

# KANDUNGAN KOMPONEN FENOLAT, KADAR FENOLAT TOTAL, DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MADU DARI BEBERAPA DAERAH DI JAWA DAN SUMATERA

## Study of Phenolic Compounds, Total Phenolic, and Antioxidant Activities of Monofloral Honeys from Some Areas in Java and Sumatera

Ichda Chayati<sup>1</sup>, Isnatin Miladiyah<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Fakultas Teknik Universitas Negeri Yogyakarta  
Kampus Karangmalang, Yogyakarta  
<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia Yogyakarta  
Jl. Kaliurang Km 14.5 Sleman 55584 Yogyakarta  
\*email: ichdach@yahoo.co.id

Submitted: April 22, 2014, revised: November 29, 2014, approved: December 11, 2014

### ABSTRACT

**Background.** Many diseases resulted from degenerative processes which can be inhibited by antioxidant systems. Honey is one of food with antioxidant activity. **Objective.** This study aims to investigate antioxidant activities of several types of monofloral honey from Java and Sumatera. **Method.** A laboratory experimental study, conducted on 4 types of floral honeys: coffee, palm trees, cottonwoods and rambutan. Determination of phenolic compounds was performed with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and measurement of total phenolic contents performed with Folin-Ciocalteu's reagent. Antioxidant activity was conducted in two ways, those were by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method and linoleic acid peroxidation method using butylated hydroxytoluene (BHT) as a standard. Data were analyzed using Analysis of variance (Anova) and continued with Duncan's multiple range test (DMRT). **Result.** Four types of Javanese and Sumateranese honeys contained some phenolic compounds. Those are chlorogenic acid, caffeic acid,  $p$ -coumaric acid, ferulic acid, pinobanksin, quercetin, luteolin, pinocembrin and chrysin while the dominant phenolic compound varies between honeys. Total phenolic contents from four types of honey were between 2.000 to 4.400 ppm. The highest phenolic content was in honey from cottonwoods, but the best antioxidant activity was found in honey from coffee. Antioxidant activities were found in honey which come from the following order: coffee, cottonwoods, palm trees, and rambutan honey. Antioxidant activities did not correlated with total phenolic content. **Conclusion.** Javanese and Sumateranese honey contained nine active substances that varies in total phenolic contents. The best antioxidant activity was found in coffee honey, and this activity did not correlated with its total phenolic contents.

**Keywords:** antioxidant, monofloral honey, phenolic

### ABSTRAK

**Latar Belakang.** Banyak penyakit yang dapat timbul karena proses degeneratif yang dapat diperlambat dengan adanya sistem antioksidan. Madu merupakan salah satu bahan pangan yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan berbagai jenis madu dari beberapa daerah di Jawa dan Sumatera. **Metode.** Penelitian laboratorium terhadap empat jenis madu yaitu madu bunga kopi, sawit, randu dan rambutan. Penentuan kandungan komponen fenolat dilakukan dengan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dan pengukuran kadar fenolat total dilakukan dengan reagen folin-ciocalteu. Aktivitas antioksidan diukur berdasarkan peredaman radikal bebas 2,2-diphenyl-

1-picrylhydrazyl (DPPH) dan retensi dalam sistem asam linoleat dengan standar *butylated hydroxytoluene* (BHT). Analisis statistik dilakukan dengan *Analysis of varian* (Anova) dilanjutkan *Duncan's multiple range test* (DMRT). Korelasi antar analisis dilakukan dengan uji korelasi *Pearson*. **Hasil.** Keempat jenis madu yang diteliti mempunyai kandungan fenolat berupa asam klorogenat, asam kafeat, asam *p-koumarat*, asam ferulat, *pinobanksin*, *quercetin*, *luteolin*, *pinocebrin* dan *chrysin*. Komponen fenolat dominan untuk tiap madu bervariasi tergantung jenis madunya. Kadar fenolat total pada keempat jenis madu antara 2.000 sampai 4.400 ppm. Kandungan fenolat total paling tinggi terdapat pada madu randu, namun aktivitas antioksidan paling tinggi ditunjukkan oleh madu kopi. Urutan besarnya aktivitas antioksidan berturut-turut adalah madu kopi, madu randu, madu sawit, dan madu rambutan. Aktivitas antioksidan yang tinggi tidak berbanding lurus dengan kandungan fenolat totalnya. **Kesimpulan.** Madu dari beberapa daerah di Jawa dan Sumatera mengandung sembilan senyawa aktif, dengan kadar fenolat yang bervariasi. Aktivitas antioksidan tertinggi terdapat pada madu bunga kopi dan aktivitas ini tidak berkorelasi dengan kandungan fenolat totalnya.

**Kata kunci:** antioksidan, fenolat, madu monoflora

## PENDAHULUAN

Saat ini diketahui bahwa patogenesis dalam kejadian penyakit-penyakit degeneratif misalnya, kanker, aterosklerosis, diabetes mellitus, hipertensi, proses penuaan, dan penyakit Alzheimer terjadi karena adanya kerusakan jaringan akibat ketidakseimbangan antara pembentukan radikal bebas dalam tubuh dengan sistem *scavenger* ("pemakan"). Radikal bebas (*Reactive Oxygen Species* = ROS) ini dibentuk baik secara alami dalam tubuh berupa anion superoksid, radikal hidroksi, dan hidrogen peroksida, maupun berasal dari luar tubuh.<sup>1</sup> Pada dasarnya sel-sel tubuh makhluk hidup mempunyai mekanisme pertahanan untuk mencegah produksi radikal bebas dan kerusakan oksidatif ini, berupa antioksidan baik alami maupun berupa suplemen. Seringkali mekanisme pertahanan alami ini terganggu karena berbagai proses patologis sehingga tidak dapat berfungsi, dan pada kondisi seperti inilah dibutuhkan suplemen antioksidan untuk memutus reaksi oksidatif tersebut.<sup>2</sup>

