

BAB IV

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Pengujian Mutu Dan Keamanan Pangan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Labotarium Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang dan Labotarium Biosains Universitas Brawijaya Malang. Pelaksanaan penelitian dimulai pada pada bulan Agustus 2016 sampai Februari 2017.

4.2. Materi Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah dua jenis madu yang diperoleh dari Peternakan Lebah Kembang Joyo, Karangploso, Malang, Jawa Timur yaitu :

1. Madu kaliandra (*Calliandra callothyrsus*) diperoleh dari penggembalaan di daerah Kediri – Jawa Timur
2. Madu karet (*Hevea brasiliensis*) diperoleh dari penggembalaan di lokasi perkebunan karet Sragen – Jawa Tengah
3. Madu randu (*Ceiba pentandra*) diperoleh dari penggembalaan di daerah Pasuruan – Jawa Timur

Ketiga jenis madu dikumpulkan antara Juli 2016 dan Oktober 2016 dan sampel didinginkan (4-5°C) dalam wadah botol kaca kedap udara sampai analisis lebih lanjut.

4.2.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan kimia untuk analisis dengan spesifikasi pro analisis dan teknis. Bahan kimia spesifikasi p.a (pro analisis) adalah asam askorbat, bovine serum albumin (BSA), katekin, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), HMF, reagen Folin-Ciocalteu, asam galat, prolin, natrium karbonat (Na_2CO_3), aluminium klorida (AlCl_3), natrium nitrit (NaNO_2) dan natrium hidroksida (NaOH). Bahan kimia dengan kemurnian teknis adalah aquades.

4.2.2. Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, beaker glass 50 mL dan 100 mL (pyrex), Labu ukur 500 mL, 50 mL, 25 mL, 10 mL (pyrex), spatula 10 cm, tabung reaksi, rak tabung reaksi (herma), erlemeyer 50 mL dan 100 mL (pyrex), pipet ukur 1 mL, bola hisap, pipet tetes, kertas saring, botol kaca, buret, pH meter, timbangan analitik (Denver M 310 USA), Color Reader CR-100 (Minolta.Jepang), vortex (VM-200 Taiwan), refractometer (RHB-92ATC), aluminium foil dan spektrofotometer Vis (Labomed INC). Satu unit alat HPLC (Waters ec 2695), yang terdiri dari injektor (waters SM7), vakum desagger pompa CBM, detector UV (UV/Vis Water 2489) dilengkapi dengan kolom (sunfire C18 5 μm ; 4,6x150 mm), Membran filter PTFE 0,45 μm .

4.3. Metode Penelitian

4.3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian laboratorium dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 3 perlakuan dan 5 kali ulangan, sehingga terdapat 15 unit percobaan dengan perlakuan adalah jenis madu. Variabel yang diukur adalah intensitas warna madu, kadar total fenolik, total flavonoid, analisis aktivitas antioksidan.

4.3.2. Prosedur Penelitian

4.3.2.1. Persiapan Sampel Madu

Sampel madu disimpan dalam keadaan tertutup rapat dalam botol kaca dan diletakkan ditempat kering dalam suhu ruang serta terhindar dari sinar matahari. Hal ini bertujuan untuk menjaga kemurnian madu serta komposisi kimia yang terkandung didalamnya.

4.3.2.2. Analisis Intensitas Warna

Analisis warna dalam penelitian ini menggunakan sistem $L^*a^*b^*$ dengan menggunakan alat *Colour Reader CR-100* (Minolta, Jepang). Sistem warna yang digunakan adalah *Hunter's Lab Colorimetric System*. Sistem notasi warna Hunter dicirikan dengan tiga nilai yaitu L (*Lightness*), a (*Redness*), dan b (*Yellowness*). Nilai L^* , a^* , b^* mempunyai interval skala yang menunjukkan tingkat warna bahan yang diuji. Notasi L menyatakan parameter kecerahan (*lightness*) dengan kisaran nilai dari 0-100 menunjukkan dari gelap ke terang. Semakin tinggi nilai L maka sampel yang diuji menunjukkan kecenderungan warna lebih terang, sedangkan semakin rendah nilai L^* atau mendekati 0 maka sampel menunjukkan kecenderungan warna gelap. Notasi a^* (*Redness*) dengan kisaran nilai dari -80-+100 menunjukkan dari hijau ke merah. Apabila skala menunjukkan nilai negatif (a^-) maka sampel yang diuji menunjukkan kecenderungan warna hijau. Apabila skala menunjukkan nilai positif (a^+) maka sampel yang diuji menunjukkan kecenderungan warna merah. Notasi b^* (*yellowness*) dengan kisaran nilai dari -70-+70 menunjukkan dari biru ke kuning. Apabila skala menunjukkan nilai negative (b^-) maka sampel yang diuji menunjukkan kecenderungan warna biru. Apabila skala menunjukkan nilai positif (b^+) maka sampel yang diuji menunjukkan kecenderungan warna kuning. Prosedur kerja penentuan intensitas warna terdapat pada Lampiran 1.

