

Analisis Komparatif Kadar MDA Menggunakan Spektrofotometer Konvensional dan Nano Spektrofotometer Pada Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis*)

Martini Hidayanti^{1*}, Kayla Faza Gustafri Mandalika¹ and Mega Safithri²

¹ Departemen Biokimia, IPB University; kaylafazagustafri@apps.ipb.ac.id

² Divisi Bioanalisis, Departemen Biokimia, IPB University; safithri@apps.ipb.ac.id

* Correspondence: martinihu@apps.ipb.ac.id

Abstract: Oxidative stress generates malondialdehyde (MDA) as a major lipid peroxidation product, commonly used as a biomarker of oxidative damage. This study aimed to compare MDA quantification in green tea (*Camellia sinensis*) extract using conventional spectrophotometry (cuvette) and nano spectrophotometry (96-well microplate). The extract, obtained by 70% ethanol maceration, yielded an average recovery of 36.14%. MDA determination employed the thiobarbituric acid (TBA) method, with a maximum absorbance at 532 nm for both instruments. Results indicated that absolute MDA levels significantly differed, with lower absorbance and concentrations measured by the nano spectrophotometer. However, inhibition percentage and IC₅₀ values were not significantly different (cuvette IC₅₀: 83.997 ppm; nano spectrophotometer IC₅₀: 83.065 ppm; $p > 0.05$), confirming consistency in assessing relative antioxidant activity. In terms of efficiency, the nano spectrophotometer required smaller sample and reagent volumes (100 μ L and 200 μ L), reduced chemical waste, and decreased analysis costs by up to 71% compared to the cuvette method. Moreover, it enabled higher throughput with up to 96 samples per batch in shorter time. In conclusion, nano spectrophotometry provides valid and more efficient results, making it a reliable alternative for MDA analysis in laboratories with limited resources.

Keywords: antioxidant; conventional spectrophotometer; green tea; malondialdehyde; nano spectrophotometer

Citation: Hidayanti M, Mandalika KFG, Safithri M. 2025. Analisis komparatif kadar MDA menggunakan spektrofotometer konvensional dan nano spektrofotometer pada ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*). *Current Biochemistry*. 12(2): 34-43.

Received: September 11, 2025

Revised: September 11, 2025

Accepted: December 31, 2025

Published: December 31, 2025



Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

pISSN: 2355-7877

eISSN: 2355-7931

Abstrak: Stres oksidatif menghasilkan malondialdehida (MDA) sebagai produk peroksidasi lipid yang sering digunakan sebagai biomarker kerusakan oksidatif. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pengukuran kadar MDA pada ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*) menggunakan spektrofotometer konvensional (kuvet) dan nano spektrofotometer (mikroplat 96 sumur). Ekstrak diperoleh melalui maserasi etanol 70% dengan rendemen rata-rata 36,14%. Penentuan MDA dilakukan dengan metode asam tiobarbiturat (TBA), dengan panjang gelombang maksimum 532 nm pada kedua instrumen. Hasil menunjukkan bahwa kadar MDA absolut berbeda signifikan antara kedua instrumen, di mana nilai absorbansi dan konsentrasi MDA pada nano spektrofotometer lebih rendah. Namun, analisis persen inhibisi dan IC₅₀ tidak menunjukkan perbedaan signifikan (IC₅₀ kuvet 83,997 ppm; nano spektrofotometer 83,065 ppm; $p > 0,05$), menandakan konsistensi dalam menilai aktivitas antioksidan relatif. Dari aspek efisiensi, nano spektrofotometer memerlukan volume sampel dan reagen lebih kecil (100 μ L dan 200 μ L), mengurangi limbah kimia, serta menurunkan biaya analisis hingga 71% dibandingkan kuvet. Selain itu, kapasitas analisis meningkat hingga 96 sampel per batch dengan waktu lebih singkat. Kesimpulannya, nano spektrofotometer memberikan hasil komparatif yang valid dan lebih efisien, sehingga layak direkomendasikan untuk analisis MDA di laboratorium dengan keterbatasan sumber daya.

Kata kunci: antioksidan; malondialdehida; nano spektrofotometer; spektrofotometer konvensional; teh hijau

1. Pendahuluan

Stres oksidatif merupakan suatu kondisi biologis yang ditandai oleh ketidakseimbangan antara produksi spesies oksigen reaktif (ROS) dan kapasitas sistem pertahanan antioksidan endogen. lipid yang paling terpengaruh pada gangguan stres oksidatif adalah golongan asam lemak tidak jenuh dengan banyak ikatan rangkap karbon-karbon. Ketika terdapat oksidan, maka terjadi pembentukan lipid yang tidak stabil karena adanya ekstraksi hidrogen oleh oksidan dan penyisipan oksigen yang kemudian mengarah pada pembentukan radikal peroksil lipid (LOO-) (Ayala *et al.*, 2014; Cordiano *et al.*, 2023). Radikal peroksil lipid selanjutnya dapat mengalami proses siklisasi dan pembelahan, menghasilkan pembentukan produk sekunder, dimana senyawa utama yang berasal dari peroksidasi lipid adalah MDA. MDA secara luas digunakan sebagai biomarker kuantitatif untuk menilai tingkat kerusakan oksidatif lipid dalam sistem biologis maupun pada ekstrak bahan alam, karena sifatnya yang relatif stabil serta mudah dideteksi secara spektrofotometri (Leon dan Borges 2022; Tsikas 2017).