Saat ini, penelitian tentang antioksidan menarik perhatian karena bukti mutakhir menunjukkan bahwa antioksidan memegang peran penting dalam kesehatan manusia. Konsumsi antioksidan dikaitkan dengan aktivitas penghambatan terhadap kanker, jantung koroner, radang, proses degenerasi saraf, dan penuaan.<sup>3,4</sup> Salah satu sumber antioksidan yang telah dikenal adalah madu. Konsumsi madu dikaitkan dengan peningkatan aktivitas antioksidan dalam tubuh, baik pada manusia maupun hewan.<sup>5,6,7</sup> Selain antioksidan, madu juga memiliki aktivitas farmakologis lain, diantaranya sebagai antibakteri,<sup>8,9,10</sup> antimutagenik dan antitumor,<sup>11,12</sup> antiinflamasi,<sup>13,14</sup> penurun kadar kolesterol,<sup>15</sup> dan vasodilator.<sup>16,17</sup>

Aktivitas antioksidan madu dapat bervariasi, tergantung pada sumber bunganya. Faktor eksternal yang dapat berpengaruh di antaranya adalah musim, lingkungan, dan cara pengolahannya.<sup>18,19,20</sup> Banyak penelitian telah dilakukan tentang kandungan fenolat dan aktivitas antioksidan dalam madu, tetapi hampir semua-

nya dari luar negeri, misalnya madu dari Spanyol,<sup>21</sup> Venezuela,<sup>22</sup> Rumania,<sup>23</sup> Chili,<sup>24</sup> Inggris, Wales, Selandia Baru,<sup>25</sup> Australia,<sup>26</sup> dan Amerika Serikat. Sampai saat ini masih sedikit penelitian yang mengungkap tentang kandungan fenolat dan aktivitas antioksidan madu asli Indonesia. Beberapa jenis madu asal Indonesia yang pernah diteliti di antaranya adalah madu randu dan kelengkeng.<sup>27,28</sup> Kedua jenis madu ini diketahui mengandung senyawa fenolat yang cukup tinggi dan mempunyai aktivitas antioksidan, namun tidak diketahui daerah asal madu yang diteliti. Penelitian ini diharapkan mengungkap kandungan fenolat, kadar fenolat total, serta aktivitas antioksidan madu dari beberapa daerah di Jawa dan Sumatera. Ke depan, diharapkan informasi ini memberikan kemungkinan pengembangan madu sebagai minuman kaya antioksidan.

## METODE

Penelitian dilakukan di dua lokasi, yaitu laboratorium biokimia Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk analisis komponen fenolat, dan Laboratorium Chem-Mix Pratama, Bantul, Yogyakarta untuk analisis fenolat total dan aktivitas antioksidan (metode peredaman *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*/DPPH dan metoda sistem asam linoleat). Waktu penelitian adalah antara bulan Juli sampai Oktober 2009.

## Sampel

Sampel madu yang digunakan dalam penelitian ini ada empat jenis yaitu madu kopi dari Bawen Ungaran, madu sawit dari Palembang, madu randu dari Pati, dan madu rambutan dari Magelang. Madu diambil dari peternak lebah di

tiap lokasi. Selama transportasi, madu dikemas dalam botol bening, ditutup rapat, dan bagian luar dibungkus kertas koran untuk melindungi dari sinar matahari. Madu disimpan di suhu ruang sampai saat analisis. Madu tersebut berasal dari dua kali masa panen yang berbeda, dan analisis dilakukan secara terpisah dengan masing-masing sebanyak tiga ulangan.

## Ekstraksi Komponen Fenolat

Ekstraksi dilakukan menurut penelitian sebelumnya.<sup>5</sup> Sebanyak 60 gram *resin* amberlite XAD-2, ukuran pori 9 nm, ukuran partikel 0.3-1.2 mm direndam dalam metanol selama 10 menit, setelah itu metanol dibuang dan diganti akuades. Campuran diaduk, dibiarkan selama 5-10 menit dan dimasukkan ke dalam kolom kaca 50x2 cm. Sebanyak 25-50 g madu dilarutkan dalam 250 mL akuades, dan pH larutan diatur menjadi 2.0 dengan penambahan HCl pekat. Larutan disaring pelan-pelan melalui kolom *resin* amberlite XAD-2. Kolom dicuci dengan 250 mL air asam (pH 2 dengan HCl) dan selanjutnya dibilas dengan 300 mL akuades netral untuk menghilangkan semua gula dan komponen polar lain dari madu. Komponen fenol dilusi dari *sorbent* dengan 250 mL metanol. Ekstrak metanol dipekatkan secara vakum pada suhu 40° C dalam *rotary evaporator Buchi*. Residu dilarutkan dalam 5 mL akuades dan diekstraksi tiga kali dengan 5 mL dietil eter. Ekstrak dicampurkan dan pelarut diuapkan dengan nitrogen. Ekstraksi dilakukan dua kali untuk tiap sampel, standar deviasinya harus kurang dari 5 persen. Ekstrak kering disimpan dalam lemari pendingin sampai dilakukan analisis.

### Karakterisasi Komponen Fenolat

Karakterisasi komponen fenolat dilakukan dengan alat *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).<sup>29</sup> Pengaturan HPLC yang digunakan adalah: pompa eluen HPLC waters 1525 binary, detektor UV L-7400 dan detektor massa waters micromass ZQ-2000. Komponen fenolat madu dipisahkan dalam kolom analisis sinergi MAX-RP, diameter dalam 250x4.6 mm, diisi dengan fase stasioner Luna C18, ukuran partikel 4 µm. Gradien biner linier yang digunakan adalah pada kecepatan 0.8 mL/menit. Waktu *running* HPLC lebih dari 40 menit. Fase mobil biner terdiri dari pelarut A (air ultra murni dengan metanol 10 persen dan asam asetat 1 persen) dan pelarut B (metanol 100 persen). Elusi dari kolom dicapai dengan gradien linier sebagai berikut: 0-30 menit B naik dari 30 persen menjadi 100 persen dan dijaga konstan sampai 33 menit; 33-36 menit B turun kembali menjadi 30 persen dan dijaga konstan sampai 40 menit. Detektor Ultra Violet (UV) diatur pada panjang gelombang 254 nm.