4.3.2.3. Analisis Kadar Total Fenolik

Kadar total fenolik diukur berdasarkan keberadaan asam galat dalam senyawa fenolik dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Folin-Ciocalteu adalah pereaksi anorganik yang dapat membentuk larutan kompleks dengan senyawa fenolik. Reaksi dari Folin-Ciocalteu dengan senyawa fenolik akan membentuk warna kuning, selanjutnya akan berwarna biru saat direaksikan dengan natrium karbonat. Semakin tinggi kadar total fenolik pada sampel, maka secara visual warna biru yang terbentuk akan semakin pekat.

Kadar total fenolik yang ditentukan menurut metode Folin-Ciocalteu bukan kadar absolut, tetapi prinsipnya berdasarkan kapasitas reduksi dari bahan yang diuji terhadap suatu reduksi ekuivalen dari asam galat. Oleh karena itu kadar total fenolik diekspresikan sebagai GAE (*Gallic Acid Equivalen*) 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 diantaranya adalah madu karena diproduksi dari nektar tumbuhan. Analisis kadar total fenolik terdiri dari penentuan panjang gelombang maksimum, pembuatan kurva standar asam galat dan penentuan kadar total fenolik.

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum pada spektrofotometer dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh serapan maksimum standar asam galat pada spektrofotometer. Pada dasarnya absorbansi standar asam galat dapat dideteksi pada sinar tampak yakni pada panjang gelombang 700-780 nm, namun dalam penelitian ini panjang gelombang yang dipilih untuk menentukan panjang gelombang maksimum standar asam galat adalah panjang gelombang yang sudah umum dipakai dalam penentuan kadar total fenolik. Hal ini dilakukan

atas dasar efisiensi kerja penelitian. Panjang gelombang tersebut adalah 750, 755, 760 dan 765 nm. Setelah dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum, hasil yang diperoleh dibuat dalam bentuk kurva, sebagai sumbu y adalah absorbansi dan panjang gelombang cahaya sebagai sumbu x. Berdasarkan kurva tersebut dapat ditentukan panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum untuk digunakan pada tahap penelitian selanjutnya.

b. Pembuatan Kurva Standar Asam Galat

Kurva standar asam galat digunakan untuk mengukur kadar total fenolik dalam madu. Pembuatan kurva standar asam galat diawali dengan membuat larutan stok asam galat dengan konsentrasi 100 µg/mL dalam aquades. Kemudian larutan stok asam galat tersebut diencerkan untuk memperoleh larutan kerja dengan konsentrasi 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL dan 400 µg/mL. Setiap konsentrasi asam galat tersebut selanjutnya diukur kadar serapannya pada panjang gelombang maksimum berdasarkan hasil penentuan panjang gelombang maksimum standar asam galat. Setelah itu kurva kalibrasi standar asam galat dibuat dengan $x =$ konsentrasi larutan asam galat dan $y =$ Absorbansi. Kemudian dihitung persamaan regresi dan nilai koefisien determinasi (R^2). Koefisien determinasi adalah suatu nilai yang berkisar dari 0 sampai 1 yang menyatakan seberapa dekat atau sesuai antara nilai perkiraan pada garis persamaan kurva dengan data aktual yang didapat. Jika R^2 mendekati 1, maka dapat dikatakan perbedaan antara nilai y perkiraan dan nilai y aktual hampir sama. sedangkan bila r mendekati 0, dapat dikatakan persamaan garis yang di dapat tidak dapat membantu prediksi nilai y .

c. Penentuan Kadar Total Fenolik

Kadar total fenolik ditentukan secara spektrofotometri menggunakan metode Folin-Ciocalteu yang diekspresikan sebagai mg GAE/100 g. Penentuan kadar total fenolik pada madu diawali dengan penimbangan sampel madu yang akan dianalisis, kemudian dilarutkan dalam metanol. Metanol dipilih sebagai pelarut karena metanol dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar yang ada pada sampel, serta mudah didapat dan harganya relatif murah daripada pelarut organik lainnya. Setelah madu larut, kemudian direaksikan dengan natrium karbonat (Na_2CO_3) dan Reagen Folin-Ciocalteu. Hasil dari reaksi tersebut diabsorbansi pada panjang gelombang maksimum berdasarkan hasil penentuan panjang gelombang maksimum standar asam galat. Kemudian nilai absorbansi sampel dikalibrasi dengan persamaan garis regresi linear standar asam galat untuk menghitung kadar total fenolik. Prosedur kerja penentuan kadar total senyawa fenolik yang lebih detil disajikan pada Lampiran 1.