Penentuan kadar MDA secara umum dilakukan melalui metode *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS). Dalam metode ini, MDA bereaksi dengan asam tiobarbiturat (TBA) membentuk kompleks kromofor MDA-TBA₂ berwarna merah muda yang menunjukkan puncak serapan pada panjang gelombang sekitar 532 nm. Metode TBARS telah lama digunakan karena prosedurnya sederhana, biaya relatif rendah, serta dapat diaplikasikan pada berbagai jenis sampel biologis. Akan tetapi, metode ini juga memiliki keterbatasan, terutama terkait dengan spesifisitas, karena beberapa senyawa hasil oksidasi lipid lain maupun molekul interferen dapat berikatan dengan TBA dan menghasilkan sinyal absorbansi yang serupa, sehingga berpotensi menyebabkan bias estimasi kadar MDA (Grotto *et al.* 2009; Niki 2008).

Teh hijau (*Camellia sinensis*) merupakan salah satu sumber utama senyawa bioaktif alami dengan aktivitas antioksidan tinggi, terutama katekin seperti epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin, dan epigallocatechin. Senyawa tersebut berperan sebagai scavenger radikal bebas serta mendukung sistem pertahanan antioksidan seluler. Senyawa-senyawa ini berperan dalam menetralkan radikal bebas dan mencegah terjadinya peroksidasi lipid, suatu proses yang menghasilkan malondialdehid (MDA) sebagai produk akhir. Oleh karena itu, pengukuran kadar MDA pada ekstrak teh hijau dapat digunakan sebagai indikator efektivitas aktivitas antioksidan yang dimilikinya (Arsana *et al.*, 2019; Luo *et al.* 2024; Mukty 2023).

Dalam praktik laboratorium, spektrofotometer konvensional berbasis kuvet (dengan lintasan optik 1 cm) masih merupakan instrumen standar untuk pengukuran absorbansi kompleks MDA-TBA₂. Instrumen ini terbukti mampu menghasilkan data yang akurat dan stabil, serta telah digunakan secara luas sebagai metode rujukan dalam analisis biokimia. Namun demikian, metode ini membutuhkan volume sampel dan reagen yang relatif besar, yang pada gilirannya dapat meningkatkan biaya operasional dan membatasi efisiensi kerja, khususnya ketika jumlah sampel yang dianalisis cukup banyak. Keterbatasan tersebut mendorong pengembangan teknologi analisis alternatif dengan throughput lebih tinggi dan efisiensi penggunaan sampel yang lebih baik (Hodges *et al.* 1999).

Seiring perkembangan teknologi, spektrofotometer modern berbasis mikropelat atau nano spektrofotometer (microplate reader) telah banyak digunakan dalam penelitian biokimia. Instrumen ini memungkinkan analisis sampel dalam volume yang sangat kecil (mikroliter), dengan waktu pembacaan cepat, sensitivitas tinggi, serta kemampuan untuk melakukan pengukuran simultan pada banyak sumur (well) dalam satu kali siklus. Adaptasi metode TBARS ke dalam format mikropelat terbukti mampu mempertahankan linearitas pengukuran, menurunkan variasi antar ulangan, serta meningkatkan efisiensi waktu dan biaya. Oleh sebab itu, nano spektrofotometer dipandang sebagai alternatif yang menjanjikan untuk menggantikan atau melengkapi metode spektrofotometri konvensional dalam analisis biomarker stres oksidatif (Espin *et al.* 2017; Devasagayam *et al.* 2003).

Namun demikian, perbedaan teknis antara spektrofotometer konvensional dan nano spektrofotometer—seperti lintasan optik, desain wadah sampel (kuvet versus mikropelat), serta karakteristik detektor—dapat memengaruhi akurasi, presisi, sensitivitas, dan batas deteksi hasil pengukuran. Oleh karena itu, diperlukan evaluasi komparatif yang sistematis untuk menilai keandalan kedua metode tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis komparatif pengukuran kadar MDA pada ekstrak teh hijau menggunakan spektrofotometer konvensional dan nano spektrofotometer, sehingga dapat diperoleh informasi yang komprehensif mengenai efisiensi, akurasi, serta implikasi praktis dari masing-masing metode dalam konteks penelitian biokimia.

2. Metode Penelitian

2.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, botol gelap (ukuran 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 30 mL, dan 60 mL), blender (Philips), oven (memmert), neraca analitik (KENKO, Jepang), ayakan 60 mesh, kertas saring, corong, pompa vakum, sonikator (Decon F5 Major, Decon Laboratories, US), shaker orbital (Eyela Multis MMS), spektrofotometer kuvet (PG Instrumen T60), nano spektrofotometer (SPECTROstarNano BMG LAB-TECH), rotary evaporator (LabTech Ltd.), pH meter (Adwa), waterbath (memmert) sentrifus (Hettic Universal), Kulkas (LG), aluminium foil, mikropelat 96-sumur (Eppendorf), mikropipet (Nexty-S), mikrotip 10–100 μ L, 100–1000 μ L (Genfollower).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel teh hijau yang diperoleh dari kebun teh Gunung Mas, Puncak, Kabupaten Bogor, etanol pro-analisis (Merck), etanol teknis, 1,1,3,3-Tetra Metoksi Propana ((TMP), Sigma), Asam linoleat (Sigma), Asam asetat glasial, asam tiobarbiturat (TBA), asam trikloro asetat (TCA), KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 (Merck).

2.2. Pembuatan Ekstrak Simplisia (Indarti 2022 dengan modifikasi)

Daun teh hijau dikeringkan pada suhu ruang atau oven bersuhu rendah (maksimal 50°C). Daun dikeringkan kemudian digerus hingga menjadi serbuk halus. Ekstrak simplisia daun teh dilakukan dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, dimana perbandingan antara simplisia dan pelarut adalah 1:10 (b/v). Kemudian sampel diekstraksi menggunakan shaker selama 24 jam pada suhu ruang. Hasil ekstraksi disaring untuk memisahkan residu dan filtrat. Residu kering dilarutkan kembali dalam etanol selama 24 jam dan dilakukan berulang kali hingga dilakukan total 5×24 jam maserasi. Selanjutnya semua filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, selanjutnya dioven pada suhu yang sama hingga semua pelarut menguap dan diperoleh ekstrak teh hijau kering.