Ekstrak kering madu dilarutkan dalam metanol sehingga diperoleh larutan 0.5 persen (b/v), disaring dengan filter 0.45 µm sebelum analisis. Komponen fenolat diidentifikasi dengan membandingkan waktu retensinya. Konsentrasi komponen yang teridentifikasi dalam ekstrak ditunjukkan oleh unit luas puncak.<sup>29</sup>

### Pengukuran Kadar Fenolat Total

Penentuan kadar fenolat total dilakukan dengan teknik kolorimetri berdasarkan reagen fenol folin-ciocalteu.<sup>22</sup> Sebanyak 100 µL ekstrak ditambahkan akua-des 500 µL dan dicampur dengan 1.5 mL larutan C {25 mL larutan A [1 persen (b/v) SDS, 0.4 persen (b/v) NaOH, 2 persen

(b/v) sodium karbonat, dan 0.16 persen (b/v) sodium dan potasium tartrat] dengan 250 µL 4 persen (b/v) CuSO<sub>4</sub>}. Sampel ditempatkan dalam *waterbath* 37 °C selama 10 menit. Selanjutnya, reagen folin-ciocalteu yang telah dilarutkan dengan perbandingan 1:2 ditambahkan ke dalam campuran reaksi dan inkubasi dilanjutkan selama 10 menit. Sebagai standar digunakan fenol dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 750 nm.

### Pengukuran Aktivitas Antioksidan Metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Aktivitas peredaman (kemampuan mentransfer H/e) melawan radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) diukur sesuai penelitian sebelumnya<sup>30</sup> dengan modifikasi. Sebanyak 2 mL larutan DPPH dicampur dengan 5 µL madu atau larutan ekstrak fenolat dalam metanol (10 mg/mL) dalam mikro kuvet. Sampel blanko mengandung metanol dan DPPH dalam jumlah yang sama. Absorbansi DPPH yang tersisa diukur setelah 16 menit, dengan panjang gelombang 515 nm. Ulangan analisis dilakukan sebanyak 3 kali. Aktivitas peredaman radikal dihitung dengan rumus  $I = [(AB - AA) / AB] \times 100$ ; dimana I = penghambatan DPPH, %; AB = penyerapan sampel blanko (t=0 menit); AA = penyerapan sampel larutan madu yang diuji pada akhir reaksi (t=16 menit).

### Pengukuran Aktivitas Antioksidan dalam Sistem Asam Linoleat

Pengukuran aktivitas antioksidan ini dilakukan dengan metode *ferric thiocyanate*, menggunakan *butylated hydroxytoluene* (BHT) sebagai standar.<sup>31</sup> Sebanyak 4 mg sampel dalam 99.5 persen etanol dicampur dengan 2.5 persen asam

linoleat dalam 99.5 persen etanol (4.1 mL), 0.05 M buffer fosfat (pH 7; 8 mL) dan air suling (3.9 mL). Campuran diletakkan dalam *screw cap container* dan dibiarkan di tempat gelap pada suhu 40 °C. Diambil sebanyak 0.1 mL larutan tersebut dan ditambahkan ke dalamnya etanol 75 persen (9.7 mL) dan amonium tiosianat 30 persen (0.1 mL), dan campuran dibiarkan selama 3 menit. Setelah 3 menit, ditambahkan *ferrous chloride* 0.02 M dalam asam hidroklorat 3.5 persen (0.1 mL). Absorbansi warna merah menunjukkan besarnya kandungan peroksida. Pengukuran absorbansi dilakukan setiap hari sesuai dengan waktu penyimpanan (masa induksi), pada panjang gelombang 500 nm. Kontrol dan standar dibuat dengan prosedur yang sama, di mana kontrol hanya menggunakan asam linoleat dan standar berupa 4 mg BHT.

### Analisis Data

Setiap data yang diperoleh dianalisis dengan *Analysis of varian* (Anova) satu arah untuk mengetahui pengaruh jenis sampel terhadap masing-masing analisis, dan dilanjutkan dengan *Duncan's multiple range test* (DMRT). Korelasi antar perlakuan (hubungan antara komponen fenolat dengan kadar fenolat total dan aktivitas antioksidan, dan hubungan fenolat total dengan aktivitas antioksidan) diuji dengan korelasi bivariat *Pearson*. Program komputer yang digunakan adalah *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) 12.0 for windows.

## HASIL

### Kandungan Komponen Fenolat

Berdasarkan hasil kromatogram dari keempat sampel madu pada panjang gelombang 254 nm,<sup>29</sup> kemungkinan jenis komponen fenolat dalam madu dan kadarnya dapat dilihat dalam Tabel 1.

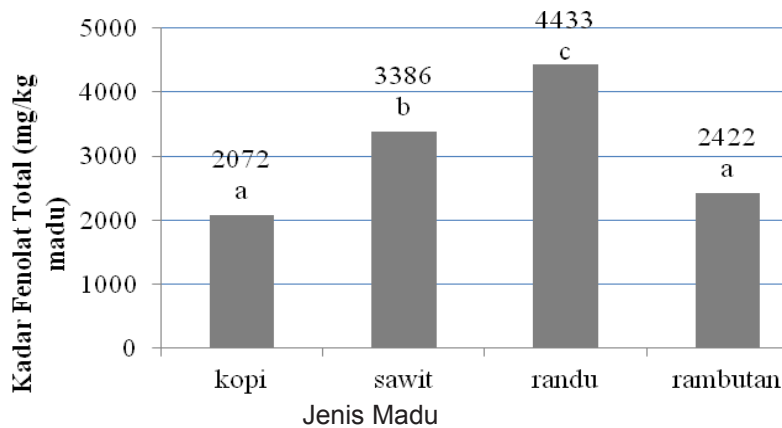
**Tabel 1.** Komponen Fenolat dalam Madu

