

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA BEBERAPA JENIS MADU MONOFLORAL SPESIES LEBAH APIS MELLIFERA DENGAN METODE DPPH DAN FRAP

Siti Nur Aini¹, FX Haryanto Susanto², Sabrina Handayani T³, Sunday Alexander T. Noya⁴
Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Ma Chung, Malang
611710071@student.machung.ac.id

Abstrak

Senyawa antioksidan dipercaya dapat menghambat terjadinya proses oksidasi dengan mekanisme menghambat proses inisiasi atau propagasi reaksi oksidasi berantai, bahan alam seperti madu dapat digunakan sebagai pembawa senyawa antioksidan. Oleh sebab itu, diperlukannya metode untuk menganalisa aktivitas antioksidan yang selektif untuk menganalisa sampel tersebut. Metode pengujian antioksidan seperti DPPH dan FRAP dibedakan berdasarkan mekanisme reaksinya, sementara pelarut yang digunakan untuk maserasi dipilih berdasarkan sifat kepolarannya. Sampel yang digunakan sebagai standar antioksidan dipilih berdasarkan struktur flavon dan flavonoid yang umumnya mewakili dasar struktur antioksidan bahan alam. Metode uji DPPH ditemukan paling efektif dan efisien dibandingkan dengan metode FRAP dengan nilai IC_{50} ekstrak metanol madu berturut-turut 16,9;33,8;35,7;80,6;83,4;106,7 dan nilai IC_{50} ekstrak N-heksan madu berturut-turut 12,4;14,1;16,4;18,9;29,4;29,7. Kolerasi antara kedua metode uji terbukti sangat tinggi ($R>0,95$) sehingga diantara keduanya dapat saling menggantikan dalam dilakukannya analisis.

Kata kunci: Antioksidan, DPPH, FRAP, Kadar total flavonoid, IC_{50}

Abstract

Antioxidant compounds can inhibit the oxidation process by inhibiting the process of initiation or propagation of chain oxidation reactions, natural materials such as honey can be used as carriers of antioxidant compounds. Therefore, a method is needed to analyze the antioxidant activity selected to analyze the sample. Antioxidant testing methods such as DPPH and FRAP are distinguished based on the reaction mechanism, while the solvent used for maceration is selected based on its polarity. The samples used as antioxidant standards were selected based on the structure of flavones and flavonoids which generally represent the basic antioxidant structure of natural ingredients. The DPPH test method was found to be the most effective and efficient compared to the FRAP method with IC_{50} values of honey methanol extract 16.9; 33.8; 35.7; 80.6; 83.4; 106.7 and IC_{50} values of N-honey hexane respectively 12.4;14,1;16,4;18,9;29,4;29,7. The correlation between the two test methods proved to be very high ($R> 0.95$) so that they could support each other in the analysis.

Keywords: Antioxidant, DPPH, FRAP, Total flavonoid content, IC_{50}

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Antioksidan merupakan agen untuk melawan kerusakan yang disebabkan oleh oksidasi seperti O_2 , OH^- , superoksida dan radikal peroksil lipid. Stres oksidatif seperti kanker, sintesis mutagen, penuaan, aterosklerosis serta penyakit kronis dan degeneratif banyak di temui di masyarakat. Agen antioksidasi seperti asam askorbat, tokoferol, polifenol, katalase dll dapat merangsang biomolekuler karbohidrat, asam nukleat, protein, lipid dan memprovokasi respon antioksidan (Kamaruzzaman dkk, 2019).

Radikal bebas bekerja dengan cara bereaksi dengan molekul sel sekitar agar dapat memperoleh pasangan elektronnya dan mengubah pasangan elektron tersebut menjadi radikal bebas. Efek reaksi radikal bebas yang terus menerus terjadi di dalam tubuh akan berpengaruh pada tubuh yang memerlukan antioksidan tambahan agar dapat menetralkan radikal bebas (Alves dkk, 2013). Radikal bebas dapat dinetralkan sehingga tidak terjadi penumpukan yang terlalu banyak didalam tubuh dengan menggunakan senyawa antioksidan yang dapat ditemui pada bahan alam (madu) (Yefrida dkk, 2015).

Madu termasuk dalam produk alami dengan tinggi nilai gizi karena terdapat bioaktif yang dapat dimanfaatkan, terdapat dua senyawa bioaktivitas dalam madu yang paling sering diteliti yaitu sifat antibakteri dan sifat antioksidan (Cyprian & Agricultural, 1879). Alasan utama madu dapat memiliki aktivitas antioksidan yaitu ditunjukkan dari adanya kandungan senyawa polifenol, senyawa flavon, senyawa flavonoid, asam askorbat serta enzim pendukung seperti katalase dan peroksidase (Chua dkk, 2013). Komposisi madu dapat dipengaruhi pada sumber bunga, musim dan lingkungan sekitar. Adanya variasi pada madu

menyebabkan adanya perbedaan aktivitas biologis serta komposisi kimiawinya, sifat fisik (warna, viskositas, sifat higroskopis dan pH) dan rasa, sehingga variasi madu dapat mempromosikan kesehatan yang berbeda-beda (Dzugan dkk, 2018).

