada sampel akan dengan mudah diketahui dari perubahan warna yang terjadi pada zona deteksi $\mu PADS$ yang dibandingkan dengan perubahan warna pada zona deteksi $\mu PADS$ standar asam galat. Warna tersebut akan diambil gambarnya melalui *scanner* yang berfungsi untuk menangkap gambar dari zona deteksi, yang selanjutnya menggunakan *software Image J* untuk memproses gambar tersebut menjadi komponen merah (*R*), hijau (*G*), dan biru (*B*). Rasio *RGB* diambil sebagai kuantifikasi dari gambar warna.

Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode $\mu PADS$ menggunakan metode yang dilakukan oleh (Francisco, 2013) dengan beberapa modifikasi terutama penggunaan metode $\mu PADS$. Reagen *FRAP* ditetaskan di zona deteksi yaitu terdapat 2 reagen yang terdiri dari $FeCl_3$ dan fenantrolin [39]. Ekstrak sampel teh hijau ditetaskan di zona sampel dan perubahan warna dapat diamati. Perubahan warna yang ditunjukkan oleh $\mu PADS$ diamati dan diidentifikasi intensitas warna *RGB* berdasarkan hasil *scan*. Hasilnya diproses dengan perangkat lunak *Image J* untuk menentukan nilai *RGB*. Tahap penentuan aktivitas antioksidan ekstrak sampel teh hijau menggunakan $\mu PADS$ dapat dilihat pada Gambar 3.4.



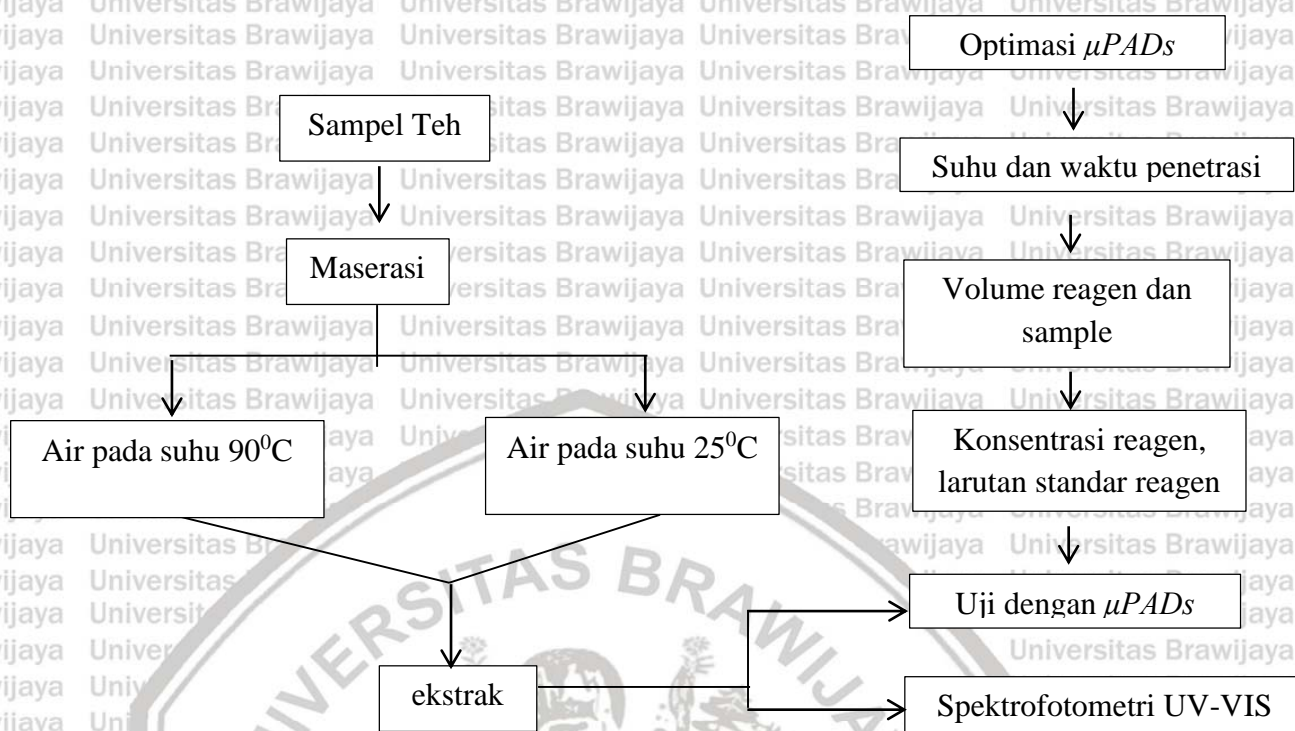
Gambar 3.4. Tahap Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Teh Hijau menggunakan μ PADs

Penentuan kandungan total fenolik menggunakan metode μ PADs menggunakan metode yang dilakukan oleh Sateanchok [44] dengan beberapa modifikasi terutama dalam desain perangkat μ PADs. Reagen Folin- Ciocalteu diteteskan di zona deteksi. Ekstrak sampel teh hijau diteteskan di zona sampel selanjutnya perubahan warna dapat diamati. Perubahan warna yang ditunjukkan oleh μ PADs diamati dan discan. Hasilnya diproses dengan perangkat lunak *Image J* untuk menentukan nilai *RGB*. Tahap penentuan kandungan total fenolik pada ekstrak sampel teh hijau menggunakan μ PADs dapat dilihat pada Gambar 3.5.



Gambar 3.5 Tahap Penentuan Kandungan Total Fenolik pada Teh Hijau Menggunakan μ PADs

3.2 Skema Konsep Penelitian



3.3 Hipotesis

Berdasarkan pendahuluan dan kerangka konsep maka yang menjadi hipotesis adalah:

1. Kondisi optimum $\mu PADs$ yang akan digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan dan total fenolik pada sampel teh hijau diperoleh dengan adanya variasi suhu, lama pemanasan pembatas hidrofobik dan variasi konsentrasi pada larutan pereaksi.
2. Konsentrasi sampel dapat langsung diidentifikasi melalui intensitas warna *RGB* hasil scan $\mu PADs$ dengan aplikasi *image J*.
3. Tidak ada perbedaan hasil yang signifikan antara kedua metode analisis yang digunakan.

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada tanggal Agustus 2018 sampai Mei 2019 bertempat di Laboratorium Instrumen Fakultas MIPA Jurusan Kimia, Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian : Neraca analitik, botol kaca berwarna coklat, gelas arloji, gelas Beaker, Erlenmeyer, tabung reaksi, mikro pipet, pipet volum, pipet tetes, labu ukur, *wax printer* Xerox ColorQube 8580 DN-2 tipe T2B047382, spektrofotometer UV-1800 (Shimadzu, Jepang), *scanner* HP Dekjet 2130 dan kertas kromatografi Whatman No.1.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian : 4 produk teh hijau komersial, asam galat (*Sigma Aldrich*), Folin-Ciocalteu (*Sigma Aldrich*), Na_2CO_3 (*Sigma Aldrich*), 1,10-fenantrolin (*Sigma Aldrich*), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (*Sigma Aldrich*), etanol (*Sigma Aldrich*) dan aquades.

4.3 Tahap Penelitian

1. Pembuatan μPADs

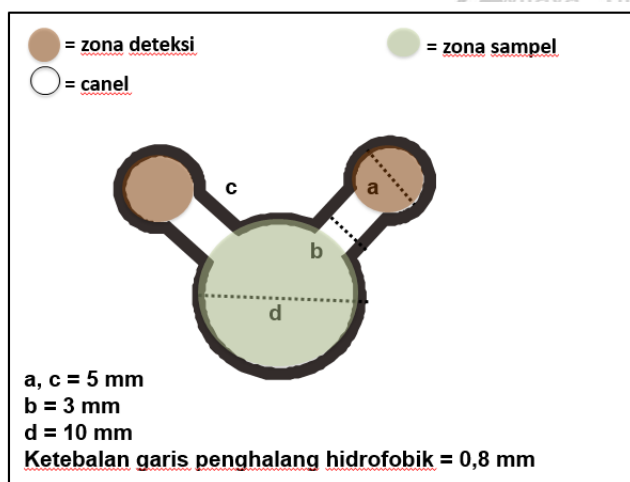
- Pembuatan desain μPADs dengan aplikasi *corelDraw* 2018
- Print desain dengan *wax printer* Xerox ColorQube 8580
- Penetrasi pembatas hidrofobik μPADs dengan *hotplate*

2. Optimasi metode
 - a. Optimasi suhu dan waktu penetrasi penghalang hidrofobik μ PADs
 - b. Optimasi konsentrasi sampel dan reagen
3. Preparasi larutan
 - a. Preparasi sampel
 - b. Preparasi larutan standar asam galat
4. Analisis sampel dengan penentuan nilai RGB
5. Validasi metode

4.4 Metode Kerja

4.4.1 Pembuatan μ PADs

Pembuatan μ PADs yang digunakan dengan penggunaan kertas kromatografi No. 1. Pembuatan hambatan hidrofobik pada kertas dimulai dengan pembuatan sebuah pola. Pembuatan gambar tersebut menggunakan program Coreldraw 2018 dengan detail seperti terlihat pada Gambar 4.1. Pembuatan desain μ PADs dengan menggunakan *software* corelDraw X8 dengan ketebalan garis 0.8 mm. Desain dicetak pada kertas kromatografi Whatman No. 1 dengan menggunakan tinta CMYK pada *wax printer* Xerox ColorQube 8580.



Gambar 4.1. Desain μ PADs dengan *software* Coreldraw 2018

4.4.2 Optimasi μ PADs

Optimasi perangkat μ PADs yang dilakukan meliputi optimasi suhu penetrasi dan jumlah reagen serta sampel yang dilakukan. Penentuan suhu penetrasi dilakukan setelah pola tercetak pada kertas kromatografi Whatman No.1 yang kemudian segera dipanaskan di atas *hotplate* dengan variasi suhu mulai 100°C , 110°C , 120°C dan 130°C , dengan variasi waktu penetrasi antara 30 detik, 60 detik, 90 detik dan 120 detik untuk masing-masing suhu penetrasi.

Optimasi volume dilakukan pada reagen dan sampel. Optimasi jumlah reagen dilakukan dengan menetasakan masing-masing reagen spesifik yang digunakan pada zona deteksi di mulai dari 0-5 μL dan diamati pada volume yang sesuai. Langkah yang sama juga dilakukan untuk optimasi volume sampel dengan kisaran volume 0-10 μL pada tempat sampel dan dilanjutkan dengan pengamatan ada atau tidaknya kebocoran pada *channel* dengan konsentrasi yang sesuai.

Optimasi reagen yang digunakan pada uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan dua jenis reagen yaitu FeCl_3 dan 1,10-fenantrolin. Optimasi larutan FeCl_3 dengan menggunakan 0,8 μL dengan variasi konsentrasi 0,001M, 0,005M, 0,01M, 0,2M dan 0,3M. Masing-masing konsentrasi FeCl_3 diaplikasikan pada zona deteksi yang berbeda. Kemudian menggunakan larutan 0,2% 1,10-fenantrolin 0,8 μL dan 50 ppm asam galat dengan volume 10 μL . Optimasi larutan 1,10-fenantrolin yaitu menggunakan konsentrasi 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3% dan 0,5%. Masing-masing konsentrasi 1,10-fenantrolin diaplikasikan pada zona deteksi yang berbeda. Kemudian menggunakan 0,1M larutan FeCl_3 dan 50 ppm asam galat dengan volume 10 μL .

Optimasi reagen yang digunakan pada uji total fenolik dengan menggunakan dua jenis reagen yaitu Na_2CO_3 dan Folin-Ciocalteu. Optimasi larutan Na_2CO_3 dengan menggunakan konsentrasi 5 %, 10 % dan 20 %. Masing-masing konsentrasi Na_2CO_3 diaplikasikan pada zona deteksi yang berbeda. Kemudian menggunakan 0,8 μL larutan Folin-Ciocalteu : air 4:1 dan 50 ppm asam galat dengan volume 10 μL . Optimasi dilakukan dengan menggunakan perbandingan volume larutan Folin-Ciocalteu dan air yaitu 1:1, 2:3, 3:2, 7:3, 4:1 dan 1:4. Masing-masing konsentrasi larutan Folin-Ciocalteu diaplikasikan pada zona deteksi yang berbeda. Kemudian pada optimasi larutan Folin-Ciocalteu menggunakan 50 ppm larutan asam galat dan 10 % Na_2CO_3 dengan volume 10 μL .