No	Waktu Retensi (menit)	Komponen Fenolat	Kadar Fenolat ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) dalam Madu			
			Kopi	Sawit	Randu	Rambutan
1	5,1	Belum diketahui	26,27	63,36	36,92	26,91
2	5,6	Belum diketahui	-	-	3.501,53	-
3	6,4	Asam klorogenat	2.521,1	721,86	4.374,5	718,59
4	7,2 + 8,1	Asam kafeat	522,77	968,58	4.023,1	801,12
5	9,3	Belum diketahui	127,11	214,77	41,92	-
6	10,6	Asam p-koumarat	63,53	145,02	257,38	100,9
7	11,2	Asam ferulat	99,98	431,41	194,59	242,17
8	13,2 + 14,1	Pinobanksin	1.967,7	2.123,2	1.435	3.296,3
9	18,2	Quersetin	158,66	1.285,7	256,6	418,1
10	23,0	Luteolin	475,7	439,65	73,39	1.962,7
11	33,7	Belum diketahui	-	457,95	-	-
12	37,3	Pinocembrin	672,29	274,2	339,65	13,971
13	42,7	Chrysin	527,74	258,82	312,42	412,67
14	47,7	Belum diketahui	-	93,74	312,42	-

Tabel 1 di atas menunjukkan komponen fenolat yang dominan untuk masing-masing jenis madu, yaitu madu kopi didominasi oleh asam klorogenat dan pinobanksin, madu sawit adalah pinobanksin dan quersetin, madu randu adalah asam klorogenat dan asam kafeat, dan untuk madu rambutan didominasi oleh pinocembrin dan pinobanksin.

**Kadar Fenolat Total**

Hasil pengukuran kadar fenolat total dengan reagen folin-ciocalteu dapat dilihat dalam Gambar 1. Gambar ini menunjukkan bahwa dari keempat jenis madu, kadar fenolat tertinggi terdapat pada madu randu, sedangkan yang terendah adalah madu kopi.



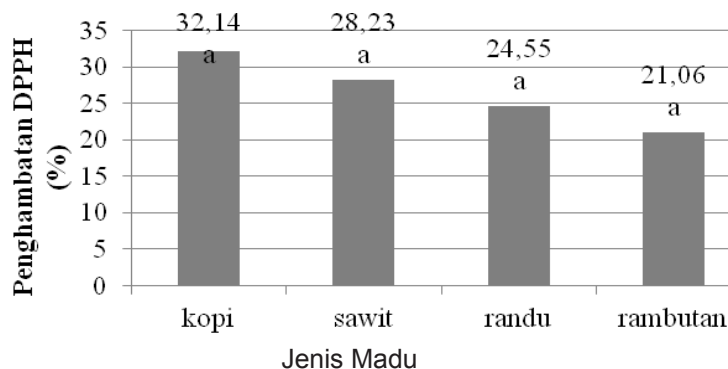
**Gambar 1.** Kadar Fenolat Total

Ket : a, b, c huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada taraf signifikansi 5 persen

**Aktivitas Antioksidan Metode DPPH**

Pada pengujian cara ini, semakin tinggi persen peredaman radikal bebas menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih besar. Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dapat dilihat da-

lam Gambar 2. Tampak bahwa aktivitas antioksidan tertinggi terdapat pada madu kopi, meskipun jika dibandingkan dengan ketiga jenis madu lain, secara statistik perbedaan ini tidak bermakna.



**Gambar 2.** Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Ket: a huruf yang sama, menunjukkan bahwa tidak ada beda nyata antar jenis madu



**Aktivitas Antioksidan dalam Sistem Asam Linoleat**

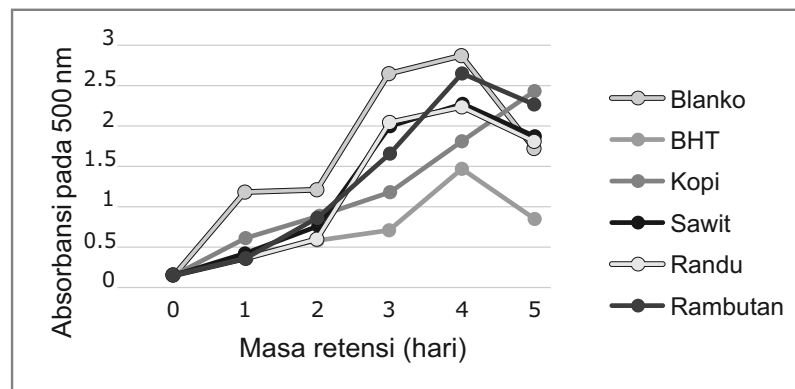
Hasil pengukuran berupa absorbansi, di mana pengamatan dilakukan setiap hari selama lima hari sehingga tampak masa retensi/ penyimpanan madu. Besar absorbansi berbanding lurus dengan

kadar peroksida yang terbentuk karena proses oksidasi. Hasil ditampilkan dalam tabel besarnya absorbansi dan grafik absorbansi versus waktu (hari). Hasil pengukuran dan perbandingannya dengan standar (BHT) dapat dilihat dalam Tabel 2 dan Gambar 3.