2.3. Pembuatan Larutan Standar TMP (1,1,3,3-Tetra Metoksi Propana)

Sebanyak 16.7 μ L TMP 6 M dipipet ke dalam labu takar 10 mL dan diencerkan dengan etanol hingga volume mencapai 10 mL. Larutan dihomogenkan dan disimpan dalam botol gelap. Konsentrasi akhir larutan adalah 0,01 M (10 mM), yang selanjutnya diencerkan menjadi 100 μ M dan kemudian dibuat deret konsentrasi 5, 8, 10, 13, 15, 18, dan 20 μ M.

2.4. Pembuatan Larutan Ekstrak Teh Hijau

Sebanyak 0.01 gram ekstrak teh hijau dilarutkan secara bertahap dengan etanol 70%, dihomogenkan, dan ditara hingga 10 mL dalam labu takar. Larutan kembali dihomogenkan dan disimpan dalam botol berlabel "Ekstrak Teh Hijau Etanol 70% Konsentrasi 1000 ppm". Selanjutnya diencerkan menjadi 50, 75, dan 100 ppm.

2.5. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

2.5.1. Menggunakan Spektrofotometer Konvensional (Kuvet)

Larutan standar TMP 10 μ M dipipet 1 mL, ditambahkan 2 mL TCA 20% dan 2 mL TBA 1% dalam asam asetat 50%. Campuran diinkubasi pada 100°C selama 10 menit, kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang 520–550 nm. Blanko menggunakan etanol 70% diperlakukan sama dengan TMP.

2.5.2. Menggunakan Nano Spektrofotometer

Sebanyak 0,1 mL larutan standar TMP 10 μ M dimasukkan ke mikrotube, ditambahkan 0,2 mL TCA 20% dan 0,2 mL TBA 1% dalam asam asetat 50%. Campuran diinkubasi pada 100°C selama 10 menit, didinginkan, disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit, lalu 200 μ L larutan diambil untuk dibaca pada mikropelat 96 sumur dengan panjang gelombang 500–600 nm. Blanko menggunakan etanol 70% diperlakukan sama dengan TMP.

2.6. Aktivitas Antioksidan dengan Metode TBA (Kikuzaki dan Nakatani 1993)

2.6.1. Penentuan Kurva Standar Larutan 1,1,3,3-Tetra Metoksi Propana (TMP) Menggunakan Spektrofotometer Konvensional (Kuvet)

Kurva standar dibuat menggunakan larutan TMP dengan konsentrasi 5, 8, 10, 13, 15, 18, 20 μ M. Masing-masing dipipet 1 mL, ditambahkan 2 mL larutan TCA 20% dan 2 mL larutan TBA 1% dalam asam asetat 50%, inkubasi pada penangas air 100°C selama 10 menit. Setelah dingin larutan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum. Blanko menggunakan 1 mL etanol dengan perlakuan yang sama.

2.6.2. Penentuan Waktu Inkubasi Asam Linoleat dengan Metode TBA menggunakan Kuvet

Campuran terdiri dari 6 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7, 6 mL asam linoleat 50 mM dalam etanol 99,8%, dan 3 mL air bebas ion. Sebanyak 1 mL campuran dimasukkan ke botol gelap, diinkubasi pada 40°C. Setiap hari, 1 mL larutan diambil, ditambahkan 2 mL TCA 20% dan 2 mL TBA 1% dalam asam asetat 50%, diinkubasi pada 100°C selama 10 menit, lalu disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum. Blanko disiapkan dari campuran etanol dan buffer fosfat, dengan perlakuan yang sama.

2.6.3. Analisis konsentrasi malondialdehid (MDA) dengan metode TBA menggunakan Kuvet

Ekstrak teh hijau diuji dalam konsentrasi 50, 75, dan 100 ppm. Masing-masing 1 mL ekstrak dicampur dengan 2 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7 dan 2 mL asam linoleat 50 mM dalam etanol 99,8%. Semua larutan diinkubasi pada 40°C selama waktu optimum. Setelah itu, 1 mL larutan diambil, ditambahkan 2 mL TCA 20% dan 2 mL TBA 1% dalam asam asetat 50%, diinkubasi pada 100°C selama 10 menit, dinginkan lalu disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum. Konsentrasi MDA dihitung berdasarkan persamaan regresi linier kurva standar TMP. Blanko disiapkan dari campuran etanol dan buffer fosfat, dengan perlakuan yang sama. Selanjutnya persen inhibisi dapat ditentukan dengan rumus berikut :

$$\text{Persen Inhibisi} = \frac{[\text{MDA}]_{\text{kontrol negatif}} - [\text{MDA}]_{\text{sampel}}}{[\text{MDA}]_{\text{kontrol negatif}}} \times 100\%$$

2.6.4. Penentuan Kurva Standar Larutan 1,1,3,3-Tetra Metoksi Propana (TMP) Menggunakan Nano Spektrofotometer (Mikroplat 96 Sumur)

Kurva standar dibuat menggunakan larutan TMP dengan konsentrasi 5, 8, 10, 13, 15, 18, 20 μ M. Masing-masing dipipet 0,1 mL, ke dalam mikrotube 1,5 mL, ditambahkan 0,2 mL larutan TCA 20% dan 0,2 mL larutan TBA 1% dalam asam asetat 50%, inkubasi pada penangas air 100°C selama 10 menit. Setelah dingin larutan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum dengan memipet masing-masing larutan sebanyak 0,2 mL ke dalam mikroplate 96 sumur. Blanko menggunakan 0,1 mL etanol dengan perlakuan yang sama.