Metode penentuan potensi antioksidan dalam madu sudah banyak yang dapat digunakan, tes yang paling umum digunakan adalah DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dan FRAP (Ferric Reducting Antioxidant Power) (Alam dkk, 2013). Setiap metode yang digunakan memiliki kelebihan dan kekurangan seperti pada tes DPPH, tes ini tidak dipengaruhi oleh reaksi samping tertentu seperti kelas ion logam dan penghambatan enzim (Handayani, 2018). Pemilihan metode berdasarkan kelebihan dari metode DPPH yang dapat menunjukkan hasil aktivitas antioksidan berdasarkan donor atom hidrogen sementara metode FRAP dapat menunjukkan hasil potensial reduksi berdasarkan penangkapan total radikal bebas dengan ion besi, kedua metode ini hanya memerlukan alat spektrofotometer UV-Vis (Abdullah dkk, 2014). Kekurangan dari metode FRAP yaitu variasi hasil uji yang bergantung pada skala waktu analisis dan metode ini kurang relevan untuk penggunaan aktivitas antioksidan pada thiol seperti glutathione (Firuzi dkk, 2005).

Tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui uji kualitatif, uji kuantitatif fitokimia, kadar total flavonoid, aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, potensial reduksi dengan metode FRAP, hubungan kadar total flavonoid dengan aktivitas antioksidan dan potensial reduksi serta mengetahui hubungan metode DPPH dengan metode FRAP.

II. MATERIAL DAN METODE PENELITIAN

A. Material

Material yang digunakan yaitu tabung reaksi, toples kaca, batang pengaduk, oven, rak tabung reaksi, neraca analitik, rotary evaporator, botol vial, falcon tube, pipet tetes, pipet volum, corong, labu ukur, sonikator, mikropipet dan spektrofotometer UV-Vis. Sedangkan bahan yang digunakan yaitu aluminium chloride, kertas saring, quercetin, metanol p.a, aquadest p.a, etanol 96% p.a, asam oksalat, asam asetat glasial, $AlCl_3$, KH_2PO_4 , kalium ferrisida, asam askorbat, $FeCl_3$, pelarut n-heksan p.a, asam trikloroasetat (TCA), $K_3Fe(CN)_6$, aluminium foil, serbuk DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazil) dan tissue roll.

B. Metode

1. Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian yang bersifat eksperimental laboratorium, yaitu Uji Aktivitas Antioksidan pada beberapa jenis Madu Monofloral Spesies Lebah Apis Mellifera dengan Metode DPPH dan FRAP, di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Ma Chung.

2. Populasi dan Sampel

Material yang digunakan adalah madu randu diperoleh dari Kota Pati, Madu mente dari Kota Bali, madu karet dari Kota Semarang, madu sono dari Kota Madiun, madu akasia mandiangan dari Kota Jambi.

3. Cara Kerja

a. Uji fitokimia

1. Uji Organoleptis

Uji ini dilakukan dengan menggunakan alat panca indra dalam mengamati warna, bau dan rasa dari tiap sampel madu (Selawa dkk, 2013).

2. Uji pH

Madu sebanyak 50 mL diletakan dalam beaker glass kemudian diukur dengan menggunakan pH meter (Maryam dkk, 2016).

3. Uji Alkaloid

Tabung reaksi sebanyak 5 gelas kemudian dimasukan 2 mL sampel madu pada 3 gelas tabung reaksi ditambahkan 3 tetes reagen mayer dan sisanya dengan reagen dragendroff, terjadinya endapan putih ketika penambahan reagen mayer menunjukkan hasil yang positif sementara terbentuknya endapan jingga / merah coklat pada penambahan reagen dragendroff menunjukkan hasil yang positif (Wulandari, 2017).

4. Uji Flavonoid

Madu sebanyak 2 mL dimasukan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan sedikit logam Mg dan 5 ml metanol. Adanya perubahan warna jingga, merah dan kuning menunjukkan hasil yang positif (Huliselan dkk, 2015).

5. Uji Tanin

Madu sebanyak 0,5 mL dimasukan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL aquades dan 3 tetes $FeCl_3$. Adanya perubahan warna hijau / hitam kebiruan menunjukkan hasil yang positif (Abdullah dkk, 2014).

6. Uji Steroid

Madu sebanyak 2 tetes dimasukan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes asam asetat glasial, 2 tetes kloroform dan 2 tetes H_2SO_4 . Hasil yang positif ditunjukan dari adanya perubahan warna menjadi warna biru atau hijau (Setyowati dkk, 2014).

7. Uji Saponin

Madu sebanyak 2 mL ditambahkan aquades kemudian dikocok. Hasil yang positif ditunjukkan timbulnya busa dengan ketinggian 1-3 cm (15 menit) (Idris, 2016).