**Tabel 2.** Angka Peroksida Asam Linoleat selama Masa Retensi dengan Penambahan Berbagai Jenis Madu

Sampel	Angka Peroksida pada Penyimpanan Hari ke-					
	0	1	2	3	4	5
Blanko	0.074	1.085 <sup>c</sup>	1.122 <sup>c</sup>	2.567 <sup>e</sup>	2.800 <sup>d</sup>	1.637 <sup>b</sup>
BHT	0.074	0.339 <sup>ab</sup>	0.510 <sup>a</sup>	0.626 <sup>a</sup>	1.391 <sup>a</sup>	0.759 <sup>a</sup>
Kopi	0.074	0.517 <sup>b</sup>	0.780 <sup>b</sup>	1.086 <sup>b</sup>	1.720 <sup>a</sup>	2.346 <sup>d</sup>
Sawit	0.074	0.325 <sup>ab</sup>	0.656 <sup>ab</sup>	1.911 <sup>d</sup>	2.185 <sup>bc</sup>	1.791 <sup>bc</sup>
Randu	0.074	0.261 <sup>a</sup>	0.511 <sup>a</sup>	1.964 <sup>d</sup>	2.147 <sup>b</sup>	1.722 <sup>bc</sup>
Rambutan	0.074	0.274 <sup>a</sup>	0.781 <sup>b</sup>	1.577 <sup>c</sup>	2.566 <sup>cd</sup>	2.178 <sup>cd</sup>

Ket : <sup>a,b,c</sup> huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada taraf signifikansi 5 persen



**Gambar 3.** Aktivitas Antioksidan dalam Sistem Asam Linoleat

Absorbansi paling rendah terdapat pada kontrol BHT, sedangkan yang paling mendekati nilai absorbansi BHT adalah madu kopi. Absorbansi blanko, madu bunga sawit, randu, dan rambutan, seluruhnya jauh lebih besar daripada BHT dan madu kopi ( $p < 0.05$ ). Dilihat dari waktu retensi penyimpanannya, blanko, madu bunga sawit, randu, rambutan, dan BHT

mempunyai waktu induksi empat hari, sedangkan madu kopi waktu induksinya lebih dari empat hari (Gambar 3). Pada hari keempat, semua bahan yang diuji, kecuali madu kopi, absorbansinya sudah maksimal dan pada hari kelima mulai menurun; sedangkan pada madu kopi, sampai hari kelima masih menunjukkan kenaikan.

### Korelasi Antar Analisis

Hasil uji korelasi bivariat *Pearson* antara kadar fenolat total dengan aktivitas antioksidan metoda DPPH sebesar 0.335 ( $p>0.05$ ), antara kadar fenolat total dengan aktivitas antioksidan berdasarkan angka peroksida sebesar -0.139 ( $p<0.05$ ), antara aktivitas antioksidan metode DPPH dengan angka peroksida sebesar -0.843 ( $p<0.05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada hubungan antara kandungan fenolat total dengan aktivitas antioksidan madu dan semakin tinggi aktivitas antioksidan metode DPPH semakin rendah kadar peroksidanya.

### PEMBAHASAN

Jenis komponen fenolat yang dominan untuk setiap madu, yaitu madu kopi didominasi oleh asam klorogenat dan pinobanksin, madu sawit adalah pinobanksin dan quersetin, madu randu adalah asam klorogenat dan asam kafeat, dan untuk madu rambutan didominasi oleh pinocembrin dan pinobanksin. Madu dalam penelitian ini diperkirakan mengandung minimal sembilan jenis komponen fenolat, yaitu asam klorogenat, asam kafeat, asam *p*-koumarat, asam ferulat, *pinobanksin*, quersetin, *luteolin*, *pinocembrin*, dan *chrysin* (Tabel 1). Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang pernah dilakukan terhadap madu dari Spanyol, dengan kandungan flavonoid utamanya adalah *flavanon*, *pinobanksin*, *pinocembrin*, dan flavon *chrysin*, namun penelitian tersebut tidak mengukur kandungan asam fenolatnya.<sup>21</sup> Hasil yang didapat dalam penelitian ini juga sejalan dengan penelitian tentang madu Australia, yang mengandung sembilan jenis komponen fenolat dan asam galat,<sup>26</sup> sedangkan madu dalam penelitian ini tidak

mengandung asam galat. Dapat dilihat di atas bahwa dalam penelitian ini jenis komponen fenolat dominan untuk setiap madu berbeda-beda. Perbedaan kandungan fenolat ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jenis bunga dan letak geografisnya.<sup>18,19,20</sup>

Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa fenolat, terutama jenis flavonoid, mampu berperan sebagai antioksidan yang mempengaruhi radikal bebas oksigen dan peroksidasi lemak, dimana keduanya berperan dalam kondisi patologis seperti arteriosklerosis, kanker, dan peradangan kronis. Asam kafeat dan ferulat dapat mencegah stres foto-oksidatif pada kulit. Kandungan senyawa fenolat alami asam *p*-koumarat mampu melindungi hewan melawan kerusakan oksidatif jantung yang dipicu oleh doxorubicin. Potensi pelindung dari asam *p*-koumarat kemungkinan karena kapasitas pemerangkap radikal bebasnya.<sup>32</sup>

Kadar fenolat total dalam madu berturut-turut dari yang paling tinggi adalah madu randu, madu sawit, madu rambutan, dan madu kopi (Gambar 1). Kadar fenolat total ini sering dihubungkan dengan aktivitas antioksidan madu. Di antara komponen fenolat tersebut, terdapat flavonoid yang berasal dari propolis dan asam fenolat yang berasal dari nektar. Komponen fenolat adalah pemerangkap radikal peroksil yang efisien karena struktur molekulnya, termasuk cincin aromatik dengan gugus hidroksil yang mengandung hidrogen mobil.<sup>22</sup> Keempat jenis madu yang diteliti dalam penelitian ini mempunyai kadar fenolat total antara 2.000-4.400 ppm (mg/kg madu). Angka ini jauh lebih besar daripada dalam madu Venezuela yang mempunyai kadar fenolat total sekitar 125 mg/L.<sup>22</sup> Hasil ini menunjukkan bahwa ke-



empat jenis madu kemungkinan mempunyai aktivitas yang tinggi, sehingga perlu dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antioksidannya.