2.6.5. Penentuan waktu inkubasi asam linoleat dengan Metode TBA menggunakan Mikroplat 96 Sumur

Campuran terdiri dari 0,6 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7, 0,6 mL asam linoleat 50 mM dalam etanol 99,8%, dan 0,3 mL air bebas ion. Sebanyak 0,1 mL campuran dimasukkan ke botol gelap, diinkubasi pada 40°C. Setiap hari, 0,1 mL larutan diambil, ditambahkan 0,2 mL TCA 20% dan 0,2 mL TBA 1% dalam asam asetat 50%, diinkubasi pada 100°C selama 10 menit, setelah dingin lalu disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum dengan memipet masing-masing larutan sebanyak 0,2 mL ke dalam mikroplate 96 sumur. Blanko disiapkan dari campuran etanol dan buffer fosfat, dengan perlakuan yang sama.

2.6.6. Analisis konsentrasi malondialdehid (MDA) dengan metode TBA menggunakan Mikroplat 96 Sumur

Ekstrak teh hijau diuji dalam konsentrasi 50, 75, dan 100 ppm. Masing-masing 0,1 mL ekstrak dicampur dengan 0,2 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7 dan 0,2 mL asam linoleat 50 mM dalam etanol 99,8%. Semua larutan diinkubasi pada 40°C selama waktu optimum. Setelah itu, 0,1 mL larutan diambil, ditambahkan 0,2 mL TCA 20% dan 0,2 mL TBA 1% dalam asam asetat 50%, diinkubasi pada 100°C selama 10 menit, dinginkan lalu disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum dengan memipet masing-masing larutan sebanyak 0,2 mL ke dalam mikroplat 96 sumur. Konsentrasi MDA dihitung berdasarkan persamaan regresi linier kurva standar TMP. Blanko disiapkan dari campuran etanol dan buffer fosfat, dengan perlakuan yang sama. Selanjutnya persen inhibisi dapat ditentukan dengan rumus berikut :

$$\text{Persen Inhibisi} = \frac{[\text{MDA}]_{\text{kontrol negatif}} - [\text{MDA}]_{\text{sampel}}}{[\text{MDA}]_{\text{kontrol negatif}}} \times 100\%$$

2.7. Analisis Data

Analisis data menggunakan Ms Excel. Data yang diperoleh merupakan data primer yang didapatkan dari absorbansi larutan pembanding TMP dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan regresi linear. Kadar MDA dihitung menggunakan persamaan yang diperoleh dari kurva kalibrasi dan hasilnya dinyatakan dalam satuan mikro molar. Data yang diperoleh dinyatakan sebagai rata-rata $\pm$ SD. Pengukuran kadar MDA dengan dua instrumen yang berbeda dibandingkan dengan uji t berpasangan menggunakan program SPSS 25. Evaluasi efisiensi dilakukan berdasarkan kebutuhan bahan dan estimasi biaya penggunaan alat.

3. Hasil

3.1. Rendemen Ekstrak Teh Hijau

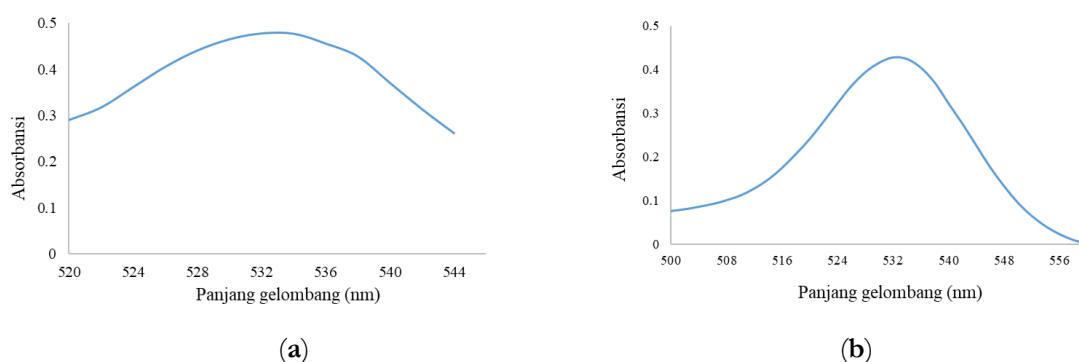
Hasil ekstraksi simplisia teh hijau yang dilakukan dengan metode maserasi bergoyang menggunakan pelarut etanol 70% menunjukkan persentase rendemen yang konsisten pada dua kali ulangan, seperti yang dapat diamati pada Tabel 1, dengan rata-rata nilai rendemen sebesar 36,143%. Berdasarkan data pada Tabel 1, hasil ekstraksi teh hijau menunjukkan nilai rendemen yang baik, dimana nilainya kurang dari 50%.

Tabel 1. Hasil persentase rendemen ekstrak teh hijau.

Ulangan	Bobot simplisia teh hijau (gr)	Bobot ekstrak teh hijau (gr)	Rendemen (%)	Rata-rata rendemen (%)	SD
1	10	3,241	35,482	36.143	0.935
2	10	3,363	36,803		