8. Uji Kadar Air

Madu sebanyak 2 gr dimasukkan kedalam botol yang telah diketahui bobotnya, kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu 105oC – 110oC selama 2 jam. Setelah dioven sampel dalam botol didinginkan dalam desikator selama 10 menit kemudian botol ditimbang kembali dan dicatat hasilnya. Masukkan kembali botol yang berisi sampel kedalam oven selama 1 jam lalu didinginkan kembali dalam desikator selama 10 menit dan kembali ditimbang beratnya, lakukan pengulangan hingga berat konstan dengan selisih penimbangan berturut-turut <0,2 mg (Idris, 2016). Kadar air didapatkan dengan menggunakan rumus

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{Berat bahan (awal - akhir)}}{\text{Berat bahan awal}} \times 100$$

9. Uji Daya Alir

Uji daya alir dilakukan dengan menggunakan alat viskometer stormer dan menggunakan spindel beban 150 g, 200 g, 250 g, 300 g dan 350 g dengan tiga kali pengulangan. Setelah itu akan didapatkan nilai rata-rata rpm pada tiap beban yang kemudian dibuat kurva, garis pada kurva menunjukkan jenis aliran pada madu. Rumus yang dapat digunakan untuk menentukan rpm yaitu :

$$\text{Rpm} = \frac{60}{t \text{ (s)}} \times 25$$

b. Uji Kadar Total Flavonoid

1. Asam Asetat Glisial 5%

Asam asetat glisial sebanyak 0,5 gr dilarutkan dalam 10 mL aquades.

2. AlCl₃ 10%

AlCl₃ sebanyak 1 gr dilarutkan dalam aquades 10 mL

3. Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

Baku quercetin ditimbang 25 mg yang kemudian ditambahkan 25 mL etanol 96%, hasil larutan diambil sebanyak 1 mL lalu ditambahkan etanol 96% hingga 10 mL, dari larutan tersebut didapatkan larutan standar 100 ppm yang kemudian larutan ini dibuat seri konsentrasi yaitu 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm dan 14 ppm. Larutan seri konsentrasi yang telah dibuat ditambahkan dengan 3 mL etanol 96%, 0,2 mL AlCl₃, 0,2 mL asam asetat glisial 5% dan 5,6 mL aquades. Kemudian diinkubasi selama 30 menit dan diukur pada panjang gelombang maksimum 435 nm.

4. Penetapan Kadar Flavonoid

Pembuatan larutan ekstrak dengan konsentrasi sebesar 10.000 ppm dengan melarutkan 100 mg ekstrak etanol madu dalam 10 mL etanol 96%, larutan dengan konsentrasi 10.000 ppm diambil sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 3 mL etanol 96%, 0,2 mL AlCl₃ 10%. 0,2 mL asam asetat glisial dan 5,6 mL aquades. Sampel diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum 435 nm.

c. Analisis Metode DPPH 1. Ekstraksi Madu dengan Metanol

Maserasi dilakukan dengan perendaman 10 gram madu dengan metanol p.a (2x24 jam), kemudian disaring dan selanjutnya dimasukkan dalam alat rotary evaporator hingga didapatkan ekstrak kental metanol madu, suhu yang digunakan pada saat evaporator yaitu 55 oC. Remaserasi dilakukan dengan cara merendam hasil ekstrak kental metanol madu dengan metanol p.a sebanyak 30 mL. Kemudian, larutan ini kembali di rotary evaporator untuk menghasilkan ekstrak metanol madu.

2. Ekstraksi Madu dengan Pelarut n-Heksan

Maserasi dilakukan dengan perendaman 10 gram madu dengan N-heksan p.a yang kemudian disonikasi selama 2 x 30 menit. Larutan disaring, maserat yang diperoleh dievaporasi dengan cara dimasukkan dalam botol vial lalu ditutup aluminium foil yang diberi lubang lalu dibiarkan sampai pelarut menguap dan hanya meninggalkan ekstrak N-heksan madu.

3. Pembuatan Larutan DPPH 0.5 mM

Sebanyak 5 mg serbuk DPPH ditambahkan metanol p.a dalam labu ukur sampai pada volume 250 mL yang kemudian dihomogenkan sehingga diperoleh larutan DPPH 0.5 mM.

4. Pembuatan Larutan Blanko

Sebanyak 1 mL larutan DPPH 0.5 mM ditambahkan dengan 2 mL metanol p.a sehingga larutan ini disebut sebagai larutan blanko.

5. Pembuatan Larutan Induk Asam Askorbat 100 ppm

Sebanyak 100 mL metanol p.a digunakan untuk melarutkan 10 mg asam askorbat.

6. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Metanol 3.000 ppm

Sebanyak 10 mL metanol p.a digunakan untuk melarutkan 30 mg ekstrak metanol madu.

7. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak n-Heksan 3.000 ppm

Sebanyak 10 mL n-Heksan p.a digunakan untuk melarutkan 30 mg ekstrak metanol madu.

