

**KADAR TOTAL SENYAWA FENOLAT PADA MADU RANDU DAN MADU KELENGKENG
SERTA UJI AKTIVITAS ANTIRADIKAL BEBAS DENGAN
METODE DPPH (Difenilpikril Hidrazil)**

Ketut Ratnayani, A. A. I. A Mayun Laksmiwati, dan Ni P. Indah Septian P.

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

ABSTRAK

Madu mengandung berbagai senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan salah satunya adalah senyawa fenolat. Madu monoflora yang digunakan dalam penelitian ini adalah madu randu dan madu kelengkeng dari merk tertentu yang beredar di pasaran.

Uji kualitatif dengan pereaksi warna FeCl_3 5% menunjukkan bahwa pada kedua jenis madu positif mengandung senyawa fenolat. Penentuan kadar total senyawa fenolat dilakukan secara spektrofotometri dengan metode Folin-Ciocalteu dan asam galat sebagai standar, sedangkan uji aktivitas antiradikal bebasnya menggunakan metode DPPH (*Difenilpikril hidrazil*).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar total senyawa fenolat pada madu randu sebesar $1375,89 \pm 134,10$ mg GAE/kg, sedangkan madu kelengkeng sebesar $1136,49 \pm 39,62$ mg GAE/kg. Hasil % peredaman radikal bebas pada madu randu menit ke-5 sebesar $62,55 \pm 4,4407$ % dan menit ke-60 sebesar $95,39 \pm 8,5507$ %. Pada menit ke-5, % peredaman radikal bebas madu kelengkeng adalah $44,12 \pm 1,3433$ %, menit ke-60 adalah $62,00 \pm 0,8612$ %, dan untuk standar asam galat diperoleh % peredaman radikal bebas menit ke-5 sebesar 41,03% dan menit ke-60 sebesar 92,00%. Dengan demikian kadar total senyawa fenolat pada madu randu dan madu kelengkeng memiliki hubungan yang linier dengan masing-masing % peredaman radikal bebasnya.

Kata kunci : Madu, Senyawa fenolik, Spektrofotometri UV-Vis, Antiradikal bebas

ABSTRACT

Honey contains a variety of compounds which function as antioxidants one of which is a phenolic compound. Monoflora honey used in this study were randu and kelengkeng honey from certain brand distributed on the market.

Qualitative test with 5% FeCl_3 result showed that both types of honey contain phenolic compounds. The total phenolic compounds was determined by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu method and gallic acid as standards, while the free radical activity was tested using the method of DPPH (*Difenilpikril hidrazil*).

The result of research showed that the total content of phenolic compound in randu was $1375,89 \pm 134,10$ mg GAE/kg, while kelengkeng honey was $1136,49 \pm 39,62$ mg GAE/kg. The % reduction of free radical in randu honey at the 5th minute was $62,55 \pm 4,4407$ % and at the 60th minute was $95,39 \pm 8,5507$ %. The % reduction of free radical for kelengkeng honey at the 5th minute was $44,12 \pm 1,3433$ %, 60th minute was $62,00 \pm 0,8612$ %, and for the standard of gallic acid the % reduction of free radical at the 5th minute was 41,03% and the 60th minute was 92,00%. Therefore, there was a linear correlation between the total phenolic compound of randu honey and kelengkeng honey with % reduction of its free radical.

Keywords : Honey, phenolic, spectrophotometry UV-Vis, free radical activity

PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Reaksi dari radikal bebas akan berlangsung secara terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, dan lain-lain. Oleh karena itu, tubuh memerlukan substansi penting yaitu antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas tersebut sehingga tidak dapat menginduksi suatu penyakit (Anonim, 2006).

Salah satu aplikasi sumber alami yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan adalah madu. Madu adalah cairan manis yang berasal dari nektar tanaman yang diproses oleh lebah menjadi madu dan tersimpan dalam sel-sel sarang lebah (Ardiansyah, 2011).

Kandungan nutrisi dalam madu yang berfungsi sebagai antioksidan adalah vitamin C, asam organik, enzim, asam fenolat, flavonoid dan beta karoten yang bermanfaat sebagai antioksidan tinggi (Gheldof, 2002). Senyawa dengan aktivitas antioksidan yang diteliti adalah senyawa fenolat. Senyawa fenolat dalam tumbuhan dapat berupa fenol, antraquinon, asam fenolat, kumarin, flavonoid, lignin dan tanin (Harborne, 1987). Senyawa fenolat telah diketahui memiliki berbagai efek biologis seperti aktivitas antioksidan melalui mekanisme sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkhelat logam, peredam terbentuknya oksigen singlet serta pendonor elektron.