4.4.3 Preparasi Larutan

4.4.3.1 Pembuatan Larutan Sampel Teh Hijau

Preparasi sampel dilakukan berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan Venditti (2010) dengan sedikit modifikasi. Sampel menggunakan 4 produk teh hijau yang masing-masing ditimbang sebanyak 1 gram. Kemudian diekstrak dengan menggunakan metode maserasi dengan 100 mL air demineralisasi. Suhu yang digunakan yaitu 25°C dan 90°C masing-masing selama 2 jam. Selanjutnya disaring sehingga dapatkan ekstrak dari sampel teh hijau dan hasil ekstrak sampel diberikan kode A , B, C, dan D.

4.4.3.2 Pembuatan Larutan Standar Asam Galat

Konsentrasi standar asam galat yang dibuat dalam penelitian ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Suphasinee (2018) [44] dengan beberapa modifikasi. Larutan Induk asam galat menggunakan pelarut etanol dengan volume 100 mL. Konsentrasi larutan standar asam galat yang digunakan adalah 10 – 200 ppm.

4.4.3.3 Pembuatan Larutan FeCl_3 0,3M

Pembuatan larutan FeCl_3 0,3 M dibuat dengan cara $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a ditimbang sebanyak 5,4 gram dalam gelas kimia 100 mL. Kemudian dilarutkan dengan aquades dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL hingga tanda batas dan homogenkan.

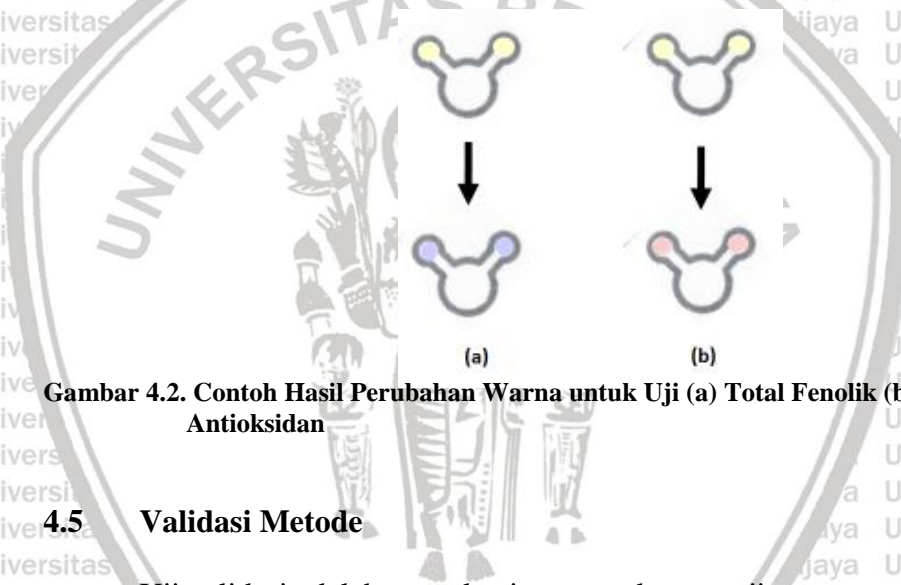
4.4.3.4 Pembuatan Larutan 1.10-fenantrolin 0,5%

Pembuatan larutan fenantrolin dengan ditimbang sebanyak 0,5 gram padatan 1,10-fenantrolin ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$) dimasukkan dalam gelas beker 100 ml dan ditambahkan akuades secukupnya. Dipanaskan hingga padatan larut, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditepatkan hingga tanda terra, dikocok hingga homogen.

4.4.4 Penentuan Aktivitas Antioksidan dan Total Fenolik dengan μPADs

Penentuan aktivitas antioksidan dan total fenolik pada sampel teh hijau dengan menggunakan metode μPADs . Mengacu pada metode yang dilakukan oleh Nuchtavorn dengan beberapa modifikasi terutama pada desain dari perangkat μPADs [16]. Pertama untuk uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini dimulai dengan menggunakan reagen FeCl_3 dan 1,10-fenantrolin 0,8 μL diteteskan pada zona deteksi pada μPADs yang telah terpenetrasi. Uji yang kedua yaitu menentukan kandungan total fenolik sampel dengan menggunakan Na_2CO_3 dan reagen Folin-Ciocalteu dengan volume 0,8 μL diletakkan pada zona deteksi. Kemudian dianginkan agar reagen dapat diserap oleh kertas μPADs . Kemudian 10 μL sampel letakkan pada zona sampel dengan menggunakan mikro pipet. Daya rambat dihitung manual menggunakan *stopwatch*.

Perubahan warna terjadi akibat bertemunya reagen dan asam galat diamati. μ PADs diangin-anginkan untuk mempercepat proses pengeringan. Perubahan warna yang terjadi pada μ PADs kemudian diamati dengan alat *scan* yang dibandingkan dengan warna dari hasil standar melalui intensitas rasio *RGB*. Perubahan warna yang ditunjukkan oleh μ PADs diamati seperti yang dilakukan oleh Choleva [45]. Penentuan nilai *RGB* sampel dan standar yang diperoleh dari hasil *scan* diamati dengan *software Imaje J* untuk menentukan nilai *RGB*-nya. Contoh hasil perubahan warna untuk uji aktivitas antioksidan dan total fenolik pada sampel dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Contoh Hasil Perubahan Warna untuk Uji (a) Total Fenolik (b) Aktivitas Antioksidan

4.5 Validasi Metode

Uji validasi adalah suatu kegiatan untuk menguji suatu metode atau alat uji dapat memberikan hasil yang konsisten dengan tingkat kepercayaan yang tinggi.

Tujuan validasi metode adalah untuk memastikan metode analisis yang dipilih akan memberikan hasil yang reproduibel dan kelayakan sebagai metode analisis.

Validasi metode dapat dilakukan dengan banding antar laboratorium dan uji parameter analisis validasi metode.

Metode pembanding pada penelitian ini menggunakan metode standar spektrofotometri UV Vis [39, 53]. Uji aktivitas antioksidan melalui larutan standar

asam galat dengan rentang konsentrasi 0-200 ppm. Uji aktivitas antioksidan menggunakan reagen 0,1 M FeCl_3 dan 0,3 % 1,10-fenantrolin masing-masing dengan volume 1 mL [39]. Selanjutnya, absorbansi larutan diukur pada gelombang antara 500-600 nm. Uji kandungan total fenolik menggunakan 2 M larutan Folin-Cocalteu dan 1 M Na_2CO_3 masing-masing dengan volume 1 mL [41]. Sebelumnya telah dibuat kurva kalibrasi melalui inkubasi larutan pada temperatur ruang selama 90 menit.. Selanjutnya dilakukan pengujian pada aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode μPADs . Validasi dilakukan dengan membandingkan metode μPADs dengan metode standar spektrofotometri UV Vis. Berdasarkan hasil tersebut dilakukan uji-t untuk membuktikan kedua metode tersebut berbeda nyata atau tidak.

Data yang diperoleh dari hasil pengukuran menggunakan metode μPADs akan dibandingkan dengan metode spektrofotometri untuk mengetahui apakah pengukuran memberikan hasil yang berbeda nyata atau tidak. Selanjutnya, t_{hitung} dibandingkan dengan t_{tabel} dengan kesimpulan jika $t_{\text{hitung}} > t_{\text{tabel}}$, maka kedua hasil dari metode dianggap beda. Jika $t_{\text{hitung}} < t_{\text{tabel}}$, maka kedua metode tidak berbeda secara signifikan dengan tingkat kepercayaan 95%.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

Prinsip pengujian aktivitas antioksidan dan total fenolik pada metode μ PADs adalah perubahan warna reagen yang berada di zona deteksi setelah sampel didispersikan melalui jalur hidrofobik. Pengukuran aktivitas antioksidan dan total fenolik didalam sampel teh hijau dapat dilakukan jika pembuatan μ PADs sebagai alat uji alternatif berada kondisi optimum. Kondisi optimum yang dimaksud antara lain suhu dan waktu penetrasi, jumlah reagen dan sampel. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode μ PADs ditentukan berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan melalui mekanisme reaksi reduksi oksidasi dari ion Fe^{3+} menjadi ion Fe^{2+} [49] dilanjutkan dengan pembentukan senyawa kompleks dengan 1,10-fenantrolin dengan larutan yang berwarna jingga sesuai reaksi pada Gambar 3.1.

Penentuan total fenolik di dalam sampel teh hijau dengan metode μ PADs ditentukan berdasarkan mekanisme reaksi oksidasi dan reduksi. Reagen Folin-Ciocalteu yang terdiri dari campuran heteropolifotungstate-molibdat bereaksi dengan senyawa fenolik yang menghasilkan pembentukan senyawa kompleks berwarna biru. Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu dapat berlangsung dalam kondisi basa yang disesuaikan dengan penggunaan buffer larutan Na_2CO_3 . Ditambahkannya larutan Na_2CO_3 menyebabkan senyawa antioksidan yang diwakili dengan senyawa fenolik mengalami disosiasi untuk membentuk anion fenolat yang mengurangi pereaksi Folin-Ciocalteu yaitu campuran tungstat dan molibdat menghasilkan larutan berwarna biru [50].

Hasil intensitas warna dari masing-masing uji dapat diukur berdasarkan metode kolorimetri melalui pembacaan nilai *RGB* [53]. Nilai *RGB* sampel

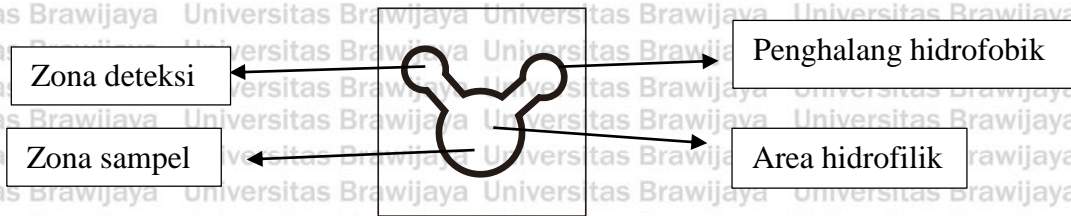
dibandingkan dengan nilai *RGB* standar. Validasi metode dalam penelitian ini adalah membandingkan hasil yang diperoleh dengan metode μ PADs dan hasil yang diperoleh dengan metode spektrofotometri visible untuk masing-masing reagen yang digunakan. Berdasarkan paparan di atas, penelitian ini akan membahas tentang (1) Desain dan hasil pencetakan μ PADs, (2) Optimasi suhu dan waktu penetrasi, (3) Optimasi reagen dan sampel, (4) Hubungan konsentrasi larutan standar dengan intensitas *RGB*, (5) Aplikasi μ PADs pada sampel teh hijau dengan menggunakan metode *RGB* dan (6) Validasi metode.

5.1 Desain dan Hasil Pencetakan μ PADs

μ PADs didesain menggunakan bantuan *software CorelDraw 2018*. Hal ini dikarenakan dengan menggunakan *software CorelDraw 2018* menghasilkan desain μ PADs yang optimal pada geometri *channel* dan diameter zona [57]. Hasil desain μ PADs dapat dilihat pada Gambar 4.1. Hasil desain tersebut merupakan desain yang sederhana dan efisien untuk lintasan sampel untuk sampai pada zona deteksi. Terdapat tiga daerah pada desain yaitu zona sampel, zona deteksi dan *channel*. Dua zona deteksi pada desain bertujuan untuk mendapatkan hasil duplo yang cepat dan tepat.

Desain dicetak dengan menggunakan *wax printer Xerox Colorcube 8580DN-2 tipe T2B047382*. Penggunaan *wax printer* bertujuan untuk mendapatkan penghalang hidrofobik berupa tinta lilin dengan hasil cetak desain yang konsisten.