8. Penentuan Antioksidan Asam Askorbat dengan Metode DPPH

Pembuatan larutan seri konsentrasi pada larutan standar asam askorbat yang telah dibuat masing-masing 0,4 mL, 0,3 mL, 0,2 mL dan 0,1 mL sehingga memperoleh larutan deret standar 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm dan 1 ppm. Larutan deret yang didapatkan ditambahkan metanol p.a sampai volume total 5 mL, dari larutan tersebut diambil sebanyak 0,2 mL yang kemudian ditambahkan dengan larutan DPPH 0.5 mM. Tabung reaksi ditutup sehingga terhindar dari cahaya kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam ruangan, larutan standar diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 517 nm.

9. Penentuan Antioksidan Ekstrak dengan Metode DPPH

Pembuatan larutan seri konsentrasi pada larutan ekstrak metanol madu dibuat masing-masing 2,67 mL, 2 mL, 1,33 mL dan 0,67 mL sehingga diperoleh larutan deret 800 ppm, 600 ppm, 400 ppm dan 200 ppm. Larutan deret yang didapatkan ditambahkan dengan metanol p.a sampai volume total 5 mL, dari larutan tersebut diambil sebanyak 0,2 mL yang kemudian ditambahkan dengan larutan DPPH 0.5 mM. Tabung reaksi ditutup sehingga terhindar dari cahaya kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam ruangan, larutan standar diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 517 nm.

d. Analisis Metode FRAP 1. Pembuatan Ekstrak Etanol Madu

Maserasi dilakukan dengan perendaman 10 gram madu dengan etanol 96% p.a (2x24 jam), kemudian disaring dan selanjutnya dimasukkan dalam alat rotary evaporator hingga didapatkan ekstrak kental etanol madu, suhu yang digunakan pada saat evaporator yaitu 55 oC. Remaserasi dilakukan dengan cara merendam hasil ekstrak kental etanol madu dengan etanol 96% p.a sebanyak 30 mL. Kemudian, larutan ini kembali di rotary evaporator untuk menghasilkan ekstrak etanol madu.

2. Penyiapan Sampel Ekstrak Etanolik

Sebanyak 5 mL etanol 96% digunakan untuk melarutkan ekstrak etanol madu.

3. Penyiapan Larutan Kurva Baku

Pembuatan larutan standar 1000 ppm dengan cara sebanyak 25 mg asam askorbat dicukupkan volumenya dalam labu ukur 25 mL dengan larutan asam oksalat 1%. Dari larutan tersebut dibuat larutan standar seri konsentrasi 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; dan 1,0 mL sehingga

diperoleh larutan standar asam askorbat 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm dan 100 ppm yang dicukupkan volumenya dalam labu ukur 10 mL menggunakan pelarut asam oksalat 1%.

4. Larutan Dapar Fosfat 0.2 M pH 6.6

Larutan disiapkan dengan menimbang 2 gram NaOH dan dilarutkan dengan aquades bebas CO₂ hingga tepat 250 mL dalam labu takar. Kemudian sebanyak 6,8 gram KH₂PO₄ yang dilarutkan dengan aquades bebas CO₂ 250 mL dalam labu takar. Kemudian dipipet sebanyak 16,4 mL NaOH dimasukkan dalam labu takar dan dicampurkan 50 mL KH₂PO₄, selanjutnya diukur sampai pH 6,6 dan dicukupkan dengan aquades bebas CO₂ hingga 200 mL.

5. Larutan Oksalat 1%

Sebanyak 1 gr asam oksalat dicukupkan volumenya dengan air bebas CO₂ dalam labu ukur 100 mL.

6. Larutan Kalium Ferrisianida 1%

Sebanyak 1 gr kalium ferrisianida dicukupkan volumenya dengan aquades dalam labu ukur 100 mL.

7. Larutan FeCl₃ 0,1%

Sebanyak 0,1 gr FeCl₃ dicukupkan volumenya dengan aquades dalam labu ukur 100 mL.

8. Larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%

Sebanyak 10 gr TCA dicukupkan volumenya dengan aquades dalam labu ukur 100 mL.

9. Aktivitas Antioksidan Ekstrak dengan Metode FRAP

Sebanyak 5 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 mL etanol 96%, lalu dipipet 1 mL, ditambahkan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6.6) dan 1 mL K₃Fe(CN)₆ 1% setelah itu, diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL TCA lalu di sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuge dipipet 1 mL lapisan bagian atas kedalam tabung reaksi, dan ditambahkan 1 mL aquades dan 0,5 mL FeCl₃ 0,1%. Larutan didiamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada 720 nm. Sebagai blanko digunakan campuran larutan oksalat. Kurva kalibrasi dibuat menggunakan larutan asam askorbat dengan berbagai konsentrasi. Nilai FRAP dinyatakan dalam mg equivalen asam askorbat/gr ekstrak.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