Kadar total senyawa fenolat dapat ditentukan secara spektrofotometri dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu dan sebagai pembanding digunakan asam galat. Kandungan fenolat total dalam tumbuhan dinyatakan dalam GAE (*gallic acid equivalent*) yaitu jumlah kesetaraan miligram asam galat dalam 1 gram sampel (Gheldof & Engeseth, 2002).

Beberapa penelitian sebelumnya mengenai madu yang berkaitan dengan antioksidan sudah pernah dilakukan. Bruce (2005) meneliti tentang total fenolat pada beberapa madu flora Australia, dengan hasil

tertinggi didapatkan sebesar 195,96 mg GAE/kg dan hasil terendah sebesar 14 mg GAE/kg. Ferreres (2005) menyatakan bahwa senyawa flavonoid ditemukan pada setiap 20 sampel madu yang diambil untuk diteliti, jumlah flavonoid tersebut berkisar antara 60 hingga 500 miligram di setiap 100 gram madu yang dianalisis. Disebutkan pula oleh Oka dkk (2008) yang meneliti tentang aktivitas antiradikal bebas serta kadar karoten pada madu randu dan madu kelengkeng, dimana terdapat perbedaan aktivitas antiradikal bebas serta kadar karoten pada madu kelengkeng dengan madu randu. Oleh karena itu, penulis tertarik untuk meneliti kadar total senyawa fenolat serta aktivitas antiradikal bebas dari dua jenis madu monoflora yaitu madu randu dan madu kelengkeng. Pemilihan kedua jenis madu tersebut adalah untuk meneliti apakah ada perbedaan kadar senyawa fenolat pada madu dari dua jenis bunga yang berbeda dan hubungan antara kedua parameter tersebut.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : sampel madu yang berlabel madu randu dan madu kelengkeng dari merk Nusantara, etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), besi (III) klorida (FeCl_3) 5% , metanol 85% (CH_3OH), akuades, kristal difenilpicril hidrazil (DPPH), reagen Folin, Na_2CO_3 (Natrium Karbonat) 5%, dan asam galat.

Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : seperangkat alat gelas, neraca analitik, plat tetes, dan spektrofotometer UV-Vis.

Cara Kerja

Uji kualitatif senyawa fenolat pada madu dengan reaksi warna

Masing-masing sampel madu dipipet sebanyak 2 mL, kemudian dimaserasi dengan etanol sebanyak 3 mL, dan dikocok. Ekstrak tersebut diteteskan pada plat tetes dan ditambahkan dengan larutan FeCl_3 5% sebanyak

3-5 tetes. Uji positif adanya senyawa fenolat ditunjukkan jika terjadi perubahan warna menjadi hijau, biru, ungu atau hitam.

Pembuatan standar asam galat

Larutan stok asam galat dengan konsentrasi 100 ppm (mg/L), yang dapat dibuat dengan melarutkan 0,01 g asam galat dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Kemudian dibuat serangkaian larutan standar dengan konsentrasi 0; 2; 4; 8 ppm.

Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan standar asam galat 4 ppm diukur serapannya pada panjang gelombang 700 – 780 nm dengan interval tertentu. Hasil yang diperoleh dibuat dalam bentuk kurva, sebagai sumbu y adalah absorbansi dan panjang gelombang cahaya sebagai sumbu x. Dari kurva tersebut dapat ditentukan panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum.

Pembuatan kurva standar asam galat

Larutan stok asam galat 100 ppm sebanyak 0; 0,2; 0,4; 0,8 mL masing-masing ditambahkan dengan reagen folin sebanyak 0,8 mL, dimasukkan pada labu ukur 10 mL. Selanjutnya ditambahkan Na₂CO₃ 5% hingga tanda batas, sehingga menghasilkan larutan standar dengan konsentrasi 0; 2; 4; 8 ppm. Masing-masing larutan didiamkan selama 60 menit, dan serapannya diukur pada panjang gelombang maksimum. Dengan mengalurkan absorbansi terhadap konsentrasi, dapat diperoleh kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $y = bx + a$.