Penghalang hidrofobik berfungsi untuk menahan arah aliran sampel tetap berada pada pola yang sudah ditentukan [23]. Pencetakan yang dilakukan menghasilkan pola dengan ukuran yang sama sesuai dengan rancangan pola dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1. Hasil Pencetakan μ PADs

Pencetakan desain μ PADs dilakukan pada media kertas. Tingginya konsentrasi lignin pada kertas mempengaruhi pembacaan konsentrasi pada tes

kolorimetri. Pencetakan desain μ PADs diperlukan kertas yang terbuat dari 100% selulosa. Biasanya jenis kertas yang sering digunakan adalah kertas kromatografi

Whatman no. 1 karena diproduksi menggunakan serat berkualitas tinggi dengan kandungan 98% α -selulosa. Kelebihan dari penggunaan kertas kromatografi

Whatman no. 1 yaitu memiliki permukaan kertas yang halus, biaya rendah, keseragaman di kedua sisi, karakter hidrofilik, laju aliran sedang, dan ketebalan 0,18 mm yang memenuhi standar untuk printer yang tersedia secara komersial.

Pembuatan pola μ PADs pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Ellerbe dengan menggunakan kertas kromatografi Whatman No. 1 memberikan hasil terbaik dibandingkan dengan media polyester. Pemilihan jenis kertas sangat penting karena mempengaruhi panjang jalur fluida, sensitivitas pengujian, volume sampel yang dibutuhkan dan kemampuan menyimpan reagen [59].

5.2 Optimasi Suhu dan Waktu Penetrasi μ PADs

Optimasi suhu dan waktu penetrasi bertujuan untuk mengetahui suhu dan waktu yang minimal namun mendapatkan hasil penetrasi pembatas hidrofobik yang sempurna. Berdasarkan penelitian sebelumnya, penggunaan suhu dan waktu penetrasi yang digunakan cukup beragam. Penelitian yang telah dilakukan Chen

(2015) menggunakan suhu penetrasi optimum 90 °C selama 20 detik [55], Alahmad (2018) menggunakan suhu penetrasi optimum 120 °C selama 3 menit [23], Shimada (2018) menggunakan suhu penetrasi optimum 120 °C selama 1,5 menit [56] dan Shingo (2014) menggunakan suhu penetrasi optimum 150°C selama 2 menit [19].

Penentuan suhu dan waktu penetrasi optimum diperlukan untuk membuat $\mu PADS$ yang siap digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolik.

Penetrasi penghalang hidrofobik pada $\mu PADS$ dilakukan dengan meletakkan $\mu PADS$ pada area tengah *hotplate* yang telah dilapisi aluminium foil dengan suhu dan waktu yang telah ditentukan dapat dilihat pada Gambar 5.2.



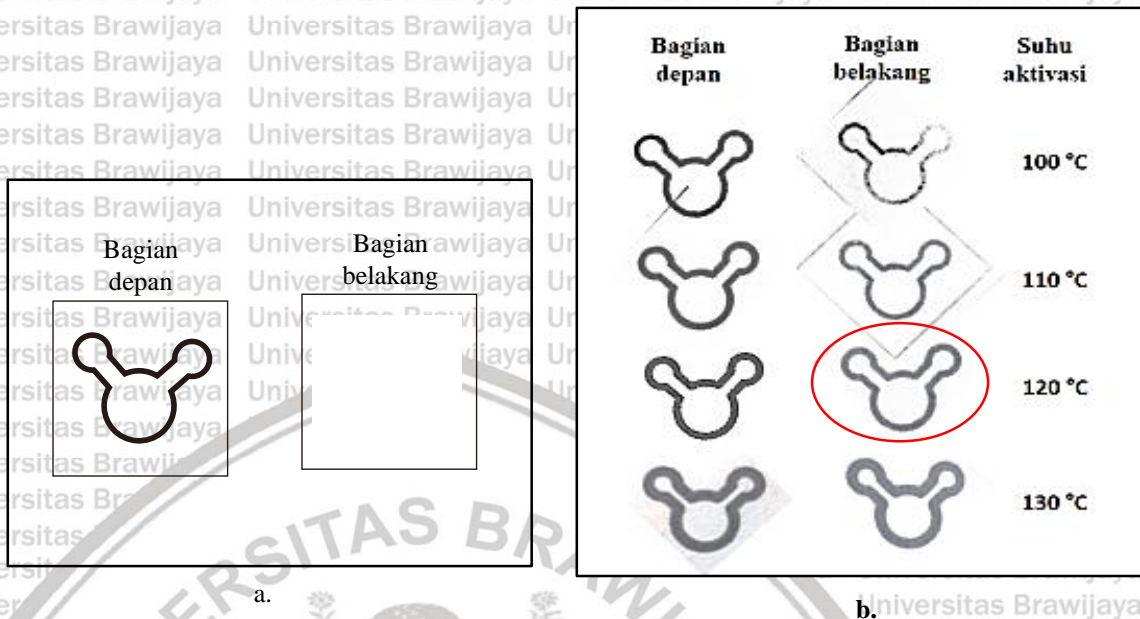
Gambar 5.2 Penetrasi $\mu PADS$ dengan menggunakan *hotplate*

Peletakkan $\mu PADS$ seperti pada Gambar 5.2 bertujuan untuk mendapatkan panas yang merata. Penggunaan aluminium foil bertujuan agar $\mu PADS$ yang akan digunakan tidak terkontaminasi dengan bahan lain pada *hotplate*. Penetrasi dengan menggunakan *hotplate* juga telah dilakukan oleh Jaclyn [57].

5.2.1 Hasil Optimasi Suhu pada saat penetrasi $\mu PADS$

Optimasi suhu pada saat penetrasi $\mu PADS$ dilakukan pada suhu 100°C, 110 °C, 120 °C dan 130 °C selama 90 detik. Kemudian hasil penetrasi diambil gambar

dengan menggunakan *scanner* [24]. Hasil *scan* *μPADs* pada saat sebelum dan sesudah pemanasan dapat dilihat pada Gambar 5.3.



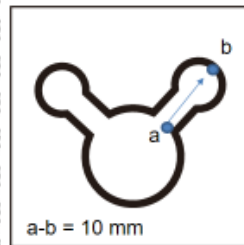
Gambar 5.3 Hasil scan a) sebelum pemanasan b) setelah pemanasan dengan optimasi suhu

Kondisi : a) Pada suhu ruang b) suhu pemanasan 100 - 130^oC pada waktu 90 detik

Berdasarkan Gambar 5.3 (a) menunjukkan hasil *scan* sebelum dilakukan penetrasi bagian pembatas hidrofobik tidak nampak sama sekali pada bagian belakang dan gambar (b) setelah dilakukan penetrasi dan didapatkan penetrasi sempurna terjadi pada suhu 110-130 °C dan penetrasi tidak sempurna pada suhu 100 °C. Hasil penetrasi dinyatakan terjadi secara sempurna ketika penetrasi hidrofobik bagian depan akan menembus kertas ke bagian belakang kertas.

Indikator lain untuk membuktikan hasil penetrasi yang sempurna yaitu *channel* hidrofilik yang terbentuk tidak mengalami perubahan yang signifikan antara sebelum dan setelah terpenetrasi yang bertujuan agar kecepatan fluida tidak terhambat. Hasil penetrasi sempurna pada suhu 110°C, 120°C dan 130°C memiliki perbedaan perubahan lebar *channel* hidrofilik. Perbedaan tersebut disebabkan oleh tinta lilin tepat meleleh pada suhu hal tersebut juga sesuai dengan penelitian yang

telah dilakukan Liu dan akan mempengaruhi kecepatan daya rambat fluida pada *channel* hidrofilik [15]. Sehingga meskipun terjadi penetrasi pada suhu 130°C namun tidak dipilih sebagai suhu optimum pemanasan.



Gambar 5.4. Jarak *Channel* yang diukur dalam Penentuan Kecepatan Rata-rata

Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh perubahan lebar *channel* pada kecepatan daya rambat fluida dapat diketahui dengan mengukur kecepatan rambat fluida. Kecepatan rambat fluida diukur melalui mengukur panjang *channel* hidrofilik seperti Gambar 5.4 dan membagi waktu yang dibutuhkan untuk rambat fluida.

Tabel 5.1 Hasil Optimasi Suhu Penetrasi μ PADs

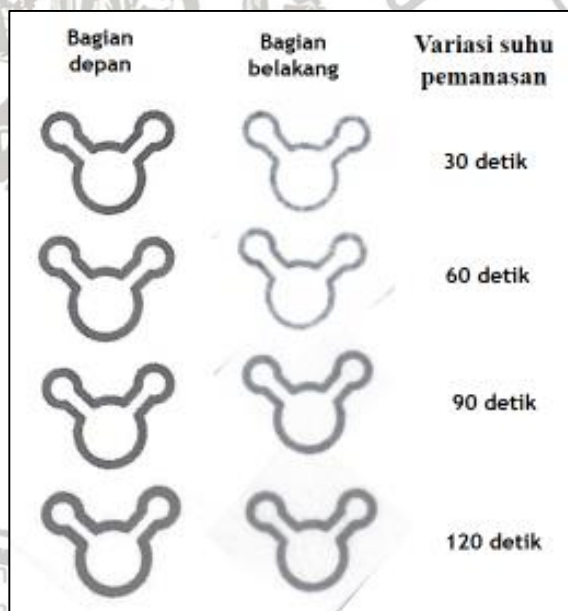
Suhu penetrasi	Hasil aktivasi selama 90 detik	Kecepatan rambat fluida (mm.s ⁻¹)
100°C	Belum terpenetrasi sempurna	-
110°C	Terpenetrasi sempurna	0,08
120°C	Terpenetrasi sempurna	0,13
130°C	Terpenetrasi sempurna	0,07

Seperti yang telah tercantum pada Tabel 5.1 pada suhu penetrasi 100°C tidak memiliki kecepatan rambat fluida karena pada keadaan tersebut belum terjadi penetrasi secara sempurna maka terjadi kebocoran pembatas hidrofobik, sehingga tidak didapatkan kecepatan rambat fluida. Hasil kecepatan rambat fluida yang

paling cepat dimiliki pada suhu 120°C. Maka pada suhu tersebut akan dilakukan optimasi lebih lanjut yaitu optimasi waktu untuk pemanasan μ PADs.

5.2.1 Hasil Optimasi Waktu pada Saat Penetrasi Pembatas Hidrofobik

Optimasi waktu dilakukan berdasarkan hasil optimasi sebelumnya yaitu suhu optimum yang digunakan pada 120°C. Kemudian dilanjutkan dengan variasi waktu penetrasi selama 30, 60, 90 dan 120 detik. Hasil penetrasi dapat dilihat pada Gambar 5.5. Berdasarkan keempat variasi waktu penetrasi yang digunakan hasil setelah pemanasan didapatkan bahwa pada variasi waktu 30 dan 60 detik penetrasi terjadi belum sempurna dibuktikan dengan terjadinya kebocoran pada *channel* dan bagian hidrofobik kurang teraktivasi dengan baik pada bagian belakang hasil *scan*.



Gambar 5.5 Hasil Scan Setelah Pemanasan dengan Optimasi Waktu

Kondisi : Suhu optimum yang digunakan pemanasan pada 120°C dengan variasi waktu selama 30, 60, 90 dan 120 detik.

Hasil optimasi pada variasi waktu 90 dan 120 detik menunjukkan hasil penetrasi hidrofobik yang sempurna karena pada *channel* hidrofobik tidak terjadi kebocoran dan terlihat dari hasil *scan* bagian belakang. Namun diukur kecepatan rambat daya

kapiler yang dilakukan tiga kali ulangan didapatkan rata-rata berturut-turut yaitu 0,14 dan 0,09 mm.s⁻¹.

Hasil tersebut dikarenakan terjadi perubahan lebar *channel* hidrofilik yang signifikan pada aktivasi dengan waktu 120 detik yang menyebabkan hambatan pada daya kapiler fluida. Sehingga dapat disimpulkan bahwa variasi suhu dan waktu penetrasi memiliki perbedaan yang signifikan dengan kecepatan rambat yang tercepat. Ditunjukkan pada suhu 120⁰ dan waktu penetrasi 90 detik dengan kecepatan rambat 0,14 mm .s⁻¹, sehingga pada suhu 120⁰ dan waktu penetrasi 90 detik diambil sebagai keadaan optimum penetrasi pada pola μ PADs yang akan digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan dalam sampel teh hijau.

