

UJI FITOKIMIA DAN PENENTUAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI MADU *Trigona incisa*

PHYTOCHEMICALS TEST AND DETERMINATION OF ACTIVITY ANTIOXIDANT FROM *Trigona incisa* HONEY

Rio Gunawan^{1,*}, Erwin¹, Syafrizal²

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok, Kampus Gn. Kelua, Samarinda 75123

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok, Kampus Gn. Kelua, Samarinda 75123

*E-mail: rio_gunawan12@yahoo.com

Received: 22 November 2016, Accepted: 21 January 2018

ABSTRACT

Trigona incisa honey is a flower nectar and pollen which known to have properties that are very good for health used as ingredients or cosmetic. This study aims to determine the content of secondary metabolites and to determine the antioxidant activity of *Trigona incisa* honey. Fractionation was done using ethanol, n-hexane and ethyl acetate, determination of the content of secondary metabolites was conducted using Harbone method and antioxidant activity was determined against DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radicals by measuring the absorbance of DPPH at a wavelength of 517 nm. Phytochemical test results to the fraction of ethanol, ethyl acetate and n-hexane of *Trigona incisa* honey. Showed that the alkaloid compounds, triterpenoid and flavonoids present in fractions of ethanol and ethyl acetate fraction. Alkaloid contained in n-hexane fraction. The results showed the ethanol and ethyl acetate fractions thought to contain flavonoid, while the antioxidant activity of the ethyl acetate fraction larger than the fraction of n-hexane and ethanol role in this case amounted to 97.00 ppm, 249 ppm and 233.85 ppm. This results shows that the ethyl acetate fraction contains more antioxidant components

Keywords: Honey of *Trigona incisa*, Phytochemicals antioxidant, DPPH

PENDAHULUAN

Di Indonesia lebah madu sudah sejak lama dikenal dan diketahui manfaatnya oleh manusia. Semua aktivitas dan produk yang dihasilkan oleh lebah madu mempunyai manfaat bagi kehidupan manusia, mulai dari perannya sebagai polinator sampai menghasilkan produk yang berupa madu, royal jelly, propolis, malam dan bias. Madu dimanfaatkan untuk berbagai kepentingan, baik sebagai bahan obat maupun kosmetik [1].

Madu secara umum didefinisikan sebagai zat cair yang kental manis, yang dibuat oleh lebah dengan jalan proses peragian dari nektar bunga atau cairan manis yang dihasilkan bagian-bagian lain selain bunga. Nektar adalah zat yang sangat kompleks yang dihasilkan oleh kelenjar-kelenjar nektarifer dalam bentuk larutan gula dengan konsentrasi yang bervariasi berkisar antara 5-70%, konsentrasi ini dipengaruhi oleh kelembaban udara, tanah, jenis tanaman dan lain-lain [2].

Madu *Trigona incisa* berasal dari nektar bunga dan tepung sari yang diketahui mempunyai khasiat yang sangat baik bagi kesehatan. Melihat publikasi di indonesia tentang madu *Trigona incisa* masih

terbatas terutama tentang aktivitas antioksidan bebas pada kondisi pelarut yang berbeda maka perlu dilakukan penelitian ini [5].

Berdasarkan latar belakang di atas penelitian ini dilakukan untuk mengetahui jenis metabolit sekunder yang terkandung pada fraksi etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana madu *Trigona incisa* yang berasal dari Kebun Raya Samarinda dan aktivitas antioksidan madu *Trigona incisa* dengan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [5].

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah rotary evaporator, beaker gelas, erlenmeyer, gelas ukur, corong, corong pisah, neraca analitik, cawan petri, tabung reaksi, pipet volume, pipet tetes, mikropipet ukuran 100-1000 μ L, labu ukur, batang pengaduk, aluminium foil, hot plate, dan spektrofotometer UV-Vis.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah madu, etanol 96%, etil asetat, kloroform, n-heksana, dietil

eter, H₂SO₄ 2M, asam asetat glasial, Bi(NO₃)₃.5H₂O, HgCl₂, HNO₃ pekat, KI, FeCl₃ 1 %, HCl, serbuk Mg, aquades, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil) dan Vitamin C.

Prosedur Penelitian

Persiapan sampel

Sampel madu *Trigona incisa* yang telah diambil dari sarang disimpan dalam botol setelah itu dibiarkan semalam ditempat yang sejuk kemudian dipisahkan dari pengotornya sehingga didapatkan madu yang baik.