3.2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

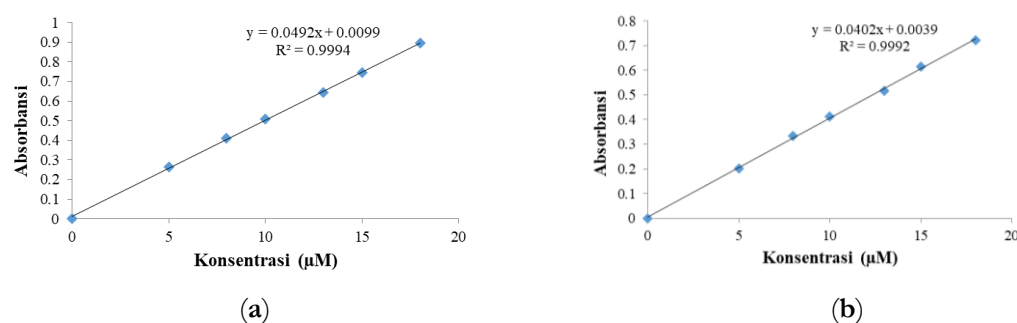
Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan terhadap larutan standar TMP untuk menentukan pada panjang gelombang yang absorbansinya mencapai nilai tertinggi. Pengukuran ini dilakukan dengan menghubungkan antara panjang gelombang dan absorbansi pada rentang panjang gelombang yang diukur adalah antara 520-550 nm pada spektrofotometer konvensional serta 500-600 nm pada nano spektrofotometer. Hasil menunjukkan bahwa absorbansi maksimum tercapai pada panjang gelombang 532 nm, baik pada spektrofotometer konvensional maupun nano spektrofotometer, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1a dan 1b.



Gambar 1. Kurva panjang gelombang maksimum TMP: (a) Spektrofotometer konvensional; (b) Nano spektrofotometer.

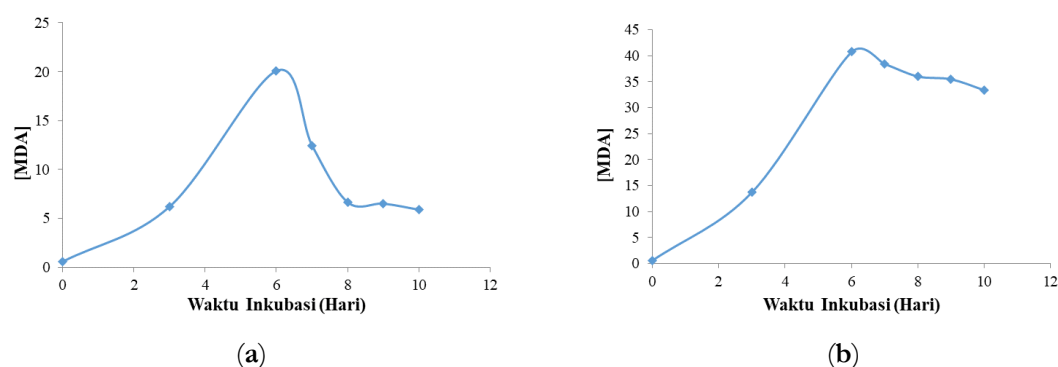
3.3. Kurva Standar TMP

Kurva standar TMP hasil pengukuran dengan spektrofotometer konvensional dan nano spektrofotometer ditampilkan pada Gambar 2 (a dan b). Pembuatan kurva standar TMP dilakukan dengan enam konsentrasi berbeda, dari 5 hingga 18 ppm. Pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang maksimum 532 nm. Kurva standar TMP digunakan sebagai kuantifikasi untuk mengukur kadar MDA dengan menggunakan persamaan regresi linier ($y = ax + b$). Koefisien korelasi (R^2) pada kurva dari kedua instrumen spektrofotometer memiliki nilai lebih dari 0,99. Nilai R^2 lebih dari 0,99 menunjukkan adanya korelasi positif antara konsentrasi dengan nilai serapan, yang berarti semakin tinggi konsentrasi TMP maka semakin tinggi pula nilai serapannya (absorbansi).



Gambar 2. Kurva standar TMP. (a) Spektrofotometer konvensional, (b) nano spektrofotometer.

Gambar 3a dan 3b menunjukkan hasil penentuan waktu inkubasi asam linoleat yang diamati dari hari ke-0 hingga hari ke-10. Penentuan waktu inkubasi asam linoleat didasarkan pada pengukuran kadar MDA, dimana hasilnya menunjukkan terjadi kenaikan kadar MDA pada hari ke-6 dan mulai mengalami penurunan pada hari ke-7 hingga hari ke-10 (Gambar 3a dan 3b). Berdasarkan data tersebut, didapatkan waktu inkubasi optimum asam linoleat pada hari ke-6, baik pada spektrofotometer maupun nano spektrofotometer (Gambar 3a dan 3b).



Gambar 3. Kurva waktu inkubasi asam linoleat: (a) Spektrofotometer konvensional; (b) Nano spektrofotometer.

3.4. Aktivitas Antioksidan dengan Metode TBA

Analisis kadar MDA pada ekstrak teh hijau dilakukan pada 3 konsentrasi berbeda (50, 75, dan 100 ppm) dan diinkubasi pada waktu optimum 6 hari. Pengukuran kadar MDA menggunakan spektrofotometer dan nano spektrofotometer menunjukkan hasil yang berbeda, pengukuran absorbansi MDA dengan nanospektrofotometer lebih rendah dibandingkan spektrofotometer, sehingga kadar MDA-nya pun terhitung lebih rendah (Tabel 2). Namun, dapat diamati juga bahwa [MDA] kontrol negatif pada spektrofotometer konvensional memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan nano spektrofotometer (Tabel 2). Data selisih penurunan [MDA] sampel 100 ppm hasil pengukuran dengan spektrofotometer konvensional dan nano spektrofotometer kemudian dianalisis dengan uji-t sampel independen dan didapatkan nilai- p (2-tailed) = 0,000 ($p < 0,05$). Berdasarkan nilai- p tersebut dapat disimpulkan bahwa [MDA] sampel hasil pengukuran dua instrumen tersebut berbeda signifikan.

Tabel 2. Hasil pengukuran kadar MDA serta persen inhibisi dan nilai IC₅₀ ekstrak teh hijau.