5.3 Optimasi Reagen dan Sampel

Optimasi reagen dan sampel dilakukan pada volume dan konsentrasinya.

Optimasi volume dan konsentrasi dilakukan agar mendapatkan volume yang minimal dengan konsentrasi yang rendah namun hasil identifikasi warna yang didapat pada zona deteksi dapat teramati dengan baik. Reagen yang ditetaskan pada zona deteksi dan sampel yang ditetaskan pada zona sampel harus ditetaskan pada jumlah yang sesuai karena akan berpengaruh kepada pengamatan hasil yang dilakukan. Terlalu sedikit jumlah sampel akan menyebabkan lamanya waktu pengamatan sedangkan jumlah sampel yang berlebih akan mengakibatkan pengamatan hasil yang tidak akurat. Jumlah reagen yang digunakan adalah jumlah reagen yang ditetaskan pada zona deteksi dan tidak sampai ke zona lainnya, jumlah sampel yang digunakan adalah jumlah sampel yang ditetaskan pada zona sampel dimana sampel akan merambat sampai batas akhir zona deteksi. Pengamatan yang

dilakukan didapatkan hasil optimasi jumlah reagen yang digunakan adalah 0,8 μl dan larutan standar asam galat 50 ppm adalah 10 μl .

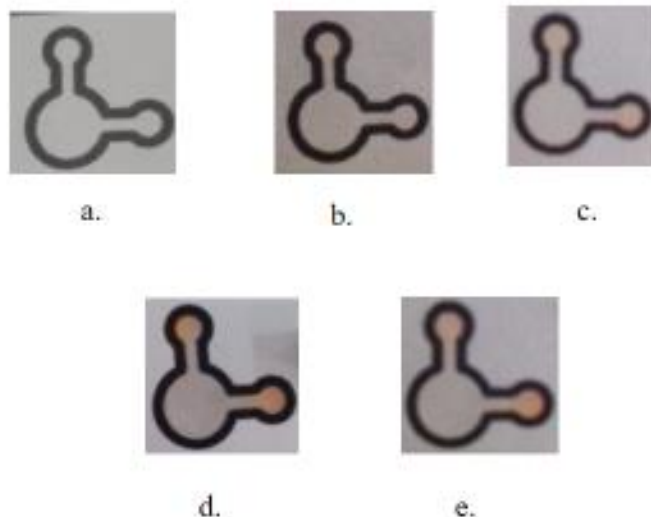
5.3.1 Hasil Optimasi Konsentrasi Larutan FeCl_3

Optimasi dimulai dengan pemilihan pereaksi yaitu dengan menggunakan larutan DPPH (1, 1 – diphenyl-2- picrylhydrazyl), hasil optimasi dapat dilihat pada Lampiran 3. Pada optimasi dengan menggunakan larutan DPPH memiliki hasil yang mudah pudar. Sehingga dilanjutkan dengan optimasi dengan menggunakan pereaksi FRAP yang menggunakan larutan FeCl_3 dan 1,10-fenatrolin. Optimasi konsentrasi larutan FeCl_3 yaitu bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi minimal yang dibutuhkan senyawa fenolik untuk reaksi reduksi dari Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} yang kemudian bereaksi dengan 1,10-fenatrolin membentuk senyawa kompleks berwarna jingga. Hasil warna yang didapatkan spesifik dan tidak pudar untuk identifikasi. Penentuan konsentrasi optimum larutan FeCl_3 dilakukan dengan variasi konsentrasi yaitu 0,001 M, 0,01 M, 0,2 M dan 0,3 M. Pada tahap ini digunakan volume larutan FeCl_3 pada μPADs sebanyak 0,8 μl , 0,1% larutan 1,10-fenatrolin sebanyak 0,8 μl dan 50 ppm larutan asam galat sebanyak 10 μl .

Optimasi konsentrasi dilakukan karena aktivitas antioksidan yang terukur melalui reaksi reduksi antara senyawa antioksidan pada sampel dengan larutan FeCl_3 yang terukur pada sampel akan sebanding dengan jumlah senyawa kompleks yang terbentuk dari larutan 1,10-fenatrolin yang dibuat konsentrasi tetap pada optimasi pada larutan FeCl_3 .

Berdasarkan hasil optimasi larutan FeCl_3 pada Gambar 5.6 dengan variasi konsentrasi yaitu 0,001 M, 0,01 M, 0,2 M dan 0,3 M memberikan warna yang meningkat namun pudar pada konsentrasi 0,3 M. Sehingga pengambilan optimasi

konsentrasi pada larutan FeCl_3 yaitu 0,2 M. Optimasi larutan FeCl_3 pada metode FRAP telah dilakukan pada metode spektrofotometri visibel namun untuk metode μPADs belum pernah dilakukan [39].



Gambar 5.6 Hasil optimasi konsentrasi larutan FeCl_3 yaitu a) blanko, b) 0,001 M, c) 0,01 M, d) 0,2 M dan e) 0,3 M

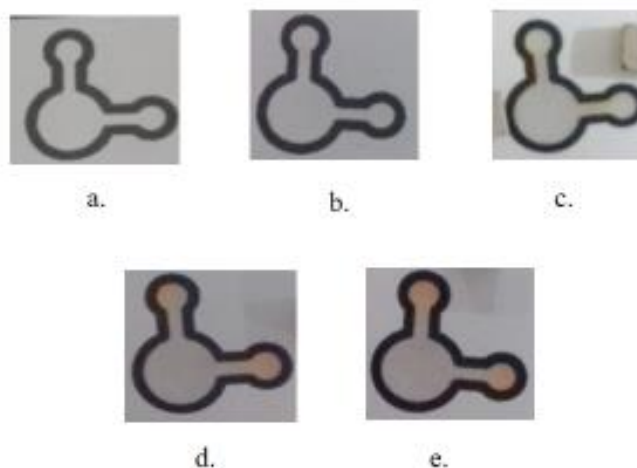
Kondisi : Optimasi pemanasan μPADs yang digunakan pada suhu 120 °C dengan waktu selama 60 detik. Sebanyak 0,8 μl , FeCl_3 dengan konsentrasi 0,001M, 0,01M, 0,2M dan 0,3 M, 0,1% larutan 1,10-fenantrolin sebanyak 0,8 μl dan 50 ppm larutan asam galat sebanyak 10 μl .

5.3.2 Hasil Optimasi Konsentrasi Larutan 1,10-fenantrolin

Optimasi konsentrasi larutan 1,10-fenantrolin yaitu bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi minimal yang dibutuhkan untuk bereaksi secara maksimum oleh ion Fe^{2+} untuk membentuk Fe (II)-fenantrolin. Penentuan komposisi optimum larutan 1,10-fenantrolin dilakukan dengan variasi konsentrasi yaitu 0,01%, 0,05%, 0,1% dan 0,2%, menggunakan kondisi optimum dari percobaan sebelumnya yaitu 50 ppm asam galat dan konsentrasi larutan 0,2 M FeCl_3 . Optimasi konsentrasi larutan 1,10-fenantrolin dilakukan karena

pembentukan senyawa kompleks dari hasil reduksi dari Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} akan

membentuk senyawa kompleks dengan fenantrolin sehingga mampu diketahui aktivitas antioksidan sampel. Hasil optimasi larutan 1,10-fenantrolin dapat dilihat pada Gambar 5.7.



Gambar 5.7 Hasil Optimasi Larutan 1,10-fenantrolin yaitu a. Blanko b. 0,01%, c. 0,05%, d. 0,1% dan e. 0,2%.

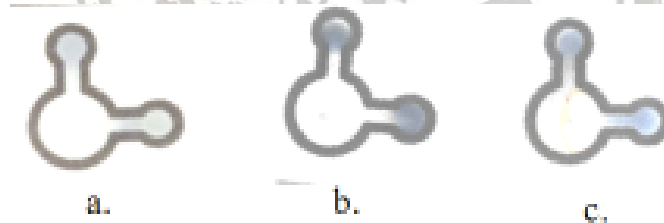
Kondisi : Optimasi pemanasan μ PADs yang digunakan pada suhu 120 °C dengan waktu selama 60 detik. 0,2M larutan FeCl_3 sebanyak 0,8 μl , larutan 1,10 fenantrolin sebanyak 0,8 μl dengan konsentrasi 0,01%, 0,05%, 0,1% dan 0,2% dan 50 ppm larutan asam galat sebanyak 10 μl .

Berdasarkan Gambar 5.7 menunjukkan bahwa larutan 1,10-fenantrolin pada konsentrasi 0,01% dan 0,05% tidak mampu memberikan warna stabil yang dapat digunakan identifikasi. Warna stabil didapatkan pada larutan 1,10-fenantrolin dengan konsentrasi 0,1% dan 0,2%. Maka pemilihan konsentrasi yang optimum digunakan pada konsentrasi 0,1%. Optimasi larutan 1,10-fenantrolin pada metode FRAP telah dilakukan pada metode spektrofotometri visibel namun untuk metode μ PADs belum pernah dilakukan [39].

5.3.3 Hasil Optimasi Konsentrasi Larutan Na_2CO_3

Optimasi konsentrasi larutan Na_2CO_3 yaitu bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi minimal untuk memberikan suasana basa sehingga reaksi redoks antara

senyawa fenolik dengan larutan Folin-Ciocalteu dapat berlangsung dengan sempurna. Hasil warna yang didapatkan pada optimasi larutan Na_2CO_3 yaitu warna yang spesifik dan tidak pudar untuk identifikasi. Penentuan komposisi optimum larutan Na_2CO_3 dilakukan dengan menggunakan komposisi 5%, 10% dan 20% masing- masing larutan digunakan dengan volume 0,8 μl . Pada tahap ini digunakan volume pada μPADs sebanyak 0,8 μl dan asam galat 50 ppm sebanyak 10 μl . Optimasi konsentrasi dilakukan karena kandungan total fenolik yang terukur pada sampel akan sebanding dengan jumlah senyawa kompleks yang terbentuk dari senyawa fenolik dengan larutan Folin-Ciocalteu dengan keadaan basa. Tujuan dengan ditambahkan larutan Na_2CO_3 memberikan kondisi basa sehingga reaksi dapat terjadi dengan sempurna.



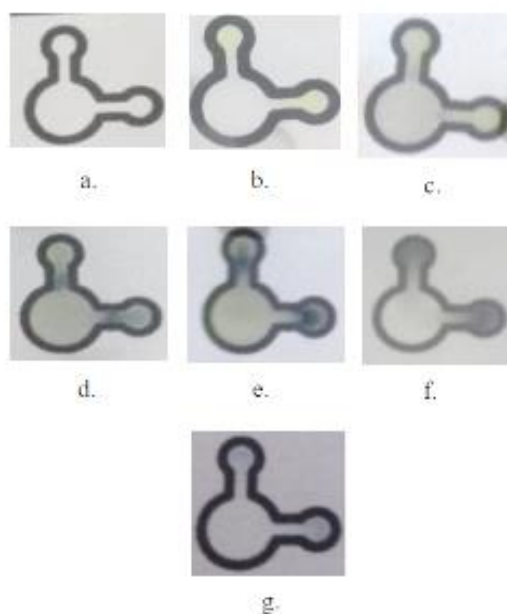
Gambar 5.8 Hasil Optimasi Larutan Na_2CO_3 yaitu a) 5 %, b) 10 %, c) 20 %.

Kondisi : Optimasi pemanasan μPADs yang digunakan pada suhu 120 $^{\circ}\text{C}$ selama 60 detik. 0,8 μl larutan Na_2CO_3 dengan konsentrasi 5 %, 10%, dan 20 % b/v, 0,8 μl larutan Folin- Ciocalteu: air yaitu 4:1 dan 10 μl larutan asam galat 50 ppm

Berdasarkan Gambar 5.8 didapatkan konsentrasi pada larutan Na_2CO_3 dengan konsentrasi 5% memberikan warna ungu yang sangat tipis dan memudar pada konsentrasi 20%. Hasil optimum larutan Na_2CO_3 yaitu pada konsentrasi 10% karena pada konsentrasi tersebut warna yang dihasilkan konsisten dan tidak mudah pudar untuk identifikasi selanjutnya. Hasil optimasi larutan Na_2CO_3 sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Samenooi dengan metode μPADs yaitu pada konsentrasi 10% [58].