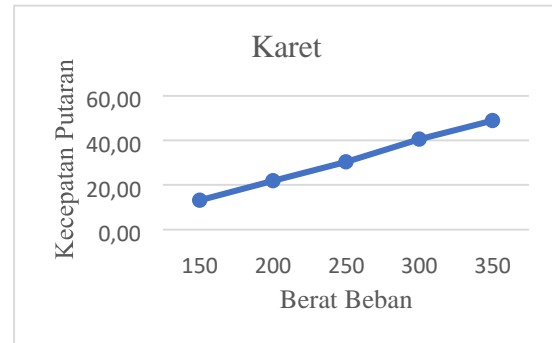
A. Hasil

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia

Jenis Sampel Madu	Pengamatan Sampel		
	Alkaloid	Flavonoid	Saponin
Randu	+	+	+
Sono	+	+	+
Rambutan	+	+	+

Akasia	+	+	+
Karet	+	+	+
Mente	+	+	+

Jenis Sampel Madu	Pengamatan Sampel		
	Organoleptis		
	Warna	Rasa	Bau
Randu	kuning kecoklatan	Manis khas	Manis khas randu
Sono	Kuning keemasan	Manis	Manis
Rambutan	Coklat kehitaman	manis khas, sedikit pahit	Manis khas rambutan
Akasia	Coklat kehitaman	Manis, legit, asam diakhir	Manis khas
Karet	Kuning kecoklatan	Asam manis (dominan asam)	Manis khas
Mente	Kuning kecoklatan	Manis khas	Manis, harum khas



Gambar 1. Kurva Hasil Data RPM Madu Karet
Tabel 2. Hasil Uji Organoleptis

Tabel 5. Hasil Kadar Total Flavonoid

No	Nama Sampel	Kadar Flavonoid (mg/mL)	Kadar Flavonoid (mgQE/g Ekstrak)
1	Randu	0,004	0,433
2	Sono	0,019	1,92
3	Rambutan	0,01	1,003
4	Akasia	0,0099	0,991
5	Karet	0,021	2,117
6	Mente	0,012	1,23

Tabel 3. Hasil Uji Kadar Air

Jenis Sampel Madu	Kadar Air	pH
Randu	1.15%	3.79
Sono	0.64%	3.42
Rambutan	1.12%	3.76
Akasia	1.27%	3.60
Karet	0.58%	3.75
Mente	0.95%	3.65

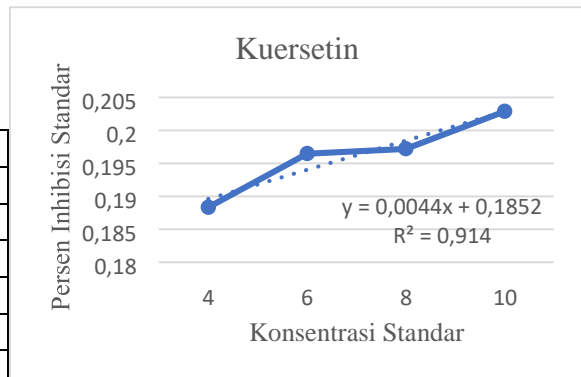
Tabel 4. Hasil Uji Daya Alir

Absorbansi Larutan Standar Kuersetin

Tabel 6. Hasil Nilai IC₅₀ µg/mL metode DPPH yang diperoleh dari persamaan regresi

No	Nama Sampel	Nilai IC ₅₀ µg/mL	
		Pelarut Ekstrak	
		Metanol	n-Heksan
1	Randu	106,67	29,485
2	Sono	80,607	29,704
3	Rambutan	33,867	16,385
4	Akasia	35,739	12,443
5	Karet	16,989	14,098
6	Mente	83,434	18,878

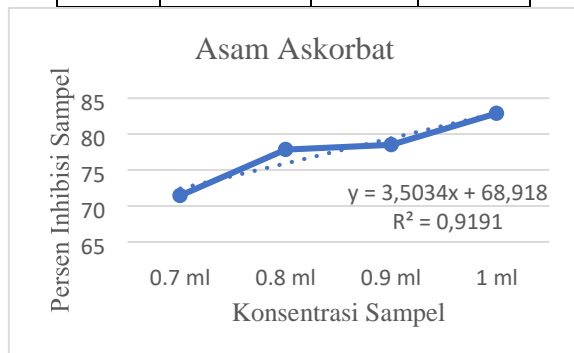
Beban (g)	Rata-Rata RPM		
	Rambutan	Randu	Sono
150	9,13	13,08	17,58
200	15,31	24,32	28,48
250	20,36	33,33	41,67
300	27,11	41,67	56,25
350	31,69	50,00	70,31



Gambar 2. Persamaan Regresi dari Hasil

Beban (g)	Rata-Rata RPM		
	Akasia	Karet	Mente
150	7,41	13,16	10,59
200	13,31	21,84	19,23
250	18,60	30,41	26,79
300	24,32	40,54	35,71
350	30,61	48,91	42,86

Maserasi



Gambar 3. Persamaan Regresi dari Hasil Absorbansi Larutan Standar Asam Askorbat

Tabel 7. Hasil Nilai Aktivitas Antioksidan mg AAE/g ekstrak metode FRAP yang diperoleh dari persamaan regresi