Metode	Konsentrasi (ppm)	[MDA] Sampel	[MDA] Kontrol Negatif	[MDA] Kontrol Negatif – [MDA] Sampel	% Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
Spektrofotometer	50	1,784	2,898	1,114	38,453	83,977
	75	1,567	2,898	1,331	45,933	
	100	1,272	2,898	1,626	56,101	
Nanospektrofotometer	50	0,857	1,329	0,473	35,558	83,065
	75	0,699	1,329	0,630	47,411	
	100	0,575	1,329	0,755	56,769	

Hasil pengukuran kadar MDA pada ekstrak teh hijau selanjutnya dianalisis dengan parameter persen inhibisi dan nilai IC₅₀ seperti yang ditampilkan pada Tabel 2. Tingkat inhibisi menunjukkan kapasitas sampel teh hijau dalam menurunkan konsentrasi MDA hasil peroksidasi lipid. Tingkat inhibisi hasil pengukuran dengan spektrofotometer konvensional dan nano spektrofotometer menunjukkan nilai yang saling mendekati pada masing-masing konsentrasi berbeda. Data inhibisi sampel 100 ppm selanjutnya juga dianalisis dengan uji-t sampel independen. Tingkat inhibisi sampel hasil pengukuran dengan spektrofotometer konvensional dan nano spektrofotometer memiliki nilai- p (2-tailed) = 0,636 ($p > 0,05$) yang memiliki arti bahwa tingkat inhibisi sampel hasil pengukuran dua instrumen tersebut tidak berbeda signifikan. Oleh karena itu, nilai IC₅₀ yang didapatkan pun tidak berbeda secara signifikan antara hasil pengukuran spektrofotometer konvensional dengan nano spektrofotometer, dengan nilai IC₅₀ masing-masing 83,977 ppm dan 83,065 ppm (Tabel 2).

Berdasarkan Tabel 3, terlihat bahwa penggunaan nano spektrofotometer dengan format mikropate 96 sumur jauh lebih efisien dibandingkan spektrofotometer kuvet. Volume reagen yang dibutuhkan per sampel hanya 200 μ L, sedangkan kuvet memerlukan 2 mL, sehingga terjadi penghematan hingga 10 kali lipat. Begitu juga dengan volume sampel, nano spektrofotometer hanya memerlukan 100 μ L dibandingkan 1 mL pada kuvet.

Tabel 3. Perbandingan efisiensi penggunaan bahan kimia, biaya bahan kimia dan waktu pengukuran.

Parameter	Spektrofotometer kuvet	Nano spektrofotometer
Volume reagen per sampel	2 mL	200 μ L
Volume sampel per uji	1 mL	100 μ L
Jumlah sampel per batch	6 sampel	96 sampel
Estimasi biaya bahan kimia*	Rp. 1.057.000,-	Rp. 307.000,-
Waktu pengukuran	5–15 menit/6 sampel	1-3 menit/96 sampel

* Keterangan: estimasi biaya dihitung berdasarkan kebutuhan reagen utama (Asam linoleat, etanol, TBA, asam asetat glasial, TCA, asetat, dan bahan habis pakai (kuvet vs mikropate).

4. Pembahasan

Nilai rendemen ekstrak teh hijau yang diperoleh sebesar 36,143% menunjukkan rendemen yang baik karena nilainya kurang dari 50%. Nilai ini mencerminkan tingginya kandungan metabolit sekunder teh yang berhasil diekstraksi sekaligus berkurangnya pelarut melalui proses penguapan dengan rotary evaporator (Evitasari & Susanti, 2021; Wijaya *et al.*, 2018). Pengujian kadar MDA dengan TBA merupakan salah satu pengujian tertua yang paling banyak digunakan untuk mengukur stres oksidatif dalam sampel biologis (De Leon dan Borges 2022). Pada tahap penentuan panjang gelombang maksimum, diperoleh hasil konsisten pada 532 nm baik menggunakan spektrofotometer konvensional maupun nano spektrofotometer. Hasil ini sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa konjugat MDA-TBA menyerap maksimum pada panjang gelombang 532 nm dan menghasilkan warna merah muda, sehingga panjang gelombang ini digunakan sebagai dasar pengukuran konsentrasi MDA secara spektrofotometrik (De Leon & Borges, 2022; Senthilkumar *et al.*, 2021; Weitner *et al.*, 2016).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar malondialdehida (MDA) pada ekstrak teh hijau berbeda signifikan apabila dianalisis menggunakan spektrofotometer konvensional dibandingkan dengan nano spektrofotometer. Nilai absorbansi yang diperoleh dari nano spektrofotometer lebih rendah dibandingkan spektrofotometer kuvet, sehingga konsentrasi MDA yang dihitung juga lebih kecil (Tabel 2). Perbedaan ini terutama disebabkan oleh variasi lintasan optik (path length), volume sampel, serta sensitivitas detektor. Spektrofotometer kuvet dengan lintasan optik 1 cm menghasilkan kondisi pengukuran yang berbeda dibandingkan mikropelat 96 sumur dengan volume sampel lebih kecil, sehingga berimplikasi pada variasi nilai serapan meskipun menggunakan metode reaksi TBA yang sama (Ayala *et al.* 2014; Tsikas 2017).