5.3.4 Hasil Optimasi Konsentrasi Larutan Folin-Ciocalteu

Optimasi konsentrasi larutan Folin-Ciocalteu yaitu bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi minimal untuk reaksi reduksi dari Mo^{6+} menjadi Mo^{5+} dan mendapatkan hasil warna senyawa kompleks yang spesifik dan tidak pudar untuk identifikasi. Penentuan komposisi optimum larutan Folin-Ciocalteu dilakukan dengan variasi komposisi larutan Folin ciocalteu dan air yaitu 1:1, 2:3, 3:2, 7:3, 4:1 dan 1:4 masing- masing larutan digunakan dengan volume 0,8 μl . Pada tahap ini digunakan volume pada μPADs sebanyak 0,8 μl untuk larutan Na_2CO_3 dan asam galat 50 ppm sebanyak 10 μl . Optimasi konsentrasi dilakukan karena kandungan total fenolik yang terukur pada sampel akan sebanding dengan jumlah senyawa kompleks yang terbentuk dari senyawa fenolik dengan larutan Folin-Ciocalteu.



Gambar 5.9 Hasil Optimasi Komposisi Larutan Folin Ciocalteu : Air dengan Komposisi a) blanko b) 1:1 c) 2:3 d) 3:2 e) 7:3 f) 4:1 dan g) 1:4

Kondisi : Optimasi pemanasan μPADs yang digunakan pada suhu 120 $^{\circ}\text{C}$ dengan waktu selama 60 detik. Sebanyak 0,8 μl larutan Na_2CO_3 dengan konsentrasi 10% b/v, larutan Folin- Ciocalteu: air yaitu 1:1, 2:3, 3:2, 7:3, 4:1 dan 1:4 sebanyak 0,8 μl dan 50 ppm larutan asam galat sebanyak 10 μl .

Berdasarkan Gambar 5.9 didapatkan komposisi optimum larutan Folin-Ciocalteu: air yaitu 4:1 karena hasil warna yang didapatkan adalah yang paling homogen dan warna jelas untuk digunakan identifikasi. Optimasi dilakukan berdasarkan optimasi spektrofotometri visible yang telah dilakukan sebelumnya dengan menggunakan pelarut air maka konsentrasi larutan Folin-Ciocalteu dapat digunakan dalam analisis [51]. Optimasi larutan Folin-Ciocalteu juga sudah pernah dilakukan pada metode $\mu PADS$ dengan konsentrasi 1 M [58]. Namun optimasi metode $\mu PADS$ penelitian ini larutan Folin-Ciocalteu dengan menggunakan konsentrasi 1 reaksi M tidak dapat terjadi maka dilakukan penambahan air dengan perbandingan 4:1.

5.4 Hubungan Konsentrasi Larutan Standar dengan Intensitas *RGB*

Hubungan konsentrasi larutan standar dengan intensitas *RGB* dilakukan untuk mendapatkan nilai *RGB* standar, untuk selanjutnya diaplikasikan pada pengukuran konsentrasi sampel. Pengukuran ini dilakukan sesuai dengan kondisi optimum yang telah diperoleh. Aplikasi larutan standar pada $\mu PADS$ dengan cara reagen spesifik diteteskan pada zona deteksi $\mu PADS$ kemudian ditunggu sesaat agar reagen merata pada zona deteksi. Kemudian teteskan larutan standar asam galat pada zona sampel $\mu PADS$. Larutan standar akan mengalir pada *channel* dan menuju zona deteksi sehingga akan terdapat perubahan warna. Perubahan warna didapatkan setelah kertas diangin-anginkan sesaat hingga kering dan dilanjutkan pengukuran intensitas nilai *RGB*.

Penelitian sebelumnya telah dilakukan dengan membandingkan hasil pengambilan warna deteksi untuk mengukur intensitas nilai *RGB* melalui komparator warna secara visual langsung, ponsel dan *scanner*. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa pengukuran nilai *RGB* melalui *scanner* memberikan batas

deteksi rendah dan reproduktifitas tinggi karena dipengaruhi sumber cahaya yang konsisten [57]. Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka pada penelitian ini cara pengambilan gambar dilakukan melalui *scanner* yang selanjutnya intensitas warna RGB diukur menggunakan aplikasi *image J*.

5.4.1 Hubungan Konsentrasi Larutan Standar dengan Intensitas RGB untuk Uji Aktivitas Antioksidan

Larutan standart asam galat dibuat dengan konsentrasi 10, 30, 50, 70, 90 dan 100 ppm diaplikasikan pada μ PADs untuk mendapatkan nilai RGB standar.

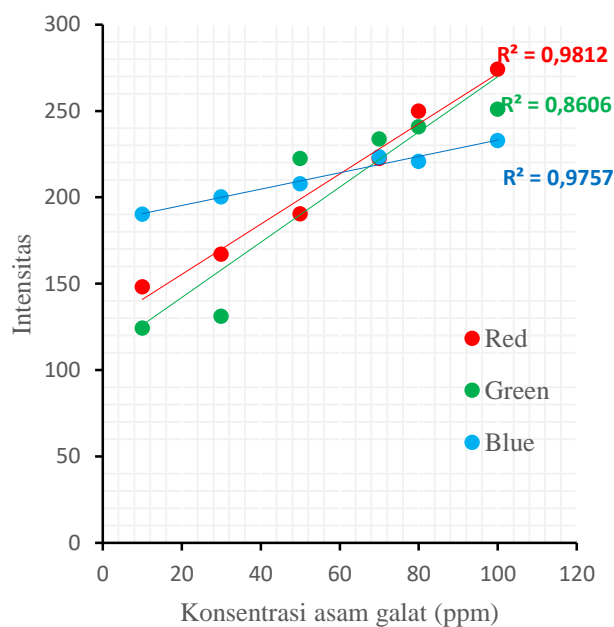
Pengukuran ini diakukan sesuai dengan kondisi optimum yang telah diperoleh.

Aplikasi larutan standart pada μ PADs dengan cara reagen spesifik untuk uji aktivitas antioksidan. Larutan spesifik yang digunakan adalah $FeCl_3$ dan 1,10 fenantrolin dengan jumlah larutan dan konsentrasi optimum yang ditetaskan pada zona deteksi. Larutan standar asam galat dengan volume optimum ditetaskan pada zona sampel. Larutan standar akan mengalir pada *channel* dan menuju zona deteksi sehingga akan terdapat perubahan warna. Perubahan warna yang telah dikeringkan dapat diamati dengan *scanner* dan dilanjutkan pengukuran inetnsitas nilai RGB menggunakan *software image J* dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil Intensitas Nilai RGB Standar untuk Uji Aktivitas Antioksidan

Konsentrasi	Intensitas		
	R	G	B
10 ppm	148,10±1,21	124,21±1,2	190,23±1,77
30 ppm	167,01±1,14	131,12±1,0	200,19±1,0
50 ppm	190,52±0,4	222,52±1,72	207,76±1,17
70 ppm	222,40±1,0	233,88±0,56	223,44±1,44
80 ppm	249,90±0,52	240,92±1,15	220,91±0,9
100 ppm	274,11±1,41	251,11±1,52	232,86±1,7

Berdasarkan pada Tabel 5.2 pengukuran intensitas nilai RGB didapat dari hasil perubahan warna yang konstan dari reagen spesifik dengan larutan standar asam galat pada konsentrasi yang telah dibuat. Warna akhir yang didapat adalah jingga. Warna jingga merupakan perpaduan antara warna merah dengan warna kuning. Hal ini sesuai dengan hubungan nilai intensitas standar warna merah (R) dengan kenaikan konsentrasi larutan standar asam galat yang memiliki nilai R^2 sebesar 0,98, sehingga intensitas warna merah selanjutnya digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan pada sampel. Hubungan nilai RGB dengan konsentrasi asam galat untuk uji aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Gambar 5.10.



Gambar 5.10 Hubungan Nilai RGB dengan Konsentrasi Asam Galat untuk Uji Aktivitas Antioksidan

5.4.2 Hubungan Konsentrasi Larutan Standar dengan Intensitas RGB untuk Uji Kandungan Total Fenolik

Konsentrasi larutan standar asam galat dengan konsentrasi 10, 30, 60, 90, 120 dan 150 ppm diaplikasikan pada μ PADs untuk mendapatkan nilai RGB standar.

Pengukuran ini dilakukan pada kondisi optimum. Aplikasi μ PADs untuk menguji kandungan total fenolik dilakukan dengan menggunakan reagen spesifik yaitu larutan Na_2CO_3 dan Folin-Ciocalteu pada kondisi optimum. Kedua reagen tersebut diteteskan pada zona deteksi, kemudian ditunggu sesaat agar reagen merata pada zona deteksi. Selanjutnya larutan standar asam galat dengan volume optimum diteteskan pada zona sampel sehingga larutan tersebut akan mengalir pada *channel* menuju zona deteksi dan mengalami perubahan warna. Hasil perubahan warna pada μ PADs yang telah dikeringkan dapat diamati dengan *scanner* dan dilanjutkan dengan pengukuran intensitas nilai *RGB* menggunakan *software image J*. Hasil intensitas nilai *RGB* standar untuk uji kandungan total fenolik dapat dilihat pada

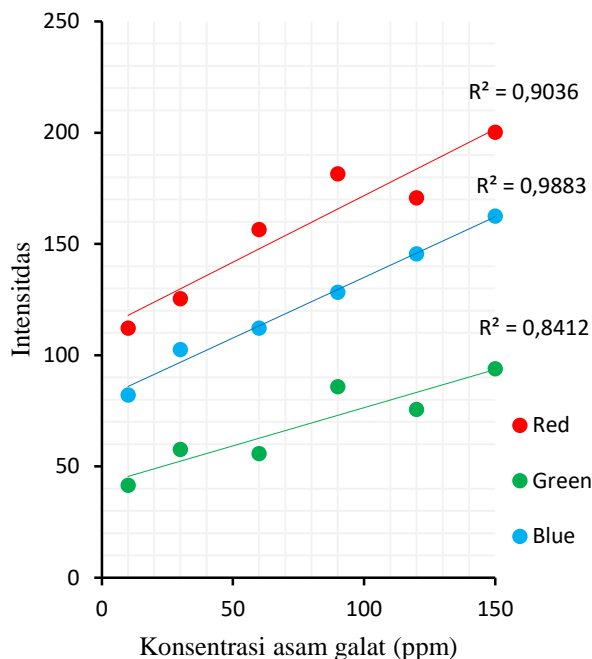
Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil intensitas nilai *RGB* standar untuk uji kandungan total fenolik

Konsentrasi	Intensitas		
	<i>R</i>	<i>G</i>	<i>B</i>
10 ppm	112,11±1,33	41,53±1,0	82,11±0,82
30 ppm	125,42±1,4	57,67±1,33	102,56±1,0
60 ppm	156,44±1,36	55,78±1,36	112,17±1,16
90 ppm	181,52±1,3	85,93±1,24	128,28±1,22
120 ppm	170,74±1,3	75,62±1,3	145,49±1,09
150 ppm	200,22±1,48	93,87±1,41	162,52±1,4

Berdasarkan pada Tabel 5.3 hasil pengukuran intensitas nilai *RGB* didapat dari hasil perubahan warna yang konstan dari reagen spesifik dengan asam galat pada konsentrasi yang telah dibuat. Senyawa kompleks yang terbentuk berwarna biru. Hal ini sesuai dengan hubungan nilai intensitas standar warna biru (*B*) dengan kenaikan konsentrasi larutan standar asam galat yang memiliki nilai R^2 sebesar 0,98, sehingga intensitas warna biru selanjutnya digunakan untuk menguji

kandungan total fenolik pada sampel. Hubungan nilai RGB dengan konsentrasi asam galat untuk uji kandungan total fenolik dapat dilihat pada Gambar 5.11.