Aktivitas antioksidan dengan metode penghambatan terhadap DPPH paling baik didapatkan pada madu bunga kopi (Gambar 2), namun ternyata perbedaan dengan madu lain tidak bermakna secara statistik. Hal ini kemungkinan disebabkan standar deviasi yang berbeda sehingga hasil yang diperoleh tidak berbeda signifikan. Penyebab perbedaan standar deviasi ini adalah karena sampel madu diambil dari dua masa panen yang berbeda. Kahkonen *et al*<sup>33</sup> menemukan bahwa madu yang diambil dari masa panen yang sama standar deviasinya kecil (6%), sedangkan madu dari masa panen yang berbeda ternyata standar deviasinya tiga kali lebih besar (19%). Selain karena pengaruh masa panen, perbedaan aktivitas antioksidan madu dapat dipengaruhi oleh tingkat kematangan madu saat dipanen dan iklim.<sup>34</sup>

Madu dari berbagai negara lain menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap DPPH yang bervariasi, misalnya berbagai macam madu dari Polandia mempunyai persentase penghambatan DPPH yang bervariasi dari 23.81–100 persen,<sup>35</sup> madu dari Algeria sebesar  $39.57 \pm 4.18$  persen,<sup>36</sup> madu di daerah Tualang Malaysia sebesar  $41.30 \pm 0.78$  persen,<sup>37</sup> sedangkan madu dari Bangladesh sebesar 33.6–97.5 persen.<sup>38</sup> Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan daerah dan negara menentukan daya antioksidan madu. Perbedaan ini dapat dipengaruhi oleh letak geografis, lingkungan, dan musim panennya.

Tabel 2 dan Gambar 3 menunjukkan hasil pengukuran aktivitas antioksidan dalam sistem asam linoleat, yaitu dengan

menilai absorbansinya. Nilai absorbansi berbanding lurus dengan kadar peroksida di dalamnya. Peroksida (hidroperoksida) merupakan produk oksidasi primer yang tidak stabil dan secara bertahap akan didekomposisi menjadi produk sekunder (misalnya alkan, alkohol, dan aldehid) yang menimbulkan bau tengik. Gambar 3 menunjukkan bahwa absorbansi untuk blanko, BHT, madu randu, madu sawit, dan madu rambutan mencapai puncak pada hari keempat dan hari berikutnya menurun. Hal ini berarti bahwa pada hari keempat, kadar peroksida blanko, BHT, madu randu, madu sawit, dan madu rambutan mencapai maksimal dan mulai mengalami dekomposisi menjadi senyawa sekunder lainnya. Sementara untuk madu kopi, absorbansi pada hari kelima masih meningkat dan puncak belum tercapai. Hal ini menunjukkan bahwa dekomposisi produk primer oksidasinya rendah, namun belum diketahui kapan mulai terjadi proses dekomposisi ini.

Selain itu, untuk mengetahui bahwa sudah mulai terjadi dekomposisi produk primer oksidasi, dapat dilakukan pengukuran kadar produk sekunder oksidasi (alkan, alkohol, atau aldehid). Salah satu caranya adalah dengan mengukur kadar malondialdehid (MDA) dengan metode *Thiobarbituric Acid* (TBA).<sup>31</sup> Dengan mengetahui kadar MDA, maka dapat diketahui dengan pasti kapan mulai terjadi proses dekomposisi peroksida menjadi produk sekunder oksidasi.

Hasil *Anova* aktivitas antioksidan dalam sistem asam linoleat menunjukkan bahwa untuk madu kopi dan BHT tidak berbeda signifikan, sehingga dapat dikatakan bahwa aktivitas antioksidan madu kopi sebanding dengan standar BHT. Apabila diurutkan, maka aktivitas antioksidan

dari yang paling tinggi adalah madu kopi, madu randu, madu sawit, dan madu rambut.

Tidak ada korelasi yang nyata antara kadar fenolat total dengan aktivitas antioksidan metoda DPPH dan antara kadar fenolat total dengan aktivitas antioksidan dalam sistem asam linoleat, sedangkan antara aktivitas antioksidan metoda DPPH dan sistem asam linoleat adalah berkorelasi negatif sangat nyata. Korelasi negatif ini terjadi karena aktivitas antioksidan tertinggi untuk metode peredaman DPPH adalah yang persentasenya tertinggi, sedangkan untuk sistem asam linoleat adalah yang nilainya terendah. Dari korelasi antar analisis ini diketahui bahwa kadar fenolat total tidak berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan dalam madu, sedangkan semakin tinggi aktivitas antioksidannya berdasarkan penghambatan DPPH, maka semakin rendah kadar peroksidanya.

Penelitian ini memberikan hasil yang berbeda dengan penelitian lain yang menemukan bahwa aktivitas antioksidan madu berbanding lurus dengan kadar fenolat totalnya.<sup>39,40,41</sup> Kemungkinan penyebab hal ini adalah terdapatnya komponen antioksidan lain selain komponen fenolat total. Meskipun komponen fenolat adalah komponen utama yang berperan pada efek antioksidan dalam madu, namun komponen non-fenolat seringkali juga terlibat.<sup>42</sup> Aktivitas antioksidan dari total fase air asam dan air netral, fase metanol, dan fase air setelah ekstraksi eter lebih rendah daripada kapasitas antioksidan madu secara keseluruhan. Kemungkinan, komponen antioksidan dalam madu mempunyai beberapa interaksi yang sinergis. Penelitian lain menunjukkan bahwa pH (tingkat keasaman), absorbansi, konduk-

tivitas elektrik, dan kadar polifenol total madu berkorelasi kuat dengan penghambatan DPPH. Demikian juga korelasi antara penghambatan DPPH dengan asam amino juga tinggi, lebih tinggi daripada korelasinya dengan kandungan polifenol. Hal ini menunjukkan bahwa komposisi asam amino dalam madu dapat digunakan sebagai indikator kapasitas antioksidannya.<sup>21</sup>

Komponen fenolat dalam madu dapat berperan pada beberapa mekanisme yang telah disebutkan. Meskipun demikian, kadar fenolat tunggal atau komponen lain dalam madu bisa jadi terlalu rendah untuk mempunyai peran yang nyata, sehingga kapasitas antioksidan total dalam madu merupakan hasil dari aktivitas kombinasi dan interaksi dari sejumlah komponen lain, misalnya fenolat, peptida, asam organik, enzim, produk reaksi Maillard, dan komponen minor lain.<sup>22</sup> Untuk memastikan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang kandungan komponen-komponen antioksidan lain dalam madu selain fenolat total.

