

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di Peternakan lebah madu PT. Kembang Joyo Sriwijaya yang beralamat di Jl. Raya Karang Donowarih No. 101, Bonowarih, Karangploso, Malang, Jawa Timur 65152. Penggembalaan lebah madu berlokasi di Songgoriti, Kota Batu. Survei, pengambilan sampel dan penelitian dimulai pada tanggal 19 September 2017 sampai dengan 13 November 2017 dan dilaksanakan :

1. Laboratorium Kimia Analisis Instrumental, Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang.
2. Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah madu kaliandra dari tiga jenis lebah yang berbeda yaitu madu kaliandra yang dihasilkan dari lebah *Apis mellifera*, madu kaliandra dihasilkan dari lebah *Apis cerana* dan madu kaliandra dihasilkan dari lebah *Trigona* sp. semua sampel berasal dari Kota Batu yang diperoleh dari PT Kembang Joyo Sriwijaya, Karangploso, Malang. Madu diambil pada masa panen yang sama yaitu pada bulan Oktober.

3.2.1. Bahan

Bahan laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini adalah : 1). Larutan DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dan etanol untuk analisis antioksidan, 2). Folin-ciocalteau, natrium karbonat, metanol 90% untuk analisis total fenolik, 3).

Kuersetin, metanol 90%, NaNO₂, AlCl₃, NaOH untuk analisis total flavonoid.

3.2.2. Peralatan

Peralatan laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Inkubator, spektrofotometer UV-VIS (Labomed INC), vortex (IKA), orbital shaker (Daihan Scietific), gelas ukur 5 mL dan 10 mL (Pyrex), timbangan analitik (Denver M 310 USA), kertas saring whatman No.1, pipet tetes (Iwaki), beker gelas 100 mL (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), dan corong kaca (Supertek).

Peralatan lapang yang digunakan adalah: kotak lebah, baju pelindung diri, topi pelindung, sepatu boot, pot film 20 mL, saringan, kain saring, pisau, wadah, dan sarung tangan.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian menggunakan metode percobaan laboratorium dari ketiga jenis madu kaliandra (perlakuan) yang dihasilkan, yaitu:

P1 = madu kaliandra yang dihasilkan dari lebah *Apis mellifera*

P2 = madu kaliandra yang dihasilkan dari lebah *Apis cerana*

P3 = madu kaliandra yang dihasilkan dari lebah *Trigona* sp.

Data didesain dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 kali pengulangan pada masing-masing madu kaliandra dari lebah yang berbeda. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA). Perlakuan yang diujikan dapat dilihat pada Tabel 2.

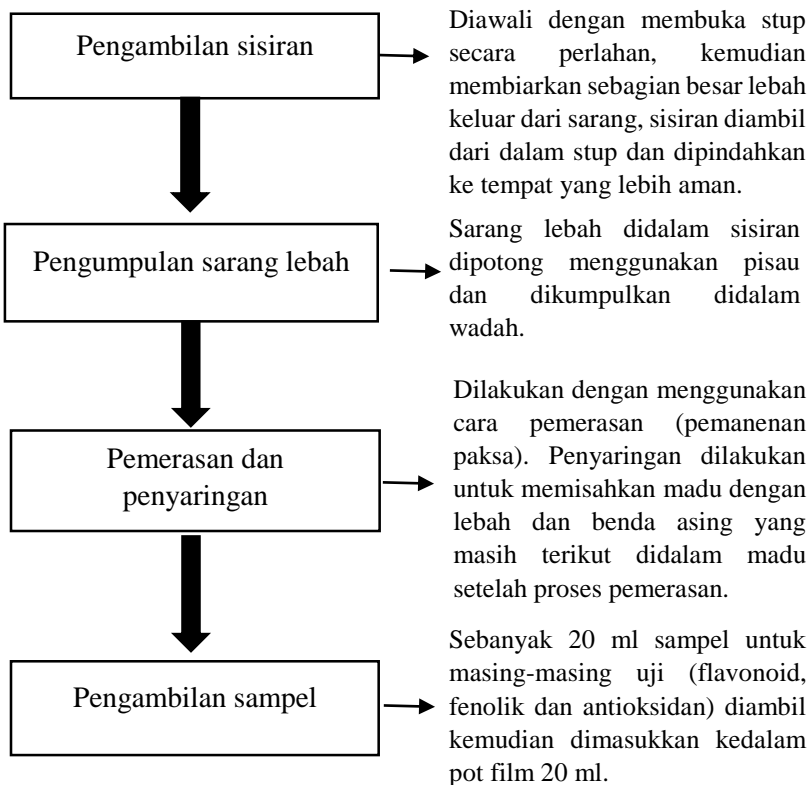
Tabel 2. Model data yang digunakan dalam penelitian