Penentuan total senyawa fenolat

Penetapan kandungan total senyawa fenolat ini dilakukan berdasarkan metode Folin-Ciocalteu. Sampel madu sebanyak 0,2 g ditimbang teliti dan dilarutkan dengan metanol 85% dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Campuran tersebut disaring, dan filtratnya dipipet 1,0 mL kemudian ditambahkan dengan reagen folin 0,8 mL, dimasukkan pada labu ukur 10 mL. Setelah itu campuran tersebut dikocok. Selanjutnya ditambahkan Na₂CO₃ 5% sampai tanda batas, sehingga volume total larutan menjadi 10 mL. Larutan didiamkan selama 60

menit, dan serapannya diukur pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Konsentrasi senyawa fenolat dalam sampel dapat ditentukan dengan mengalurkan absorbansi sampel pada kurva kalibrasi.

Penentuan aktivitas antiradikal bebas secara spektrofotometri

a. Pengenceran Sampel madu

Sebanyak 0,08 g madu diencerkan dengan metanol pada labu ukur 10 mL hingga diperoleh konsentrasi madu 8000 ppm. Kemudian campuran tersebut disaring dan filtratnya digunakan untuk perlakuan selanjutnya.

b. Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 0,004 g DPPH dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 100 mL, hingga diperoleh kadar DPPH 0,004% (b/v).

c. Pengujian Aktivitas Antiradikal Bebas

- ***Pengukuran Absorbansi DPPH***
Larutan blanko yang digunakan adalah metanol. Pencatatan dilakukan terhadap absorbansi pada panjang gelombang 497 nm, 517 nm, dan 537 nm.
- ***Pengukuran Aktivitas Antiradikal Bebas Larutan Standar Asam Galat 100 ppm***
Sejumlah 1,0 mL larutan standar 100 ppm dimasukkan ke dalam kuvet lalu ditambahkan 2,0 mL larutan DPPH 0,004%. Campuran tersebut kemudian diaduk rata dengan menggunakan pipet. Pada menit ke-5 dan ke-60 setelah reaksi berlangsung, dilakukan pencatatan absorbansi pada panjang gelombang 497 nm, 517 nm dan 537 nm.
- ***Pengukuran Absorbansi Sampel Madu***
Sejumlah 1,0 mL sampel madu dimasukkan ke dalam kuvet lalu ditambahkan 2,0 mL larutan DPPH 0,004%. Campuran tersebut kemudian diaduk rata dengan menggunakan pipet. Pada menit ke-5 dan ke-60 setelah reaksi berlangsung, dilakukan pencatatan absorbansi pada panjang gelombang 497 nm, 517 nm dan 537 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Kualitatif Senyawa Fenolat

Hasil uji kualitatif dengan pereaksi warna FeCl_3 5% menunjukkan bahwa sampel madu randu dan madu kelengkeng positif mengandung senyawa fenolat, hanya saja warna yang dihasilkan pada madu randu lebih tajam dibandingkan dengan madu kelengkeng. Hasil ini sesuai dengan pengamatan langsung secara visual, di mana madu randu berwarna lebih gelap dibandingkan dengan madu kelengkeng. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian pada madu-madu Australia oleh Bruce (2005), yang menemukan bahwa makin gelap warna madu, umumnya makin tinggi kandungan senyawa fenolatnya.

Penentuan Kadar Total Senyawa Fenolat

Pada penentuan panjang gelombang maksimum dihasilkan puncak serapan pada panjang gelombang 760 nm, sehingga panjang gelombang maksimum tersebut digunakan selanjutnya untuk penentuan kadar total senyawa fenolat.

Hasil dari pengukuran absorbansi sejumlah standar asam galat dengan seri konsentrasi 0-8 ppm pada panjang gelombang 760 nm diperoleh persamaan regresi $y = 0,0948x + 0,0255$ dengan $r = 0,990$, nilai ini menunjukkan bahwa absorbansi dengan konsentrasi

memberikan hubungan yang linier. Penentuan kadar total senyawa fenolat pada sampel madu randu dan madu kelengkeng ditentukan dengan mengalurkan absorbansi sampel pada kurva kalibrasi. Data absorbansi serta kadar total senyawa fenolat dipaparkan pada Tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan bahwa kadar total senyawa fenolat pada madu randu lebih tinggi dibandingkan dengan madu kelengkeng. Hal ini menunjukkan bahwa pada madu yang berbeda menghasilkan kadar total senyawa fenolat yang berbeda, di mana sesuai dengan hasil uji kualitatif yang telah dilakukan yaitu pada madu randu memberikan intensitas warna yang lebih tajam dibandingkan dengan madu kelengkeng.