## KESIMPULAN

Komponen fenolat yang terdapat dalam madu adalah asam klorogenat, asam kafeat, asam *p*-kumarat, asam ferulat, *pinobanksin*, *quersetin*, *luteolin*, *pinocembrin*, dan *chrysin*. Kadar fenolat total dalam madu berkisar antara 2.000 sampai 4.400 ppm. Aktivitas antioksidan madu berdasarkan daya penghambatan terhadap DPPH dan dalam sistem asam linoleat antara terdapat pada madu bunga kopi. Urutan aktivitas antioksidan dari yang paling besar adalah madu kopi, madu randu, madu sawit, dan madu rambut. Aktivitas antioksidan madu tidak berkorelasi dengan kadar fenolat totalnya.

## SARAN

Beberapa penelitian lanjutan yang perlu dilakukan untuk perbaikan penelitian ini adalah: (1) Pengukuran aktivitas antioksidan metode peredaman DPPH dalam beberapa konsentrasi madu, sehingga dapat diketahui nilai konsentrasi penghambatan minimalnya (*Inhibitory Concentration/IC<sub>50</sub>*); (2) Penelitian dalam jangka waktu yang lebih panjang untuk mengetahui kapan puncak absorpsi dalam sistem asam linoleat tercapai dan kapan mulai menurun, karena hal ini menunjukkan kadar peroksida maksimal dan terjadinya proses dekomposisi produk primer oksidasi; (3) Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode lain misalnya *Thiobarbituric Acid* (TBA) untuk mengukur kadar malondialdehid (MDA), suatu produk sekunder hasil oksidasi. Hal ini mengingat mekanisme kerja suatu senyawa antioksidan adalah dapat bekerja pada penghambatan produk oksidasi tahap primer atau sekunder; dan (4) Faktor yang mempengaruhi aktivitas antioksidan dalam madu selain komponen fenolat, misalnya komposisi asam aminonya.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilakukan dengan sponsor dana dari Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional *Batch* IV Nomor: 621/SP2H/PP/DP2M/VII/2009.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Halliwell B. Antioxidants Defense Mechanisms: From The Beginning to The End. *Free Radical Res.* 1999; 31:261-72.
2. Robak J, Marcinkiewicz E. Scavenging of Reactive Oxygen Species as The Mechanism of Drug Action. *Pol J Pharmacol Pharm.* 1995; 47:89-98.
3. Irshad M, Chaudhuri PS. Oxidant-Antioxidant System: Role and Significance in Human Body. *Indian J Exp Biol.* 2002; 40:1233-9.
4. Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *JAPI.* 2004; 52:794-804.
5. Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Source. *J Agric Food Chem.* 2002; 50:5870-7.
6. Schramm D, Karim M, Schrader HR, Holt RR, Cardetti M, Keen CL. Honey with High Level Antioxidants can Provide Protection to Healthy Human Subjects. *J Agric Food Chem.* 2003; 51:1732-35
7. El-Saleh SC. Protection by Natural Honey Against Hyperhomocysteinemia in Rats. *Vasc Dis Prev.* 2006; 3(4):313-8.
8. Velazquez C, Navarro M, Acosta A, Angulo A, Dominguez Z, Robles R, et al. Antibacterial and Free-radical Scavenging Activities of Sonoran Propolis. *J of Appl Mic,* 2007; 103:1747-56.
9. George NM, Cutting KF. Antibacterial Honey (Medihoney<sup>TM</sup>): In-Vitro Activity Against Clinical Isolates of MRSA, VRE, and Other Multiresistant Gram-negative Including *Pseudomonas aeruginosa*. *Wound.* 2007; 19(9):231-6.
10. Basson NJ, Grobler SR. 2008. Antimicrobial Activity of Two South African Honeys Produced from Indigenous *Leucosperm Cordifolium* and *Erica* Species on Selected Micro-