4.3.2.4. Analisis Kadar Total Flavonoid

Kadar total flavonoid diukur berdasarkan keberadaan kuersetin didalam madu. Kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keto pada C-4 dan memiliki gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5. Senyawa flavonol ini dapat dideteksi menggunakan pereaksi AlCl_3 . Reaksi sampel yang mengandung senyawa flavonoid dengan AlCl_3 akan membentuk ikatan kompleks dengan gugus hidroksil dari senyawa flavonoid. Perubahan ini diidentifikasi melalui absorbans pada daerah sinar tampak melalui alat spektrofotometer. Semakin banyak kandungan senyawa flavonoid dalam suatu sampel maka secara visual warna kuning yang terbentuk akan semakin pekat. Analisis kadar total flavonoid terdiri dari penentuan panjang gelombang maksimum, pembuatan kurva standar kuersetin dan penentuan kadar total flavonoid.

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimum ditentukan untuk mengetahui serapan maksimum standar kuersetin. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan mengukur absorbansi larutan standar kuersetin 100 µg/mL pada panjang gelombang 400-520 nm dengan interval tertentu. Hasil yang diperoleh dibuat dalam bentuk kurva, sebagai sumbu y adalah absorbansi dan panjang gelombang cahaya sebagai sumbu x. Berdasarkan kurva tersebut dapat ditentukan panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum untuk digunakan pada tahap penelitian selanjutnya.

b. Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

Kurva standar kuersetin digunakan untuk mengukur kadar total flavonoid dalam madu. Pembuatan kurva standar asam galat diawali dengan membuat larutan stok kuersetin dengan konsentrasi 1000 µg/mL dalam aquades. Kemudian larutan stok asam galat tersebut diencerkan untuk memperoleh larutan kerja dengan konsentrasi 40 µg/mL, 80 µg/mL, 120 µg/mL, 160 µg/mL dan 200 µg/mL. Dari setiap konsentrasi asam galat tersebut selanjutnya diukur kadar serapannya pada panjang gelombang maksimum. Setelah itu kurva kalibrasi standar asam galat dibuat dengan $x =$ konsentrasi larutan asam galat dan $y =$ Absorbansi, kemudian dihitung persamaan regresi dan nilai koefisien determinasi (R^2).

c. Penentuan Kadar Total Flavonoid

Kadar total flavonoid ditentukan secara spektrofotometri yang diekspresikan dalam bentuk mg QE/100 g. Kadar total flavonoid didapatkan dengan memasukkan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan garis regresi linear standar kuersetin. Prosedur kerja penentuan kadar total flavonoid ditunjukkan pada Lampiran 1.

4.3.2.5. Analisis Aktivitas Antioksidan

Analisis aktivitas antioksidan terdiri dari pengenceran sampel, pembuatan larutan DPPH dan pengujian aktivitas antioksidan.

a. Pengenceran Sampel Madu

Pengenceran sampel madu dilakukan dengan tujuan membuat beberapa konsentrasi sampel madu untuk diuji aktivitas antioksidannya, sehingga didapatkan nilai aktivitas antioksidan dengan beberapa konsentrasi. Konsentrasi yang dibuat terdiri dari lima konsentrasi yaitu 6, 7, 8, 9 dan 10 mg/mL. Konsentrasi dibuat dengan cara menimbang sebanyak 0,06 g, 0,07 g, 0,08 g, 0,09 g dan 0,1 g kemudian masing-masing dilarutkan dengan 10 mL methanol sehingga kadar masing-masing 6, 7, 8, 9 dan 10 mg/mL.

b. Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat untuk mendapatkan konsentrasi DPPH yang akan digunakan untuk analisis aktivitas antioksidan. Konsentrasi DPPH yang digunakan dalam penelitian adalah 0,04%. Prosedur pembuatannya adalah dengan menimbang Reagen DPPH sebanyak 0,01 g (10 mg), kemudian dilarutkan dalam 25 mL metanol sehingga kadarnya 0,04 %. Larutan DPPH selanjutnya disimpan dalam botol kaca berwarna gelap dan dibungkus dengan aluminium foil serta ditempatkan dalam freezer. Hal ini bertujuan agar DPPH tidak mengalami kerusakan, karna DPPH sangat sensitif dan mudah sekali rusak apabila kontak langsung dengan cahaya.

c. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan terhadap lima konsentrasi sampel yang telah dibuat pada masing-masing madu. Sebelum dilakukan uji aktivitas antioksidan, terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang

maksimum larutan DPPH dengan cara mengukur spektrum absorbansi larutan DPPH pada panjang gelombang 400-700 nm. Setelah didapatkan panjang gelombang maksimum DPPH, selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antioksidan sampel madu dan standar BHT. Prosedur kerja uji aktivitas antioksidan ditunjukkan pada Lampiran 1.

Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persen peredaman dan IC_{50} . Nilai persen peredaman mengukur seberapa besar aktivitas antioksidan pada sampel untuk meredam radikal bebas (DPPH) yang dinyatakan dalam satuan persen (%). Semakin tinggi nilai persen peredamannya maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Nilai IC_{50} adalah nilai konsentrasi sampel untuk mengukur kemampuan aktivitas antioksidan suatu sampel untuk meredam radikal bebas sebesar 50%, semakin rendah nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidannya semakin tinggi (Molyneux, 2004). Persen peredaman dihitung dengan persamaan :

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{\text{Absorbansi DPPH} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Abs. DPPH}} \times 100\%$$

Adapun nilai Nilai IC_{50} dihitung berdasarkan persen peredaman terhadap radikal DPPH. Masing-masing konsentrasi yang diuji akan didapatkan persentase peredamannya, kemudian hasil tersebut diplotkan kedalam kurva sehingga akan didapatkan suatu persamaan $y = a + bx$. Nilai IC_{50} diperoleh dengan perhitungan regresi linear dimana x adalah konsentrasi sampel dan y adalah persentase peredaman. Nilai IC_{50} diapatkan dari nilai x setelah mengganti nilai $y = 50$.

4.4. Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

1. Intensitas warna, yaitu salah satu karakteristik madu yang dapat menunjukkan sumber asal nektar dan mutu madu, serta berhubungan dengan kapasitas antioksidan madu

2. Kadar total fenolik, yaitu senyawa yang telah diketahui sebagai komponen terbesar yang penyumbang aktivitas antioksidan pada madu.
3. Kadar total flavonoid, yaitu senyawa yang telah diketahui merupakan komponen terbesar dalam senyawa fenolik.
4. Aktivitas antioksidan, yaitu kemampuan madu dalam meredam radikal bebas.

4.5 Analisis Statistik

Data yang diperoleh pada penelitian ini di analisis dengan menggunakan *Analysis of varian (Anova) single factor* untuk mengetahui pengaruh jenis sampel terhadap masing-masing analisis, serta dilanjutkan dengan *Duncan's multiple range test (DMRT)* dengan tingkat kepercayaan 1% dan 5%. Korelasi antara perlakuan yaitu hubungan antara warna, total senyawa fenolik, total senyawa flavonoid dan aktivitas antioksidan diuji dengan korelasi linear bivariat pearson. Program komputer yang digunakan adalah *Microsoft Excel 2010* dan *Statistical Product and Service Solution (SPSS) 20,0 for windows*. Model matematis untuk RAL adalah:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} = Nilai pengamatan pada perlakuan ke i ulangan ke j

μ = Rata-rata pengamatan

τ_i = Pengaruh perlakuan i

ϵ_{ij} = Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

i = Banyaknya perlakuan

j = Banyaknya ulangan

4.6 Batasan Istilah

Batasan istilah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. *Honeydew* (madu embun) adalah madu yang diproduksi lebah dari cairan manis hasil ekskresi serangga.

2. *Nectarifier* adalah kelenjar tumbuhan yang menghasilkan nektar.
3. Radikal bebas adalah suatu atom, gugus atom atau molekul yang tidak stabil yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit paling luarnya.
4. DPPH adalah radikal bebas yang dapat bereaksi dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen.
5. Antioksidan adalah senyawa yang dapat mendonorkan elektronnya kepada molekul radikal bebas untuk menstabilkan radikal bebas.
6. Madu monoflora adalah madu dari satu sumber nektar bunga tumbuhan utama.