No	Nama Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas Antioksidan (mg AAE/g ekstrak)
1	Randu	1	45,254
2	Sono		35,867
3	Rambutan		47,078
4	Akasia		26,866
5	Karet		47,166
6	Mente		30,346

B. Pembahasan

menggunakan pelarut metanol p.a menurut jurnal (An dkk, 2017) penggunaan pelarut ini dapat digunakan untuk menarik senyawa seperti antosianin, terpenoid, saponin, tanin, flavon, polifenol dan fenol sementara pada penggunaan etanol p.a sebagai pelarut ekstraksi menurut jurnal (An dkk, 2017) dapat menarik senyawa seperti tanin, polifenol, flavonol, steroid, terpenoid dan alkaloid. Penggunaan pelarut N-heksan menurut jurnal (An dkk, 2017) dapat menarik senyawa terpenoid dan flavonoid, sehingga pelarut yang digunakan tidak spesifik hanya menarik senyawa flavonoid namun senyawa lain juga dapat tertarik oleh pelarut ini.

Berdasarkan hasil pengujian fitokimia didapatkan hasil semua sampel madu monofloral mengandung senyawa flavonoid, hasil positif ini didukung dengan adanya warna merah tua (sampel madu + logam Mg + Metanol). Flavonoid termasuk dalam senyawa dengan sifat polar dikarenakan adanya sejumlah gugus hidroksil (Selawa dkk, 2013). Penggunaan logam Mg pada uji flavonoid berfungsi sebagai pereduksi inti benzopiron pada struktur flavonoid, hasil akhir yang diberikan yaitu terjadinya perubahan warna pada sampel menjadi warna merah atau jingga. Perubahan warna yang terjadi ini menunjukkan bahwa suatu sampel memiliki senyawa flavonoid.

Pengujian fitokimia tanin didapatkan hasil semua sampel madu monofloral tidak mengandung senyawa tanin, pada penambahan FeCl₃ dalam air tidak menimbulkan perubahan warna pada sampel madu hal ini dikarenakan sampel tidak memiliki senyawa tanin sehingga ion Fe³⁺ tidak membentuk senyawa kompleks. Pengujian fitokimia steroid didapatkan hasil semua sampel madu monofloral tidak mengandung

senyawa steroid, hal ini disebabkan karena tidak terjadinya lisis H₂O dan penggabungan karboksilasi (Abdullah dkk, 2014). Pengujian fitokimia alkaloid didapatkan hasil semua sampel madu monofloral mengandung senyawa alkaloid, hal ini ditunjukkan dari hasil endapan antara kalium dengan alkaloid berwarna coklat sampai kuning.

Pengujian saponin pada semua sampel madu monofloral menunjukkan hasil yang positif hal ini ditunjukkan dengan adanya busa, adanya senyawa glikosida yang mampu membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Idris, 2016). Pengujian organoleptis dilakukan dengan bantuan panca indra dimana hasil dari pengujian ini masih memiliki nilai penting walaupun tidak memiliki nilai implisit seperti pada metode lainnya, karena selain pengujian secara kuantitatif diperlukan juga pengujian secara kualitatif dimana warna dari madu yang gelap dianggap memiliki nilai aktivitas antioksidan yang tinggi namun pada kenyataannya madu karet memiliki nilai aktivitas yang tinggi dengan hasil data organoleptis memiliki warna kuning kecoklatan.

Ketetapan pH sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) yaitu 3,4-6,1 sehingga hasil data yang didapatkan sesuai dengan standar (Maryam dkk, 2016). Hasil pengujian kadar air menunjukkan bahwa sampel madu randu memiliki kadar sebesar 1,15%, madu sono sebesar 0,64%, madu rambutan sebesar 1,12%, madu akasia sebesar 1,27%, madu karet sebesar 0,58% dan madu mente sebesar 0,95%. Ketetapan kadar air yang ditentukan oleh Standar Nasional Indonesia (SNI) yaitu dibawah 22% (Maryam dkk, 2016). kadar air pada sampel madu monofloral dapat dikatakan telah memenuhi SNI, namun hasil ini dapat berubah tergantung pada musim pada saat madu dipanen.

Madu termasuk dalam sistem non newton yang merupakan kebalikan dari aliran newton karena aliran non newton dapat dipengaruhi oleh kecepatan dan tekanan sehingga larutan madu memerlukan bantuan untuk dapat mengalir dengan bantuan tekanan (energi), adanya tekanan ini maka viskositas dari madu akan berubah. Sistem non newton dibagi menjadi dua sifat yaitu tidak dipengaruhi oleh waktu (plastis, pseudoplastis dan dilantan) dan sifat dipengaruhi oleh waktu (tikotropik dan antitiktotropik). Hasil uji daya alir dalam bentuk RPM dapat dilihat pada tabel 4 menunjukkan bahwa madu termasuk dalam sistem non newton dengan aliran plastis dimana kurva aliran plastis ini tidak melalui titik (0,0) tetapi memotong sumbu shearing stress (besarnya tekanan) pada satu titik tertentu yang dikenal dengan harga yield dimana cairan plastis tidak akan mengalir sampai shearing stress yang dicapai sebesar yield value tersebut, kurva