Penelitian oleh Meda, *et al* 2005, yang meneliti kadar total senyawa fenolat pada madu Burkina Fasan, mendapatkan kadar total senyawa fenolat yaitu dari 325,9 mg GAE/ kg hingga 1147,5 mg GAE/ kg. Hal tersebut menunjukkan bahwa, setiap madu di beberapa negara mengandung total senyawa fenolat yang berbeda-beda. Perbedaan tersebut dipengaruhi oleh sumber nektar dari madu yang berbeda, cuaca dan iklim yang berbeda pula.

Adapun jenis-jenis senyawa fenolat yang menyusun sebagian besar madu di berbagai negara terutama adalah asam galat, asam sinamat, pinokembrin, krisin, dan kumarin (Hussein SZ, 2011).

Tabel 1. Data absorbansi dan kadar total senyawa fenolat

Sampel	Berat (gram)	Ulangan	Absorbansi	Kadar total (mg GAE/kg)	Kadar rata-rata (mg GAE/kg)
Madu randu	0,2240	1	0,285	1221,88	(1375,89 ± 134,10)
		2	0,337	1466,96	
		3	0,331	1438,84	
Madu Kelengkeng	0,2325	1	0,272	1118,28	(1136,49 ± 39,62)
		2	0,286	1181,94	
		3	0,270	1109,25	

Tabel 2. Hasil % Peredaman Absorbansi Sampel Madu dan Standar

Sampel	% Peredaman absorbansi DPPH		Rata-rata % peredaman	
	5 menit	60 menit	5 menit	60 menit
MR 1	60,56%	93,30%	(62,55 ± 4,4407)	(95,39 ± 8,5507)
MR 2	62,69%	95,30%		
MR 3	64,41%	97,56%		
MK 1	42,65%	61,76%	(44,12 ± 1,3433)	(62,00 ± 0,8612)
MK 2	45,28%	61,29%		
MK 3	44,44%	62,96%		
Asam galat	41,03%	92,00%	41,03%	92,00%

Keterangan : MR = Madu Randu, MK = Madu Kelengkeng

Aktivitas Antiradikal Bebas Secara Spektrofotometri

Nilai aktivitas antiradikal bebas pada sampel madu dapat dilihat dari hasil perhitungan persentase peredaman DPPH sebagaimana terlihat pada Tabel 2.

Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa rata-rata persentase peredaman absorbansi DPPH pada menit-60 madu randu yaitu 95,39% sedangkan madu kelengkeng 62,00% sehingga persentase peredaman absorbansi DPPH yang paling besar terdapat pada madu randu. Hal ini menunjukkan bahwa, pada madu randu ataupun madu kelengkeng, persentase peredaman radikal bebasnya berada di atas 50% berarti pada kedua madu tersebut aktif meredam radikal bebas, dimana suatu bahan dikatakan aktif sebagai antiradikal bebas bila persentase peredamannya lebih dari atau sama dengan 50% (Rahmawati, 2004; Djatmiko, *et al.*, 1998).

Selain itu, hasil di atas juga membuktikan bahwa madu dengan jenis bunga yang berbeda memiliki aktivitas antiradikal bebas yang berbeda pula. Perbedaan ini disebabkan karena sumber nektar kedua madu tersebut berbeda sehingga komposisi senyawanya juga berbeda.

Hubungan antara Kadar Total Senyawa Fenolat dengan Aktivitas Antiradikal Bebas

Berdasarkan hasil total senyawa fenolat pada madu randu dan madu kelengkeng dapat dilihat bahwa adanya hubungan yang linier dengan aktivitas antiradikal bebasnya. Dimana, kadar total senyawa fenolat yang tertinggi terdapat pada madu randu yang juga memiliki