Meskipun terdapat perbedaan nilai absolut, analisis persen inhibisi menunjukkan hasil yang konsisten antara kedua instrumen. Pada konsentrasi ekstrak 100 ppm, persen inhibisi hasil pengukuran dengan spektrofotometer konvensional (56,101%) tidak berbeda signifikan dengan nano spektrofotometer (56,769%) ($p = 0,636$). Nilai IC_{50} yang diperoleh juga hampir identik, yaitu 83,997 ppm pada spektrofotometer kuvet dan 83,065 ppm pada nano spektrofotometer. Sementara itu, nilai IC_{50} merupakan besaran konsentrasi sampel yang dapat meredam 50% kadar MDA, dimana semakin rendah nilai IC_{50} sampel menunjukkan kapasitas sampel yang semakin kuat dalam meredam pembentukan MDA. Konsistensi ini menunjukkan bahwa meskipun baseline kadar MDA berbeda, kapasitas antioksidan ekstrak teh hijau dalam menekan pembentukan MDA relatif sama diukur dengan kedua instrumen. Dengan demikian, nano spektrofotometer tetap dapat digunakan secara valid untuk membandingkan potensi antioksidan antar sampel, khususnya ketika fokus analisis adalah pada aktivitas relatif, bukan nilai absolut (Grotto *et al.* 2009; Nourooz-Zadeh 1999; Sánchez-Díez *et al.*, 2025).

Perbedaan hasil pengukuran pada spektrofotometer konvensional dan nano spektrofotometer dipengaruhi oleh beberapa faktor. Perbedaan botol sampel yang digunakan dapat menjadi salah satu penyebab hasil yang berbeda, dimana botol sampel yang digunakan untuk kedua instrumen spektrofotometer memiliki ruang volume yang berbeda. Ruang volume yang berbeda dapat menyebabkan perbedaan pada jumlah oksigen selama waktu inkubasi. Oksigen berlebih dapat mempercepat reaksi oksidasi lipid, sehingga meningkatkan kadar MDA dan memengaruhi hasil pengukuran (Ghani *et al.*, 2017; Zeb & Ullah, 2016). Selain itu, pada penggunaan mikropelat, keberadaan gelembung perlu diantisipasi karena dapat meningkatkan nilai absorbansi dan variasi antarulangan (De Leon & Borges, 2022). Ketika kondisi pengujian MDA-TBA ini distandardisasi, masih tidak ada jaminan bahwa pengujian akan cukup kuat untuk memberikan hasil yang sebanding pada instrumen berbeda di berbagai laboratorium (Ghani *et al.*, 2017).

Pengukuran pada nano spektrofotometer dengan mikropelat 96 sumur, perlu diperhatikan untuk menghilangkan gelembung sebelum mengukur absorbansi. Keberadaan gelembung dapat menghasilkan nilai absorbansi yang tinggi dan perbedaan antar ulangan (De Leon dan Borges 2022). Pengujian kadar MDA dengan metode TBA ini bukan merupakan uji yang spesifik secara molekuler, dimana banyak molekul organik lain, yang reaktif secara kimia dan berasal dari biomolekul teroksidasi selain lipid, dapat bereaksi dengan TBA sehingga mengganggu pengukuran MDA. Reaksi selain dari biomolekul teoksidasi lipid dengan TBA kemudian dapat terbaca pada hasil uji TBA-MDA dan dapat menyebabkan hasil pengukuran yang berbeda pada kedua instrumen spektrofotometer (De Leon dan Borges 2022; Ghani *et*

al., 2017; Tsikas 2017). Oleh karena itu, validasi tambahan menggunakan metode yang lebih spesifik seperti HPLC tetap diperlukan untuk analisis yang menuntut akurasi tinggi.

Meskipun terdapat perbedaan signifikan pada kadar MDA, nilai persen inhibisi dan IC_{50} antara kedua instrumen tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun baseline kadar MDA berbeda, kemampuan ekstrak teh hijau dalam menekan pembentukan MDA relatif konsisten diukur dengan kedua instrumen. Hasil ini memperkuat bahwa nano spektrofotometer tetap dapat digunakan secara valid untuk membandingkan potensi antioksidan antar sampel, terutama ketika fokus penelitian adalah aktivitas relatif, bukan nilai MDA.

Dari aspek efisiensi, nano spektrofotometer terbukti lebih unggul. Volume reagen dan sampel yang dibutuhkan masing-masing hanya 200 μ L dan 100 μ L, jauh lebih rendah dibandingkan 2 mL dan 1 mL pada kuvet. Selain efisiensi bahan kimia, penggunaan nano spektrofotometer juga berdampak positif pada jumlah limbah yang dihasilkan. Karena volume reagen dan sampel yang digunakan jauh lebih sedikit (hanya 1/10 dibandingkan kuvet), maka limbah cair hasil analisis pun otomatis lebih sedikit.

Hal ini tidak hanya menurunkan biaya pengelolaan limbah kimia, tetapi juga lebih ramah lingkungan dan mendukung prinsip *green laboratory*. Dengan berkurangnya penggunaan bahan kimia berbahaya seperti TBA, TCA, dan asam asetat glasial, risiko paparan bagi pengguna juga dapat diminimalkan. Dari sisi kapasitas analisis, nano spektrofotometer mampu mengukur hingga 96 sampel dalam satu batch, sedangkan kuvet terbatas hanya 6 sampel. Hal ini menjadikan nano spektrofotometer memiliki kapasitas analisis yang jauh lebih tinggi, sehingga sangat cocok untuk analisis dengan jumlah sampel besar. Efisiensi penggunaan reagen dan sampel tersebut juga berdampak langsung pada biaya analisis. Estimasi biaya bahan kimia menggunakan kuvet mencapai Rp 1.057.000, sedangkan dengan nano spektrofotometer hanya sekitar Rp 307.000. Dengan demikian, penggunaan nano spektrofotometer dapat menurunkan biaya analisis hampir tiga kali lipat atau hingga 71%. Selain itu, dari aspek waktu, spektrofotometer kuvet membutuhkan 5–15 menit untuk 6 sampel, sementara nano spektrofotometer hanya memerlukan 1–3 menit untuk 96 sampel. Ini menunjukkan adanya efisiensi waktu yang sangat signifikan, yang tidak hanya mempercepat proses analisis tetapi juga meningkatkan produktivitas kerja di laboratorium. Temuan ini sejalan dengan literatur yang menegaskan bahwa teknologi berbasis mikroplat meningkatkan *throughput*, mengurangi biaya operasional, serta menurunkan risiko paparan bahan kimia berbahaya bagi pengguna (Hodges et al., 1999; Botsoglou et al., 1994). Selain itu, keunggulan efisiensi penggunaan bahan kimia pada nano spektrofotometer berimplikasi positif dalam mengurangi dampak lingkungan akibat limbah laboratorium. Oleh karena itu, nano spektrofotometer dapat direkomendasikan sebagai alternatif optimal untuk pengukuran MDA dalam penelitian berbasis bahan alam, dengan catatan bahwa prosedur standardisasi dan validasi tetap harus diperhatikan.