Perlakuan	Ulangan			
	1	2	3	4
P1	P1U1	P1U2	P1U3	P1U4
P2	P2U1	P2U2	P2U3	P2U4
P3	P3U1	P3U2	P3U3	P3U4

3.3.2. Tahapan Penelitian

3.3.2.1. Persiapan Sampel Madu

Proses pemanenan madu yaitu (Gambar 5):



Gambar 6. Digram Proses Pemanenan Madu

3.3.2.2. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Kadar Antioksidan diketahui dengan menggunakan DPPH. Gugus kromofor dan aoksokrom pada radikal bebas DPPH memberikan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm sehingga menimbulkan warna ungu. Warna DPPH akan berubah dari ungu menjadi kuning seiring dengan penambahan antioksidan. Prosedur pengujian aktivitas antioksidan ditunjukkan pada Lampiran 1.

3.3.2.3. Penentuan Kadar Total Fenolik

Total Fenolik ditentukan berdasarkan metode Folin-Ciocalteu dan dinyatakan dalam mg *Gallic Acid Equivalent* (Ekuivalen Asam Galat). Folin-Ciocalteu merupakan pereaksi anorganik yang dapat membentuk larutan kompleks dengan senyawa fenolik. Reaksi yang dihasilkan akan membentuk warna kuning, selanjutnya akan berwarna biru setelah direaksikan dengan natrium karbonat, semakin pekat warna biru yang terbentuk maka kadar fenolik semakin tinggi pula. Kadar total fenolik diekspektasikan sebagai GAE (*Gallic Acid Equivalent*) per berat sampel. Asam galat dipilih sebagai standar pengukuran dikarenakan asam galat merupakan senyawa polifenol yang terdapat pada hampir semua tumbuhan atau hasil tumbuhan termasuk nektar sebagai bahan baku utama pembuatan madu. Prosedur pengujian kadar total fenolik ditunjukkan pada Lampiran 2.

3.3.2.4. Penentuan Kadar Total Flvonoid

Total Flavonoid diukur dengan keberadaan kuersetin ekuivalen dan hasilnya dinyatakan dalam mg Quercetin Equivalent (QE)/g. Kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang dapat dideteksi dengan pereaksi $AlCl_3$, reaksi tersebut akan membentuk ikatan kompleks dengan gugus

hidroksil dari senyawa flavonoid. Perubahan ini diidentifikasi melalui absorbansi pada daerah sinar tampak melalui spektrofotometer. Warna kuning yang terbentuk semakin pekat apabila kandungan flavonoid sampel semakin tinggi. Prosedur pengujian kadar total flavonoid ditunjukkan pada Lampiran 3.

3.4. Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

1. Aktivitas antioksidan madu kaliandra yang dihasilkan dari jenis lebah *Apis mellifera*, *Apis cerana* dan *Trigona* sp., yaitu kemampuan madu dalam meredam radikal bebas.
2. Total fenolik madu kaliandra yang dihasilkan dari jenis lebah *Apis mellifera*, *Apis cerana* dan *Trigona* sp., yaitu senyawa yang diketahui sebagai komponen terbesar yang menyumbang aktivitas antioksidan pada madu.
3. Total flavonoid madu kaliandra yang dihasilkan dari jenis lebah *Apis mellifera*, *Apis cerana* dan *Trigona* sp., yaitu senyawa yang telah diketahui merupakan komponen terbesar dalam senyawa fenolik.

3.5. Analisis Statistik

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *Analysis of varian* (Anova) *single factor* untuk mengetahui pengaruh jenis sampel terhadap masing-masing analisis, serta dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan kepercayaan 1% dan 5%.

3.6. Batasan Istilah

1. Radikal bebas salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan.
2. DPPH radikal bebas yang dapat bereaksi dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen.
3. Antioksidan senyawa yang dapat mendonorkan elektronnya kepada molekul radikal bebas untuk menstabilkan radikal bebas.