- organisms. *BMC Complement and Alt Med*. 2008; 8:41.
11. Wang XH, Andrae L, Engeseth NJ. Antimutagenic Effect of Various Honeys and Sugars Against Trp-p-1. *J Agric Food Chem*. 2002; 50:6923-6928.
  12. Attia WY, Gabry MS, El-Shaikh KA, Othman GA. The Anti-Tumor Effect of Bee Honey in Ehrlich Ascite Tumor Model of Mice is Coincided with Stimulation of The Immune Cells. *The Egyptian J Immunol*, 2008; 15(2):169-83.
  13. Al-Waili NS, Boni NS. Natural Honey Lowers Plasma Prostaglandin Concentrations in Normal Individuals. *J Med Food*, 2003; 6:129-33.
  14. Bilsel Y, Bugra D, Yamaner S, Bulut T, Cevikbas U, Turkoglu U. Could Honey Have a Place in Colitis Therapy? Effects of Honey, Prednisolone, and Disulfiram on Inflammation, Nitric Oxide, and Free Radical Formation. *Dig Surg*. 2002; 19:306-11.
  15. Al-Waili NS. Natural Honey Lowers Plasma Glucose, C-Reactive Protein, Homocysteine, and Blood Lipids in Healthy, Diabetic, and Hyperlipidemic Subjects: Comparison with Dextrose and Sucrose. *J Med Food*. 2004; 7:100-7.
  16. Al-Waili NS. Identification of Nitric Oxide Metabolites in Various Honeys: Effects of Intravenous Honey on Plasma and Urinary Nitric Oxide Metabolites Concentrations. *J Med Food*. 2003; 6:359-64.
  17. Al-Waili NS, Boni NS. Honey Increased Saliva, Plasma, and Urine Content of Total Nitrite Concentrations in Normal Individuals. *J Med Food*. 2004; 7:377-80.
  18. Frankel S, Robinson GE, Berenbaum MR. Antioxidant Capacity and Correlated Characteristics of 14 Unifloral Honeys. *J Apicultural Res*, 1998. 37:27-52.
  19. Gheldof N, Engeseth NJ. Antioxidant Capacity of Honeys from Various Floral Sources Based on The Determination of Oxygen Radical Adsorbance Capacity and Inhibition of In Vitro Lipoprotein Oxidation in Human Serum Samples. *J Agric Food Chem*. 2002; 50:3050-5.
  20. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallman P. Honey for Nutrition and Health: a Review. *Am J Coll Nutr*. 2008, 27:677-89.
  21. Perez RA, Iglesias MT, Pueyo E, Gonzales M, de Lorenzo C. Amino Acid Composition and Antioxidant capacity of Spanish. *J Agric Food Chem*. 2007;55(2):360-5.
  22. Perez E, Rodriguez-Malaver AJ, Vit P. Antioxidant Capacity of Venezuelan Honey in Wistar Rat Homogenates. *J Med Food*. 2006;9(4):510-6.
  23. Otilia B, Marghitas L, Krisztina RI, Mihaela N, Dezmiorean D. Honeydew Honey: Correlation between Chemical Composition, Antioxidant Capacity and Antibacterial Effect. *Zootehnie si Biotehnologii*. 2008;41(2):271-7.
  24. Munoz O, Copaja S, Speisky H, Pena RC, Montenegro G. Contenido de Flavonoides y Compuestos Fenolicos de Mielles Chilenas e Indice Antioxidante. *Quim Nova*. 2007;30(4):848-51.
  25. Senanayake MJ. A Chemical Investigation of New Zealand Unifloral

- Honeys. *Thesis*. Waikato: The University of Waikato. 2006.
26. D'Arcy BR. *Antioxidant in Australian Floral Honeys-identification of Health-Enhancing Nutrient Components*. Australian Government. 2005
  27. Adi Parwata IM, Ratnayani K, Listya A. Aktivitas Antiradikal Bebas serta Kadar Beta Karoten pada Madu Randu (*Ceiba pentandra*) dan Madu Kelengkeng (*Nephelium longata L.*). *Jurnal Kimia*. 2010; 54-62
  28. Ratnayani K, Laksmiwati AAIAM, Indah Septian NIP. Kadar Total Senyawa Fenolat pada Madu Randu dan Madu Kelengkeng serta Uji Aktivitas Antiradikal Bebas dengan Metode DPPH (Difenilpicril Hidrazil). *Jurnal Kimia*. 2012; 6(2):163-8
  29. Vit P, Rodriguez-Malaver A, Almeida D, Souza BA, Marchini LC, Diaz CF, et al. A Scientific Event to Promote Knowledge Regarding Honey From Stingless Bees: 1. Physical-chemical Composition. *Magistra*. 2006;18(4):270-6
  30. Brand-Williams W, Culivier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT – Food Sci Technol*. 1995; 28(1):25-30
  31. Singh G, Maurya S, Lampasona MP, Catalan C. Chemical Constituents, Antifungal and Antioxidative Potential of *Foeniculum Vulgare* Volatile Oil and Its Acetone Extract. *Food Control*. 2006, 17:745-52
  32. Abdel-Wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Allah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FM. Influence of p-coumaric Acid on Doxorubicin-induced Oxidative Stress in Rat's Heart. *Pharm Res*. 2003;48:461-5
  33. Kähkönen MP, Hopia AI, and Heinonen M. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem*. 2001; 49(8):4076-82.
  34. Finola MS, Lasagno MC, and Marioli JM. Microbiological and Chemical Characterization of Honeys from Central Argentina. *Food Chem*. 2007; 100(4): 1649-53.
  35. Wilczynska A. Phenolic Content and Antioxidantactivity of Differenttypes of Polish Honey – Ashortreport. *Pol J Food Nutr. Sci*. 2010;60(4):309-13
  36. Khalil I, Moniruzzaman M, Boukraa L, Benhanifia M, Islam A, Islam N, et al. Physicochemical and Antioxidant Properties of Algerian honey. *Molecules*. 2012; 17:11199-215
  37. Mohamed M, Sirajudeen KS, Swamy M, Yaacob NS, Sulaiman SA. Studies on The Antioxidantproperties of Tualanghoney of Malaysia. *African J Trad Complement Altern Med*. 2010;7(1):59-63
  38. IslamA, Khalil I, Islam N, Moniruzzaman M, Mottalib A, Sulaiman SA, et al. Physicochemical and Antioxidant Properties of Bangladeshi Honeys Stored for More Than One Year. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:177-86
  39. Gheldof N, Wang XH, Engeseth NS. Buckwheat Honey Increases Serum Antioxidant Capacity in Humans. *J Agric Food Chem*. 2003; 51:1500-05
  40. Ferreira ICFR, Aires E, Barreira CJM, Esterinho LM. Antioxidant Activity of Portuguese Honey Samples: Different Contributions of The Entire Honey and Phenolic Extract. *Food Chem*. 2009; 114:1438-43

41. Maurya S, Kushwaha AJ, Singh S, Singh G. An Overview on Antioxidative Potential of Honey from Different Flora & Geographical Origins. *Indian J Nat Prod & Res.* 2014; 5(1):9-19
42. Aljadi AM, Kamaruddin MY. Evaluation of The Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Two Malaysian Floral Honeys. *Food Chem.* 2004;85(4):513-8