Namun demikian, penelitian ini juga menegaskan perlunya standardisasi dan validasi metode nano spektrofotometer. Faktor-faktor teknis seperti homogenitas distribusi sampel pada mikroplat, keberadaan gelembung, serta sensitivitas optik perlu dikontrol untuk memastikan konsistensi hasil. Selain itu, metode TBA yang digunakan masih memiliki keterbatasan spesifisitas, karena senyawa selain MDA juga dapat bereaksi dengan TBA. Dengan demikian, hasil penelitian ini tidak hanya memberikan informasi komparatif antara dua instrumen, tetapi juga menekankan pentingnya menyesuaikan pilihan instrumen dengan kebutuhan analisis apakah berfokus pada akurasi absolut atau efisiensi analisis. Bagi laboratorium pendidikan, nano spektrofotometer merupakan pilihan yang tepat untuk mendukung pembelajaran berbasis praktikum dengan keterbatasan biaya dan bahan.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa meskipun spektrofotometer konvensional dan nano spektrofotometer menghasilkan perbedaan pada nilai absolut kadar MDA, kedua metode memberikan hasil yang sebanding dalam mengukur aktivitas antioksidan relatif, ditunjukkan oleh kesamaan nilai IC_{50} dan persen inhibisi. Dengan efisiensi biaya, waktu, dan bahan kimia yang signifikan, nano spektrofotometer lebih unggul untuk analisis berskala besar, pendidikan laboratorium, serta penelitian dengan keterbatasan sumber daya.

Daftar Pustaka

1. Arsana, P. M., Sasiarini, L., & Nugraha, B. E. (2019). The effect of green tea extract supplementation on plasma malondialdehyde (MDA) in human with sub-maximal physical activity, double-blind and placebo-controlled trials. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*, 6(1).

2. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438.
3. Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatellis, A. G. (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(9), 1931–1937.
4. Cordiano, R., Di Gioacchino, M., Mangifesta, R., Panzera, C., Gangemi, S., & Minciullo, P. L. (2023). Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: An update. *Molecules*, 28(16), 5979. <https://doi.org/10.3390/molecules28165979>
5. De Leon, J. A. D., & Borges, C. R. (2022). Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Journal of Visualized Experiments*, 159, 1–22.
6. Devasagayam, T. P. A., Boloor, K. K., & Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 40(5), 300–308.
7. Espín, S., Virosta, P. B., Fernández, A. J. C., & Eeva, T. (2017). A microplate adaptation of the thiobarbituric acid reactive substances assay to determine lipid peroxidation fluorometrically in small sample volumes. *Revista de Toxicología*, 34(2).
8. Evitasari, D., & Susanti, E. (2021). Kadar polifenol total teh hijau (*Camellia sinensis*) hasil maserasi dengan perbandingan pelarut etanol–air. *PHARMADEMICA: Jurnal Kefarmasian dan Gizi*, 1(1), 16–23. <https://doi.org/10.54445/pharmademica.v1i1.5>
9. Ghani, M. A., Barril, C., Bedgood, D. R., Jr., & Prenzler, P. D. (2017). Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry*, 230, 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.127>
10. Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., et al. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Química Nova*, 32(1), 169–174.
11. Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604–611.
12. Mukty, M. I. (2023). Pengaruh pemberian seduhan teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap kadar glukosa darah dan malondialdehyde (MDA). *Vitamin: Jurnal Ilmu Kesehatan Umum*, 1(4), 150–158.
13. Niki, E. (2008). Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors*, 34(2), 171–180.
14. Nourooz-Zadeh, J. (1999). Key issues in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(10), 489–505.
15. Sánchez-Díez, M., Romero-Jiménez, P., Alegria-Aravena, N., Gavira-O'Neill, C. E., Vicente García, E., Quiroz-Troncoso, J., González-Martos, R., Ramírez-Castillejo, C., & Pastor, J. M. (2025). Assessment of cell viability in drug therapy: IC₅₀ and other new time-independent indices for evaluating chemotherapy efficacy. *Pharmaceutics*, 17(2), 247. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17020247>
16. Senthilkumar, M., Amaresan, N., & Sankaranarayanan, A. (2021). Estimation of malondialdehyde (MDA) by thiobarbituric acid (TBA) assay. In *Plant-microbe interactions* (pp. 1–7). Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY.
17. Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13–30.
18. Weitner, T., Inić, S., Jablan, J., Gabričević, M., & Domijan, A.-M. (2016). Spectrophotometric determination of malondialdehyde in urine suitable for epidemiological studies. *Croatica Chemica Acta*, 89(1), 133–139. <https://doi.org/10.5562/cca2902>
19. Wijaya, H., Novitasari, & Jubaidah, S. (2018). Perbandingan metode ekstraksi terhadap rendemen ekstrak daun rambai laut (*Sonneratia caseolaris* L. Engl). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 4(1), 79–83.
20. Zeb, A., & Ullah, F. (2016). A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances in fried fast foods. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, 9412767. <https://doi.org/10.1155/2016/9412767>