nilai aktivitas antiradikal bebas yang tinggi. Begitu sebaliknya pada madu kelengkeng yang memiliki kadar total senyawa fenolat yang rendah dan nilai aktivitas antiradikal yang rendah pula.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Uji kualitatif pada madu randu dan madu kelengkeng memberikan hasil positif adanya senyawa fenolat.
2. Kadar rata-rata total senyawa fenolat pada madu randu adalah sebesar $1375,89 \pm 134,10$ mg GAE/kg, sedangkan kadar rata-rata total senyawa fenolat pada madu kelengkeng adalah $1136,49 \pm 39,62$ mg GAE/kg.
3. Rata-rata % peredaman radikal bebas pada madu randu menit ke-5 didapatkan sebesar $62,55 \pm 4,4407\%$, pada menit ke-60 sebesar $95,39 \pm 8,5507\%$, sedangkan pada madu kelengkeng didapatkan rata-rata % peredaman radikal bebas menit ke-5 adalah $44,12 \pm 1,3433\%$, pada menit ke-60 adalah $62,00 \pm 0,8612\%$. Dan untuk senyawa standar asam galat didapatkan % peredaman radikal bebas pada menit ke-5 sebesar 41,03%, menit ke-60 sebesar 92,00%.
4. Kadar total senyawa fenolat pada madu randu dan madu kelengkeng memiliki

hubungan yang linier dengan masing-masing % peredaman radikal bebasnya. Dimana, kadar total senyawa fenolat yang tertinggi yaitu pada madu randu menghasilkan % peredaman radikal bebas yang tinggi pula, begitu sebaliknya pada madu kelengkeng.

5. Madu randu dan madu kelengkeng mempunyai potensi sebagai sumber antiradikal bebas, sehingga kedua madu tersebut baik untuk kesehatan masyarakat.

Saran

Sesuai hasil penelitian, dapat dikemukakan saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai senyawa fenolat apa yang terdapat pada madu randu dan madu kelengkeng dengan menggunakan LC-MS.
2. Perlu dilakukan uji bioaktivitas lebih lanjut terhadap berbagai sampel madu yang kemungkinan mempunyai aktivitas yang lain seperti antibakteri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Melalui kesempatan ini penulis menyampaikan banyak-banyak terimakasih kepada bapak Prof. Dr. Ir. I. B. Putra Manuaba, M.Phil, bapak Dr. Drs. Manuntung Manurung, M.S, dan bapak Drs. I Made Siaka, M.Sc. (Hons) atas saran dan masukannya, serta pihak-pihak lain yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 2006, Antioksidan Makanan Terbaik, Oktober 14, <<http://www.lampungspot.com/cetak/berita.php>>. 2 Oktober 2011

Ardiansyah, 2011, Antioksidan dan Perannya bagi Kesehatan, *Artikel Iptek*, 12 Oktober 2011

Bruce R D'Arcy, 2005, *Antioxidants in Australian Floral Honeys – Identification of*

health-enhancing nutrient components, RIRDC publication

Djarmiko, Santoso, M. H., dan Wahyu, 1998, *Seminar Nasional Tumbuhan Obat XII*, Fakultas Farmasi Unair, Surabaya

Ferreres, Federico, Andrade, and Paula. 2005, *Flavonoids from Portuguese Heather Honey*, Springer Berlin, Heidelberg, Jerman, *Journals Agricultural and Food Chemistry*, 199 : 32-37

Gheldof, N & Engeseth, NJ., 2002, Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidant in human serum samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (10) : 3050-3055

Gritter, Roy J., Bobbitt J. M., dan Schwarting A. E., 1991, *Pengantar Kromatografi*, Edisi ke-2, Penerbit ITB, Bandung

Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia (Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan)*, a.b. K. Padmawinata dan Iwang Sudiro, edisi ke-2, Jakarta

Hussein SZ, Yusof MK, Makpol S, and Yasmin A., 2011, Antioxidant Capacities and Total Phenolic Content Increase with Gamma Irradiation in two types of Malaysian Honeys, *Journal Molecule*, 16 : 6378-6395

Meda A, Lamien C. E, and Romito M., 2005, Determination of the Total Phenolic, Flavonoid and Proline content in Burkina Fasan Honey as well as their Radical Scavenging Activity, *Journal Food Chemistry*, 91 : 571-577

Oka Adi Parwata, I M., Ratnayani, K., dan Ana, 2008, Aktivitas Antiradikal bebas serta Kadar Beta Karoten pada Madu Randu dan Madu Kelengkeng, *Jurnal Kimia*, 4 (1) : 54-62

Rahmawati, D., 2004, Uji Antiradikal Bebas Senyawa Golongan Flavonoid pada Ekstrak Metanol Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.) secara Spektroskopi, *Skripsi*, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Udayana, Denpasar