Gambar 5.11. Hubungan Nilai RGB standar dengan Konsentrasi Asam Galat untuk Uji Kandungan Total Fenolik

5.5 Aplikasi μ PADs pada sampel teh hijau dengan menggunakan metode RGB

Aplikasi μ PADs pada sampel teh hijau dengan menggunakan metode RGB

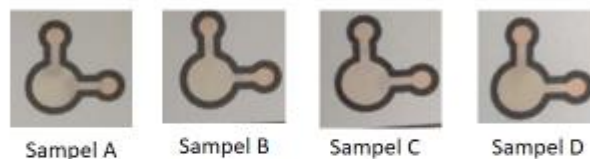
merujuk pada penelitian yang telah dilakukan oleh Suphasince yaitu pengukuran aktivitas antioksidan pada media kapas [44]. Sampel yang digunakan adalah empat produk teh hijau yang sering dikonsumsi dikalangan masyarakat. Preparasi sampel dilakukan berdasarkan pada penelitian Venditti (2010) dengan sedikit modifikasi [60]. Masing-masing sampel ditimbang sebanyak 1 gram. Kemudian diekstrak dengan menggunakan metode maserasi air demineralisasi pada suhu 25°C dan 90°C masing-masing selama 2 jam. Selanjutnya sampel diberikan kode A, B, C, dan D.

Pada penelitian ini peneliti membandingkan hasil aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolik pada sampel yang diberikan perbedaan pada kondisi suhu yang diberikan saat maserasi yaitu pada suhu 25°C dan 90°C sehingga didapatkan hasil yang optimum.

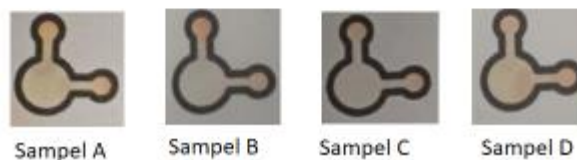
5.5.1 Penentuan aktivitas antioksidan pada sampel teh hijau

Penentuan aktivitas antioksidan pada sampel teh hijau dengan metode μ PADS dilakukan pada kondisi optimum dimana masing-masing sampel produk dimaserasi dengan suhu air 25°C dan 90°C selama 120 menit. Hasil maserasi tersebut selanjutnya diencerkan dan diteteskan menggunakan mikropipet pada daerah sampel. Sampel akan mengalir dari daerah sampel menuju daerah deteksi bertemu dengan reagen pendeteksi yaitu $FeCl_3$ dan 1,10-fenantrolin melalui chanel hidrofilik dan menghasilkan perubahan warna. Perubahan warna selanjutnya akan ditunggu beberapa saat, sehingga hasil intensitas warna dapat diamati melalui scanner dan selanjutnya dapat diukur intensitas nilai RGB dengan menggunakan *software image J*. Hasil aplikasi μ PADS pada sampel teh hijau untuk uji aktivitas antioksidan didapatkan seperti Gambar 5.12.

Sampel maserasi 25°C



Sampel maserasi 90°C



Gambar 5.12 Hasil Scan Aplikasi μ PADS pada Sampel Teh Hijau untuk Uji Aktivitas Antioksidan

Berdasarkan Gambar 5.12 aktivitas antioksidan sampel teh hijau dapat diketahui melalui pengukuran intensitas nilai RGB sampel dengan menggunakan *software image J*. Setelah didapatkan intensitas nilai RGB sampel kemudian membandingkan hasil dari intensitas nilai R sampel yang dapat dilihat pada Tabel

5.4 dengan intensitas nilai *R* standar asam galat yang dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Perhitungan konsentrasi selanjutnya dapat dihitung melalui pengukuran interpolasi sehingga didapatkan aktivitas antioksidan pada sampel yang sebanding dengan konsentrasi senyawa kompleks yang terbentuk. Pengukuran interpolasi dapat dihitung melalui cara berikut :

$$\frac{\text{Konsentrasi A} - X}{\text{Konsentrasi A} - \text{konsentrasi B}} = \frac{\text{Intensitas A} - \text{Intensitas sampel}}{\text{Intensitas A} - \text{Intensitas B}}$$

Keterangan :

Konsentrasi A = batas atas konsentrasi

Konsentrasi B = batas bawah konsentrasi

Intensitas A = batas atas intensitas nilai *RGB*

Intensitas B = batas bawah intensitas nilai *RGB*

X = konsentrasi sampel

Tabel 5.4 Intensitas nilai *R* pada sampel teh hijau

Sampel	Suhu maserasi (°C)	Intensitas <i>R</i>	Konsentrasi sampel (ppm)
A	25	198,98±0,61	53,8±0,4
B		191,42±0,40	50,5±0,3
C		169,05±1,29	31,7±1,0
D		189,05±1,24	48,6±1,0
A	90	228,33±0,60	72,2±0,2
B		229,50±1,50	72,5±0,5
C		193,28±0,72	51,7±0,6
D		228,62±0,70	72,7±0,6

Pada Tabel 5.4 menunjukkan bahwa konsentrasi senyawa kompleks yang diperoleh dari sampel sehingga menggambarkan aktivitas antioksidan pada masing-masing sampel. Hasil uji sampel dengan metode μ PADs tersebut menunjukkan bahwa metode μ PADs dapat digunakan sebagai metode alternatif dalam

menentukan aktivitas antioksidan. Pada pelaksanaan penelitian ini metode μ PADs memiliki keunggulan yaitu proses analisis yang lebih cepat terutama pada saat preparasi sampel terbukti pada penelitian ini dapat dengan mudah mengidentifikasi aktivitas antioksidan dengan cara maserasi sampel. Selain itu juga penggunaan reagen yang lebih hemat sehingga dapat lebih menjaga lingkungan dari cemaran bahan kimia.

5.5.2 Penentuan total fenolik pada sampel teh hijau

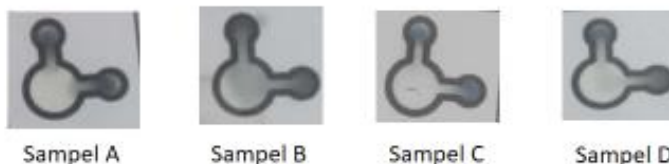
Penentuan total fenolik pada sampel teh hijau dilakukan sesuai kondisi optimum yang telah didapatkan sebelumnya. Selanjutnya dalam penentuan aktivitas antioksidan didalam sampel teh hijau dengan metode μ PADs adalah masing-masing sampel produk dimaserasi dengan suhu air 25°C dan 90°C selama 120 menit. Hasil ekstrak sampel dilakukan pengenceran kemudian dengan menggunakan mikropipet diteteskan pada daerah sampel. Sebelumnya kertas telah diteteskan dengan reagen spesifik yaitu Na_2CO_3 dan Folin-Ciocalteu. Sampel akan mengalir dari daerah sampel menuju daerah deteksi bertemu dengan reagen melalui *channel* hidrofilik dan menghasilkan perubahan warna. Perubahan warna selanjutnya akan ditunggu beberapa saat sehingga hasil intensitas warna dapat diamati melalui scanner dan dilanjutkan dengan *software Image J*. Hasil aplikasi μ PADs pada sampel teh hijau untuk uji kandungan total fenolik pada sampel teh hijau didapatkan seperti Gambar 5.13.

Berdasarkan Gambar 5.13 uji kandungan total fenolik sampel teh hijau dapat diketahui melalui pengukuran intensitas nilai *RGB* sampel dengan menggunakan *software Image J*.

Sampel maserasi 25°C



Sampel maserasi 90°C



Gambar 5.13 Hasil Scan Aplikasi μ PADs pada Sampel Teh Hijau untuk Uji Kandungan Total Fenolik

Setelah didapatkan intensitas nilai *RGB* sampel kemudian membandingkan hasil dari intensitas nilai *B* sampel yang dapat dilihat pada Tabel 5.5. Perhitungan konsentrasi selanjutnya dapat dihitung melalui pengukuran interpolasi sehingga didapatkan aktivitas antioksidan pada sampel yang sebanding dengan konsentrasi senyawa kompleks yang terbentuk.

Tabel 5.5 Intensitas Nilai *B* pada Sampel Teh Hijau

Sampel	Suhu maserasi (°C)	Intensitas <i>B</i>	Konsentrasi sampel (ppm)
A	25	114,20±0,34	62,3±0,6
B		113,71±0,10	63,4±0,3
C		99,52±0,50	31,1±0,5
D		114,30±0,24	63,9±1,2
A	90	129,77±0,33	92,5±0,3
B		133,91±1,10	90,8±1,1
C		118,72±0,95	72,2±0,8
D		131,08±0,82	94,8±0,6

Pada Table 5.5 menunjukkan kandungan total fenolik yang diperoleh pada masing-masing sampel dengan menggunakan metode μ PADs dan metode

spektrofotometri. Berdasarkan table tersebut menunjukkan bahwa metode $\mu PADS$ dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk menentukan kandungan total fenolik. Pada pelaksanaan penelitian ini metode $\mu PADS$ memiliki keunggulan yaitu proses analisis yang lebih cepat terutama pada saat preparasi sampel terbukti pada penelitian ini dapat dengan mudah mengidentifikasi total fenolik dengan cara maserasi sampel. Selain itu juga penggunaan reagen yang lebih hemat sehingga dapat lebih menjaga lingkungan dari cemaran bahan kimia.

5.6 Validasi Metode

Pengujian validasi dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui apakah metode $\mu PADS$ dapat diterima sebagai metode untuk penentuan aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolik pada sampel teh hijau. Pada uji validasi ini metode $\mu PADS$ dibandingkan dengan metode spektrofotometri. Pengujian selanjutnya menggunakan analisis data *t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances* untuk mengetahui apakah kedua metode berbeda atau tidak.

5.6.1 Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode Spektrofotometri

Visibel

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode spektrofotometri melalui pembuatan kurva kalibrasi asam galat dibuat dengan cara mengukur variasi konsentrasi asam galat yaitu 10-100 ppm yang ditambahkan pereaksi *FRAP* (*ferric reducing antioxidant power*) yaitu larutan FeCl_3 dan 1,10-fenantrolin. Pada pembuatan larutan baku asam galat dan pereaksi *FRAP* didapatkan serapan maksimum senyawa kompleks $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$ pada panjang gelombang 515 nm menggunakan spektrofotometer visibel pada rentang panjang gelombang 450-600 nm. Pengukuran sampel selanjutnya dilakukan pada panjang gelombang 515 nm.

Hasil pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel teh hijau dengan menggunakan spektrofotometri dapat dilihat pada Table 5.6.

Tabel 5.6 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Sampel dengan Metode Spektrofotometri Visibel

Sampel	Suhu maserasi	Absorbansi (A)
A	25°C	0,599
B		0,591
C		0,405
D		0,579
A	90°C	0,768
B		0,775
C		0,590
D		0,769

5.6.2 Pengukuran Kandungan Total Fenolik dengan Metode Spektrofotometri Visibel

Pengukuran kandungan total fenolik melalui metode spektrofotometri dimulai dengan pembuatan kurva kalibrasi asam galat dengan cara mengukur variasi konsentrasi asam galat yaitu 10-120 ppm yang ditambahkan pereaksi Folin-Ciocalteu. Pada pembuatan larutan baku asam galat dan pereaksi Folin-Ciocalteu menggunakan spektrofotometer visibel pada rentang panjang gelombang 600-800 nm. Hasil pengukuran kandungan total fenolik pada sampel teh hijau dengan menggunakan spektrofotometer dapat dilihat pada Table 5.7.

Tabel 5.7 Hasil Uji Kandungan Total Fenolik Sampel dengan Metode spektrofotometri Visibel

Sampel	Suhu maserasi	Absorbansi (A)
A	25°C	0,577
B		0,568
C		0,287
D		0,578
A	90°C	0,834
B		0,842
C		0,654
D		0,853

Pada Tabel 5.7 hasil uji didapatkan pada serapan maksimum yaitu panjang gelombang 725 nm maka pengukuran selanjutnya dilakukan pada panjang gelombang tersebut. Hasil perbandingan aktivitas antioksidan dan total fenolik antara metode $\mu PADS$ dan metode spektrofotometri dapat dilihat pada grafik berikut.