hasil data uji daya alir dapat dilihat pada gambar 1. Hasil kadar flavonoid total apabila diurutkan dari yang tertinggi hingga terendah yaitu madu karet sebesar 2,117 mgQE/g ekstrak, madu sono 1,92 mgQE/g ekstrak, madu mente 1,23 mgQE/g ekstrak, madu rambutan 1,003 mgQE/g ekstrak, madu akasia 0,991 mgQE/g ekstrak dan madu randu 0,433 mgQE/g ekstrak yang dapat dilihat pada tabel 5. Nilai IC₅₀ yang diperoleh akan dibagi menjadi empat kategori dimana kategori pertama merupakan nilai IC₅₀ dengan aktivitas antioksidan yang sangat kuat sebesar <50 µg/mL, aktivitas antioksidan kuat sebesar 50-100 µg/mL, aktivitas antioksidan sedang sebesar 100-150 µg/mL dan aktivitas antioksidan lemah sebesar 150-200 µg/mL. Pada tabel 4.10 didapatkan hasil rata-rata IC₅₀ pada ekstrak n-Heksan madu termasuk dalam golongan sampel dengan aktivitas antioksidan yang sangat kuat karena nilai IC₅₀ >50 µg/mL. Pada sampel ekstrak metanol madu yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dapat dilihat pada sampel madu rambutan, madu akasia dan madu karet karena nilai IC₅₀ yang didapatkan menunjukkan nilai IC₅₀ <50 µg/mL. Sementara madu randu, madu sono dan madu mente termasuk dalam kategori sampel dengan nilai aktivitas antioksidan kuat karena nilai IC₅₀ yang didapatkan menunjukkan nilai IC₅₀ 50-100 µg/mL.

Asam askorbat digunakan sebagai baku pembandingan, pemilihan senyawa ini karena asam askorbat merupakan antioksidan sekunder yang dapat digunakan untuk menghambat radikal bebas dalam membentuk reaksi berantai. Regresi linear yang didapatkan dari hasil absorbansi asam askorbat digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dimana nilai (y) merupakan persentase inhibisi asam askorbat dan nilai (x) merupakan konsentrasi asam askorbat, maka diperoleh nilai IC₅₀ asam askorbat sebesar 5,4 dimana nilai IC₅₀ ini termasuk dalam kategori aktivitas antioksidan sangat kuat. Pada tabel 7 nilai aktivitas antioksidan sampel madu 1 µg/mL apabila diurutkan dari yang terbesar hingga paling kecil ditunjukkan pada ekstrak madu karet sebesar 47,166 mg AAE/g ekstrak, madu rambutan sebesar 47,078 mg AAE/g ekstrak, madu randu sebesar 45,254 mg AAE/g ekstrak, madu sono sebesar 35,867 mg AAE/g ekstrak, madu mente sebesar 30,346 mg AAE/g ekstrak dan urutan terakhir adalah madu karet sebesar 26,866 mg AAE/g ekstrak

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil data penelitian yang telah dilakukan maka dapat diketahui :

Hasil uji pH dan kadar air dalam madu sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI), sementara pada uji viskositas menunjukkan bahwa sampel madu yang digunakan termasuk dalam aliran plastis. Hasil uji fitokimia menunjukkan semua sampel madu monofloral

memberikan hasil yang positif pada uji flavonoid, saponin dan alkaloid sesuai Standar Nasional Indonesia (SNI). Kadar flavonoid total yang diperoleh apabila diurutkan dari yang terbesar hingga terkecil yaitu pada madu karet sebesar 2,117 mgQE/g ekstrak, madu sono 1,92 mgQE/g ekstrak, madu mente 1,23 mgQE/g ekstrak, madu rambutan 1,003 mgQE/g ekstrak, madu akasia 0,991 mgQE/g ekstrak dan madu randu 0,433 mgQE/g ekstrak.