Tabel 5.8 Hasil Perbandingan Aktivitas Antioksidan dan Total Fenolik antara Metode $\mu PADS$ dengan Metode Spektrofotometri Visibel

Sampel	Suhu	Aktivitas Antioksidan (ppm)		Total Fenolik (ppm)	
		Metode $\mu PADS$	Metode Spektrofotometri	Metode $\mu PADS$	Metode Spektrofotometri
A	25°C	53,8±0,4	51,2±0,1	62,3±0,6	61,8±0,2
B		50,5±0,3	50,3±0,3	63,4±0,3	60,8±0,1
C		31,7±1,0	29,4±0,2	31,1±0,5	29,6±0,1
D		48,6±1,0	49±0,3	63,9±1,2	62±0,1
A	90°C	72,2±0,2	70,2 ±0,2	92,5±0,3	90,4±0,1
B		72,5±0,5	71±0,3	90,8±1.1	91,2±0,4
C		51,7±0,6	50,2±0,2	72,2±0,8	70,3±0,3
D		72,7±0,6	70,4±0,1	94,8±0,6	92,5±0,2

Berdasarkan Table 5.8 hasil aktivitas antioksidan menunjukkan hasil yang sama seperti penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Vanditi yaitu sampel teh hijau yang diseduh dengan suhu air 90° C dibandingkan pada suhu 25° C memiliki aktivitas antioksidan yang memiliki konsentrasi tinggi. Hasil ini juga menunjukkan bahwa metode $\mu PADS$ mampu mengidentifikasi aktivitas antioksidan sampel yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi dan rendah [60]. Selanjutnya dari Table 5.8 dilanjutkan dengan pengolahan data menggunakan uji-t. Hasil uji-t untuk aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa nilai t_{hitung} lebih kecil dibandingkan dengan t_{tabel} yaitu t_{hitung} sebesar 0,49. Kemudian untuk Hasil uji-t kandungan total fenolik menunjukkan bahwa nilai t_{hitung} lebih kecil dibandingkan dengan t_{tabel} yaitu

hitung sebesar 0,2. Hal ini menunjukkan bahwa metode μ PADs yang digunakan pada uji aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolik pada sampel teh hijau tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan metode spektrofotometri dengan tingkat kepercayaan 95%. Sehingga berdasarkan hasil pengujian tersebut metode μ PADs dapat digunakan sebagai metode alternatif baru dalam aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolik pada sampel yang lebih murah dan cepat.

Berdasarkan hasil analisis aktivitas antioksidan μ PADs sebelumnya yang dilakukan oleh Nuchtavorn (2016) [16]. Penelitian ini memiliki beberapa keunggulan yaitu pembentukan disain hidrofobik pada μ PADs lebih seragam dan tidak terjadi kebocoran, karena pada penelitian sebelumnya menggunakan metode pembuatan desain dengan menggunakan bulpoin sehingga ketika mencetak desain dalam jumlah banyak bagian hidrofobik kurang seragam. Hasil uji dengan Larutan DPPH memiliki hasil warna yang memudar. Nilai linieritas pada penelitian dengan teknik bolpoin memiliki nilai liniertias yang sama pada penelitian ini yaitu 0,98. Nilai LOD pada penelitian sebesar 6,6 ppm dengan menggunakan larutan DPPH belum dicantumkan. Penelitian sebelumnya juga telah dilakukan Piyanan (2018) analisis aktivitas antioksidan μ PADs dengan menambahkan material berupa nanopartikel [25]. Hasil yang didapatkan yaitu memiliki warna yang lebih baik dibandingkan penelitian yang dilakukan Nuchtavorn sebelumnya. LOD pada penelitian ini yaitu 5,0 ppm. Hal ini dikarenakan dengan penambahan nanopartikel sehingga mampu meningkatkan sensitifitas.

BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Hasil optimasi suhu dan waktu $\mu PADS$ saat digunakan penetrasi *channel* hidrofobik yaitu pada suhu 120 °C selama 90 detik. Hasil optimasi kimiawi yang digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan yaitu 0,8 μL larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2M dan 0,8 μL larutan 1,10-Fenantrolin 0,1%. Hasil optimasi larutan Folin- Ciocalteu : air pada yaitu sebanyak 0,8 μL dengan perbandingan 4 : 1 dan hasil optimum larutan Na_2CO_3 yaitu 10 %.
2. Hasil aktivitas antioksidan dan total fenolik pada sampel teh hijau dengan maserasi suhu 25°C dan 90°C dapat langsung diidentifikasi melalui intensitas warna *RGB* hasil *scan* $\mu PADS$ melalui *software image J*. Cara yang didapatkan yaitu hasil aktivitas antioksidan dengan cara interpolasi intensitas *R* pada sampel dan untuk total fenolik melalui interpolasi intensitas *B* pada sampel.
3. Validasi metode $\mu PADS$ dalam analisis aktivitas antioksidan dan total fenolik menunjukkan tidak ada perbedaan nilai yang signifikan. Sehingga metode $\mu PADS$ dapat digunakan sebagai metode alternative.

6.2 Saran

Hasil penelitian ini dapat disarankan :

1. Perlu dilakukan dilanjutkan dengan uji sensitivitas dan dapat menggunakan bahan nanopartikel untuk meningkatkan sensitivitas.
2. Perlu dilakukan sebagai dasar pengembangan metode $\mu PADS$ untuk identifikasi bahan alam.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Hasil Utama Riskesdas 2018.
- [2] K.I. Berker, K Guclü, I Tor dan R Apak. *Comparative evaluation of Fe (III) reducing power based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents*, *Talanta*, vol. 72, hlm. 1157–1165. 2007.
- [3] D.H Kodama, A.E Gonçalves, S.S de, F.M Lajolo dan MI Genovese, *Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations*. *Food Sci Technol*. vol. 30, hlm. 1077–1082. Maret 2010.
- [4] Y Zhang, Q Li, H Xing, X Lu, L Zhao, K Qu dan K Bi. *Evaluation of antioxidant activity of ten compounds in different tea samples by means of an on-line HPLC–DPPH assay*. *Food Res Int*.vol. 53, hlm.847–856. Feb 2013.
- [5] E Shannon, A.K Jaiswal dan N.A Ghannam. *Polyphenolic content and antioxidant capacity of white, green, black, and herbal teas: a kinetic study*. *Food Research*. vol. 2, hlm. 1-11. Jan 2017.
- [6] M Neykov, N Kaloyanov, B Mihailova dan I Goshev. *Antioxidant capacity of 1, 10-phenanthroline, 5-amino-1, 10-phenanthroline and their Pd-complexes*. *J Chem Technol Metall*.vol. 52, hlm. 777–780. Mei 2017
- [7] D.S. Barbosa. *Green Tea Polyphenolic Compounds and Human Health*, *J. Verbr. Lebensm*. hlm, 407 – 413. Feb 2007,
- [8] S.I. Trevisanato dan Y.I. Kim. *Tea and Health*. *Nutrition Reviews; Research Library*. vol. 58, hlm. 1. Jan 2000.
- [9] I.F Benzie dan J.J Strain. *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay*. *Anal Biochem*. vol 239, hlm. 70–76. 1996.
- [10] M Adak dan M.A Gabar. *Green tea as a functional food for better health: A brief review*. *Res J Pharm Biol Chem*, vol 2, hlm. 645–664. 2011.
- [11] G.S Marques, W.F Leão, M.A.M Lyra, M.S Peixoto, R.P.M Monteiro, L.A Rolim, H.S Xavier, P.J.R Neto dan L.A.L Soares. *Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of Bauhinia forficata*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol.23, hlm. 51-57. Jan 2013.
- [12] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, dan G. M. Whitesides, *Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 46, no. 8, hal. 1318–1320, Feb 2007.
- [13] W.H Liang, C.H Chu dan R.J Yang. *Bio-sample detection on paper-based devices with inkjet printer-sprayed reagents*, *J.talanta*. vol 06, hlm.29. 2015.

- [14] T Komatsu, M. Maeki, A Ishida, H Tani dan M. Tokeshi, *Characteristics of Microfluidic Paper-based Analytical Devices Fabricated by Four Different Methods*, *Anal. Sci.*, vol. 34, no. 1, hal. 39–44, 2018.
- [15] C.C Liu, Y.N Wang, L.M Fu dan Y.H Huang. *Microfluidic paper-based chip platform for formaldehyde concentration detection*. *Chemical Engineering Journal* vol 332. 2018.
- [16] N. Nuchtavorn dan M. Macka. *A novel highly flexible, simple, rapid and low-cost fabrication tool for paper-based microfluidic devices (μ PADs) using technical drawing pens and in-house formulated aqueous inks*, *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2016.03.018. 2016.
- [17] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, dan G. M. Whitesides. *Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 46, no. 8, hal. 1318–1320. 2007.
- [18] T. Komatsu, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani, dan M. Tokeshi. *Characteristics of Microfluidic Paper-based Analytical Devices Fabricated by Four Different Methods*. *Anal. Sci.*, vol. 34, hal. 39–44. 2018.
- [19] K. Shingo dan K. Takashi. *Rapid Acid-Base Titrations Using Microfluidic Paper-Based Analytical Devices*. *Anal. Chem.* 2014.
- [20] K. Shingo dan K. Takashi. *Chelate titrations of Ca^{2+} and Mg^{2+} using microfluidic paper-based analytical devices*. *Analytica Chimica Acta*, vol.924, hlm. 60-67. 2016.
- [21] E Carrilho, W A Martinez dan G M. Whitesides. *Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics*. *Anal. Chem.* 2009.
- [22] S. Buking, P. Saetear, W. Tiyapongpatanna, Kuraisin, P. Wilairat, D Nacapricha, N Ratanawimarnwong. *Microfluidic paper-based analytical device (μ PAD) for the Quantification of lead using reaction band-length for identification of bullet hole and its potential for estimating firing distance*. *Anal. Chem.* Vol. 34. Jan 2018.
- [23] W Alahmad, N Tungkijanansin, T Kaneta dan P Varanusupakul, *A colorimetric paper-based analytical device coupled with hollow fiber membrane liquid phase microextraction (HF-LPME) for highly sensitive detection of hexavalent chromium in water samples*. *Talanta*, <https://doi.org/10.1016/j.> 2018.
- [24] C T Lam, J. P. Devadhasan, R. Howse dan J Kim. *A Chemically Patterned Microfluidic Paper-based Analytical Device (C- μ PAD) for Point-of-Care Diagnostics*. *Scientific Reports*, vol. 7, hlm. 1188. DOI:10.1038/s41598-017-01343-w. April 2017.
- [25] T. Piyanan, A athipornchai, S. Henry dan Y Sameenoi, *An Instrument-Free Detection Of Antioxidant Activity Using Paper-Based Analytical Devices Coated With Nanoceria*. *Analytical Sciences*, vol. 34. Jan 2018.