Uji metode DPPH menunjukkan hasil aktivitas antioksidan dalam sampel madu, nilai IC50 dengan golongan aktivitas antioksidan sangat kuat didapatkan pada ekstrak metanol madu karet sebesar 16,989 µg/mL sementara aktivitas antioksidan sangat kuat pada ekstrak n-Heksan madu didapatkan pada madu akasia sebesar 12,443 µg/mL. Uji metode FRAP menunjukkan hasil potensial reduksi dalam sampel madu, nilai potensial reduksi tertinggi diperoleh oleh madu karet sebesar 47,166 mg AAE/g ekstrak dan hasil nilai IC50 pada madu karet sebesar 1,06 µg/mL, hasil tersebut menunjukkan bahwa madu karet termasuk dalam madu dengan aktivitas antioksidan sangat kuat. Hasil pada uji kadar total flavonoid dan uji DPPH menunjukkan keterkaitan sangat kuat bahwa madu karet memiliki nilai flavonoid tertinggi sebesar 2,117 mgQE/g ekstrak dan pada uji DPPH madu karet memiliki nilai IC50 tertinggi sebesar 16,989 µg/mL dengan golongan antioksidan kuat. Hasil pada uji kadar total flavonoid dan uji FRAP menunjukkan keterkaitan sangat kuat bahwa madu karet memiliki nilai flavonoid tertinggi sebesar 2,117 mgQE/g ekstrak dan pada uji FRAP madu karet memiliki nilai aktivitas antioksidan tertinggi sebesar 47,166 mg AAE/g dengan nilai IC50 tertinggi sebesar 1,06 µg/mL dengan golongan antioksidan kuat. Hubungan metode DPPH dan FRAP memiliki keterkaitan sangat kuat antara aktivitas antioksidan dengan potensial reduksi senyawa flavonoid terhadap ion besi, korelasi antara kedua metode uji terbukti sangat tinggi ($R > 0,95$) sehingga diantara keduanya dapat saling menggantikan dalam dilakukannya analisis.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, W., Runtuwene, M. R. J., & Kamu, V. S. (2014). UJI FITOKIMIA DAN PENENTUAN Inhibition Concentration 50% PADA BEBERAPA TUMBUHAN OBAT DI PULAU TIDORE. *Jurnal Ilmiah Sains*, 14(2), 95. <https://doi.org/10.35799/jis.14.2.2014.6063>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. In *Saudi Pharmaceutical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- An, S., Zhao, L. P., Shen, L. J., Wang, S., Zhang, K., Qi, Y., Zheng, J., Zhang, X. J., Zhu, X. Y., Bao, R., Yang, L., Lu, Y. X., She, Z. G., & Tang, Y. Da. (2017). Phytochemical Screening and Extraction. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 66(6), 1866–1884. <https://doi.org/10.1002/hep.29375>
- Chua, L. S., Rahaman, N. L. A., Adnan, N. A., & Eddie Tan, T. T. (2013). Antioxidant activity of three honey samples in relation with their biochemical components. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/313798>
- Cyprian, T., & Agricultural, M. (1879). *Foreign Honey Bees*. 197–199.
- Dzukan, M., Tomczyk, M., Sowa, P., & Grabek-Lejko, D. (2018). Antioxidant activity as biomarker of honey variety. *Molecules*, 23(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules23082069>
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1721(1–3), 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.11.001>
- Handayani, E. (2018). Kandungan Senyawa aktif Madu dan Uji Potensinya sebagai Antioksidan. *Photosynthetic*, 2(1), 1–13. <http://link.springer.com>
- Huliselan, Y. M., Runtuwene, M. R. J., & Wewengkang, D. S. (2015). Antioxidant Activity of Ethanol, Ethyl Acetate and n-Hexane Extract from Seswanua Leaves (Clerodendron squamatum Vahl.). *Pharmakon*, 4(3), 155–163. <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/pharmakon/article/view/8855>
- Idris, N. A. (2016). *Uji Aktivitas antioksidan Ekstrak Sarang Lebah dan Madu HUtan dari Luwu Utara dengan Metode DPPPH (1,1-Difenil-2-Pikrillhidrazil)*.
- Kamaruzzaman, M. A., Chin, K. Y., & Mohd Ramli, E. S. (2019). A Review of Potential Beneficial Effects of Honey on Bone Health. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2019(II). <https://doi.org/10.1155/2019/8543618>
- Maryam, S., Baits, M., & Nadia, A. (2016). PENGUKURAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (Moringa oleifera Lam.) MENGGUNAKAN METODE FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 2(2), 115–118. <https://doi.org/10.33096/jffi.v2i2.181>

- Selawa, W., Revolta, M., Runtuwene, J., Citraningtyas, G., Studi, P., Fmipa, F., & Manado, U. (2013). KANDUNGAN FLAVONOID DAN KAPASITAS ANTIOKSIDAN TOTAL EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG [Anredera cordifolia(Ten.)Steenis.]. *Pharmakon*, 2(1), 18–23.
<https://doi.org/10.35799/pha.2.2013.1018>
- Setyowati, W. A. E., Ariani, S. R. D., Ashadi, Putri, R. C., & Mulyani, B. (2014). Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio zibethinus* Murr .) Varietas Petruk. *Kimia Organik Bahan Alam*, VI(ISBN : 9793631740), 271–280.
- Wulandari, D. D. (2017). Analisa Kualitas Madu (Keasaman, Kadar Air, dan Kadar Gula Pereduksi) Berdasarkan Perbedaan Suhu Penyimpanan. *Jurnal Kimia Riset*, 2(1), 16.
<https://doi.org/10.20473/jkr.v2i1.3768>
- Yefrida, Ashikin, N., & Refilda. (2015). Validasi Metoda Frap Modifikasi Pada Penentuan Kandungan Antioksidan Total Dalam Sampel Mangga Dan Rambutan. *Jurnal Riset Kimia*, 8(2), 170.
<https://doi.org/10.25077/jrk.v8i2.236>