- [26] L Cai, C Xu, S.H Lin, J Luo, M Wu dan F Yang. *A simple paper-based sensor fabricated by selective wet etching of silanized filter paper using a paper mask*. *Biomicrofluidics*. 2014.
- [27] A, W. Martinez, S. T. Phillips Dan G. M. Whitesides, E. Carrilho. *Diagnostics For The Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices*, *Anal. Chem*, vol. 82, hlm. 3–10. 2010,
- [28] D. Vilela, M. C. González, dan A. Escarpa, *Nanoparticles as analytical tools for in-vitro antioxidant-capacity assessment and beyond*, *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 64, hal. 1–16, Jan 2015.
- [29] M. Oroian dan I. Escriche, *Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis*, *Food Res. Int.*, vol. 74, hal. 10–36, Agu 2015.
- [30] D. L. McKay dan J. B. Blumberg, *The Role of Tea in Human Health: An Update*,” *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 21, hal. 1–13, Feb 2002.
- [31] J. A. Macedo, V. Battestin, M. L. Ribeiro, dan G. A. Macedo, *Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols*, *Food Chem.*, vol. 126, no. 2, hal. 491–497, Mei 2011.
- [32] L Wang, Y. Luo, Y. Wu, F. Xia, dan Z. Wu, *Quickly verifying the antioxidant contribution of the individual composition in natural antioxidants by HPLC-free radical scavenging detection*, *LWT*, vol. 96, hal. 461–468, Okt 2018.
- [33] A.P Jadhav, J.A Kareparamban, P.H Nikam dan V.J Kadam. *Spectrophotometric Estimation of Ferulic Acid from Ferula asafoetida by Folin - Ciocalteu's Reagent*. *Der Pharmacia Sinica*, vol.6, hlm.680-684. Maret 2012
- [34] A.V Badarinath, R.A Mallikarjuna, C.M.S Chetty, S Ramkanth, T.V.S Rajan, K Gnanaprakash. *A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations*. (IJPRIF) International Journal of PharmTech Research, vol.2, no.2, hlm. 1276-1285. 2010.
- [35] B.L Dudon, E Blayo, J.R Petit, C Waelbroeck , A Svensson, C Ritz, J.M Barnola, B.M Narcisi dan F Parrenin. *Consistent dating for Antarctic and Greenland ice cores*. *Quaternary Science Reviews*. 2010.
- [36] N.A Ghannam, E Shannon dan A.K.Jaiswal, *Polyphenolic content and antioxidant capacity of white, green, black, and herbal teas: a kinetic study*". *Food Research*, vol. 2, hlm. 1 – 11. Jan 2018
- [37] M. Hajimahmoodi, M. Hanifeh, M. R. Oveisi, N. Sadeghi dan B. Jannat. *Determination of total antioxidant capacity of green teas by the ferric reducing/antioxidant power assay*". *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* Vol. 5, No. 3, hlm. 167-172. 2008,
- [38] Carlsen. *The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide*. *Nutrition Journal*, vol. 9. Mar 2010
- [39] J.R.Francisco, *Spectrophotometric Determination of Iron in Aqueous Solutions as a Complex of 1, 10-Phenanthroline*. Department of Chemical Engineering,

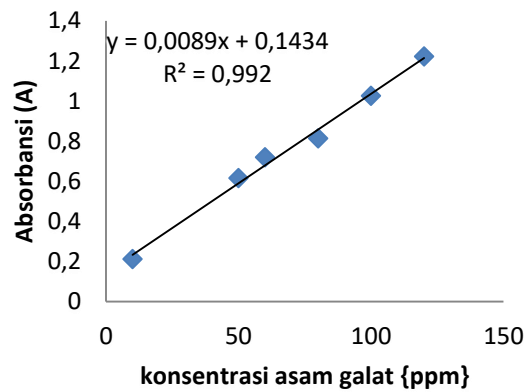
- College of Engineering. University of the Philippines, Diliman, Quezon City, Philippines. 2013.
- [40] H Zakaria, *Preparation and Characterization of Iron 1,10- Phenanthroline Complex Encapsulated in Silica Sol-Gel Derived Thin Films*. Islamic University of Gaza, Palestine. 2013.
- [41] C Henríquez, S Almonacid, I Chiffelle, T Valenzuela, M Araya, L Cabezas, R Simpson dan H Speisky, *Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in chile. Chilean journal of agricultural research*. vol. 70, hlm. 523-536. April 2010,
- [42] A Masek1, E Chrzescijanska, M Latos, M Zaborski, *A Podśedek. Antioxidant and Antiradical Properties of Green Tea Extract Compounds. Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 12, hlm. 6600 – 6610.2017. doi:10.20964/2017.07.06
- [43] S Farooq dan A Sehgal. *Antioxidant Activity of Different Forms of Green Tea: Loose Leaf, Bagged and Matcha. Current Research in Nutrition and Food Science*. Vol. 06, hlm. 35-40. Jan 2018
- [44] S Suphasinee, S Wangkarna, C Saenjuma dan K Grudpan. *A cost-effective assay for antioxidant using simple cotton thread combining paper based device with mobile phone detection*. 2018.
- [45] T G. Choleva, F A. Kappi, D L. Giokas dan A G. Vlessidis. *Paper-based assay of antioxidant activity using analyte-mediated on-paper nucleation of gold nanoparticles as colorimetric probes. Analytica Chimica Acta*. Des 2014.
- [46] Akyazi, Tugce, L B Desmouts dan F BLopez. *Review on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices towards Commercialisation. Analytica Chimica Acta*. 2017
- [47] Bhakta, A Samir, R Borba, M Toba, C D. Garcia dan E Carrilho. *Determination of Nitrite in Saliva Using Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. Analytica Chimica Acta*, vol. 809, hal. 117–122. 2014.
- [48] B. Oktavia, L.W Lim dan T. Takeuchi, *Simultaneous Determination Of Fe(III) And Fe(II) Ions Via Complexation With Salicylic Acid And 1,10-Phenanthroline In Microcolumn Ion Chromatography, Analytical Sciences*. vol. 24, Nov 2008.
- [49] M.M. El Jamal dan H.H. Hammud, *About The Instability Of [Fe(III)(Phen)₃]³⁺, Journal Of The University Of Chemical Technology And Metallurgy*, vol. 43, hlm. 349-356. Mar 2008.
- [50] G.A Agbor, J.A Vinson dan P.E. Donnelly. *Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. Int J Food Sci Nutr Diet*. 3(8), 147-156. 2014.
- [51] Singleton VL, Rossi JA. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic*. vol. 16, hlm.144-158. 1965.
- [52]. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. *Analysis of total phenols and other oxidation substances by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol*. vol. 299 hlm.152-178. 1999.

- [53] M. Abderrahim, S.M. Arribas, L.C. Hoyos. *A novel high-through put image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in foods*. *Talanta*. hlm. 82–89. 2016.
- [54] A.K. Ellerbee, S.T. Phillips, A.C. Siegel, K.A. Mirica, A.W. Martinez, P. Striehl, N. Jain, M. Prentiss dan G.M. Whitesides. *Quantifying Colorimetric Assays in Paper-Based Microfluidic Devices by Measuring the Transmission of Light through Paper*. *Anal. Chem* vol. 81, hlm. 8447–8452. 2009
- [55] C. Chen dan T. Dong. *Microfluidic paper-based analytical devices for colorimetric detection of urinary tract infection biomarkers on adult diapers*. *Member IEEE*. 978-1-4244-9270-1. 2015.
- [56] Y. Shimada dan T. Kaneta. *Highly sensitive paper-based analytical device with the introduction of a large-volume sampel via continuous flow*. *Analytical sciences* vol.34 hlm 65-71. 2018.
- [57] A.A. Jaclyn. *The Development Of Paper-Based Microfluidic Devices For Environmental And Food Quality Analysis*. Colorado State University Fort Collins. Colorado. 2016.
- [58] Y. Sameenoi, P.N. Nongkai, S. Nouanthavong, C.S. Henry dan D. Nacapricha. *One-step polymer screen-printing for microfluidic paper-based analytical device (mPAD) fabrication*. *Analyst* vol. 139, hlm. 6580. 2014.
- [59] L.P. Kelley. *Development of Presumptive and Confirmatory Analytical Methods for the Simultaneous Detection of Multiple Improvised Explosives*. Florida International University, kpete008@fiu.edu. Juli 2014
- [60] E. Venditti, T. Bacchetti, L. Tiano, P. Carloni, L. Greci, E. Damiani. *Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity?*. *Food Chemistry* vol. 119, hlm. 1597–1604. 2010.
- [61] J.C. Jokerst, J.A. Adkins, B. Bisha, M.M. Mentele, L.D. Goodridge dan C.S. Henry. *Development of a Paper-Based Analytical Device for Colorimetric Detection of Select Foodborne Pathogens*. *Anal. Chem.* vol. 84, hlm. 2900–2907. 2012.

LAMPIRAN A

Tabel A.1 Hasil pengukuran serapan asam galat pada panjang gelombang 515 nm

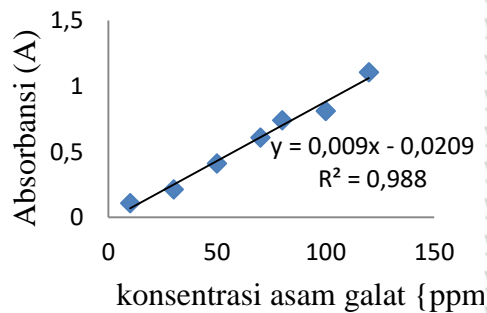
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (A)
10	0,212
50	0,615
60	0,719
80	0,814
100	1,026
120	1,222



Gambar A.1 Kurva baku asam galat untuk uji aktivitas antioksidan

Tabel A.2 Hasil pengukuran serapan asam galat pada panjang gelombang 725 nm

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (A)
10	0,212
50	0,615
60	0,719
80	0,814
100	1,026
120	1,222



Gambar A.2 Kurva baku asam galat untuk uji kandungan total fenolik

LAMPIRAN B

Tabel B.2 t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances (uji aktivitas antioksidan)

	<i>Metode spektrofotometri</i>	<i>Metode μPADs</i>
Mean	55,2125	58,75625
Variance	210,6812	203,2785125
Observations	8	8
Pooled Variance	206,9798813	
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	14	
t Stat	-0,49263	t hitung
P(T<=t) one-tail	0,31495183	
t Critical one-tail	1,76131	t tabel
P(T<=t) two-tail	0,629903659	
t Critical two-tail	2,144786688	

*tingkat kepercayaan 95%, $\alpha = 0,05$

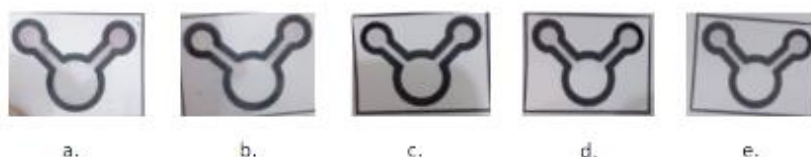
Tabel B.2 t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances (uji kandungan fenolik)

	<i>Metode spektrofotometri</i>	<i>Metode μPADs</i>
Mean	70,69375	72,9
Variance	475,3817	463,7086
Observations	8	8
Pooled Variance	469,5452	
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	14	
t Stat	-0,20363	t hitung
P(T<=t) one-tail	0,420786	
t Critical one-tail	1,76131	t table
P(T<=t) two-tail	0,841571	
t Critical two-tail	2,144787	

*tingkat kepercayaan 95%, $\alpha = 0,05$

LAMPIRAN C

Hasil Optimasi dengan larutan DPPH pada μ PADs



Gambar C.1 (a) blanko, hasil μ PADs setelah penambahan larutan standar asam galat (b) 10 ppm (c) 20 ppm (d) 100 ppm (e) 150 ppm

Kondisi : Gambar (a) blanko menggunakan 20% reagen DPPH, hasil μ PADs setelah penambahan larutan standar asam galat dengan konsnetarsi (b) 10 ppm (c) 20 ppm (d) 100 ppm (e) 150 ppm.

Tabel C.1 Nilai intensitas RGB standar asam galat dengan pereaksi DPPH

Konsentrasi asam galat (ppm)	Inteansitas		
	R	G	B
10	142,913	137,626	142,436
20	141,913	135,676	139,313
100	141,081	136,054	142,726
150	141,886	135,102	142,299

LAMPIRAN D. Sertifikat Bebas Plagiasi



plagiarism-detect
Cutting-edge class tool for plagiarism detection and prevention

19 0696 T

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
PASCASARJANA

SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI
Nomor: 1159/UN10.F40/PN/2019

Sertifikat ini diberikan kepada:

Nama : Na'ilah Fauziyah
NIM : 176090200111013
Program Studi : Program Magister Kimia
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas : Universitas Brawijaya

Dengan Judul Tesis
Pengembangan Metode Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (µPAD) Untuk Uji Aktivitas Antioksidan dan Total Fenolik pada Teh Hijau

Telah dideteksi tingkat plagiasinya secara online pada tanggal **27 Mei 2019** dan dinyatakan **bebas plagiasi** dengan kriteria toleransi $\leq 5\%$.

Malang, 28 Mei 2019
Ketua Badan Penerbitan Jurnal

Direktur
Prof. Dr. Marjono, M.Phil
NIP. 196211161988031004

Indah Yanti, S.Si., M.Si.
NIP. 19791129 200501 2 002