Fraksinasi senyawa metabolit sekunder

Sebanyak 100 mL sampel madu *trigona incisa* dilarutkan dalam etanol 96% lalu difraksinasi berdasarkan pada perbedaan kepolaran pelarut organik. Caranya adalah sebagai berikut: madu ditambahkan etanol dan *n*-heksana dengan perbandingan 1:2 atau (v/v). Fraksinasi dilakukan dengan corong pisah, sehingga diperoleh 2 fraksi, yaitu fraksi etanol dan fraksi etil *n*-heksana. Fraksi *n*-heksana dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan disebut sebagai ekstrak fraksi *n*-heksana, dilakukan berulang sebanyak 3 kali fraksinasi sehingga didapatkan 3 hasil ekstrak fraksi *n*-heksana. Selanjutnya fraksi etanol yang tersisa kemudian di fraksinasi lagi dengan etil asetat sehingga diperoleh 2 fraksi yaitu fraksi etanol dan fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan disebut sebagai ekstrak etil asetat dan fraksi etanol: air di pekatkan dengan rotari evaporator dan hasilnya disebut sebagai ekstrak fraksi etanol.

Uji fitokimia

Masing-masing fraksi madu *Trigona incisa* dilakukan uji fitokimia dengan pereaksi tetes golongan kemudian dicatat perubahan warnanya. Pereaksi yang digunakan antara lain HgCl₂, HCl 1N, H₂SO₄ pekat, HCl pekat FeCl₃ 1 % dan logam Mg.

Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dari ketiga fraksi diambil Ekstrak ditimbang 20 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol sampai volumenya 40 mL. Dengan demikian diperoleh konsentrasi larutan ekstrak sampel (masing-masing fraksi) yaitu 500 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran dari konsentrasi 500 ppm. Masing-masing fraksi dipipet masing-masing 100µL, 250µL, 500µL, 750µL, 1000µL untuk mendapatkan konsentrasi 10, 25, 50, 75 dan 100 ppm dengan menggunakan mikro pipet dan dilarutkan hingga volume 5 mL. Masing-masing konsentrasi dibuat 3 pengulangan.

Kemudian diinkubasi pada suhu (25°C) selama 30 menit diruang gelap selanjutnya absoebansi diukur pada panjang gelombang 517 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV- Vis.

Persentase aktivitas antioksidan dari fraksi dalam menagkap atau meredam radikal bebas DPPH yang dinyatakan dalam 5 inhibisi yang diperoleh dengan menggunakan rumus (1) [6].

$$\%AA = 100 - \{[(A_B - A_A)] \times 100 / A_{KN}\} \quad (1)$$

menyatakan bahwa nilai IC₅₀ dihitung masing-masing dengan menggunakan rumus persamaan regresi linear yaitu $y = ax + b$, dimana sumbu x adalah konsentrasi dan sumbu y adalah % inhibisi. Dengan nilai y adalah sebesar 50 dan nilai x sebagai IC₅₀. Nilai IC₅₀ ini menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Berat masing- masing fraksi dari madu *Trigona incisa*

Jenis Ekstrak	Berat (gram)
Fraksi Etanol	13,66
Fraksi <i>n</i> -Heksana	0,08
Fraksi Etil Asetat	4,26

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah madu *Trigona incisa* sebagai makanan pokok dari seluruh koloni lebah madu. Pada pengambilan madu secara manual dengan cara memilih kotak sarang lebah yang banyak terdapat sarang lebah kemudian diambil madu murni ada dua macam cara untuk mengambil madu dengan cara membelah sarang kemudian mengambil dengan sendok teh atau menggunakan suntikan. Madu yang berbentuk cairan dengan rasa manis umumnya tetapi khusus madu *Trigona incisa* rasa dapat dipengaruhi oleh sumber nektar yang diambil lebah, untuk warna madu itu sendiri bervariasi namun pada umumnya bewarna coklat, hitam dan kuning. Setelah diambil itulah madu murni.

Sampel yang telah terkumpul kemudian disimpan didalam kulkas agar tetap steril apabila ditaruh diruang terbuka ditakutkan sampel akan rusak karena terkena cahaya senyawa metabolit sekundernya rusak. Rusaknya metabolit sekunder pada sampel dapat disebabkan oleh bakteri ataupun suhu, selanjutnya sampel madu tadi difraksinasi dengan tujuan untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder berdasarkan perbedaan sifat kepolarannya.

Hasil uji fitokimia disajikan pada tabel 2. Uji alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah coklat yang terbentuk pada pereaksi dragendroff. Endapan terbentuk karena terjadi reaksi

antara elektron bebas nitrogen pada senyawa alkaloid dengan asam pada reagen Dragendorff [7]. Uji saponin ditandai dengan timbulnya busa setinggi 1-3 cm dan bertahan selama 7 menit, timbulnya busa pada uji Ford menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Uji steroid dan triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna hijau yang berasal dari reaksi antara sterol tidak jenuh atau triterpen dengan asam (CH_3COOH dan H_2SO_4). Uji fenolik ditandai dengan terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat.

Tabel 2. Hasil identifikasi golongan senyawa metabolit sekunder masing-masing fraksi dari madu *Trigona incisa*

Jenis Senyawa	Jenis Fraksi		
	1	2	3
Alkaloid	+	+	+
Flavonoid	+	+	-
Steroid	-	-	-
Triterpenoid	+	+	-
Fenolik	-	-	-
Saponin	-	-	-

Keterangan: **1** (fraksi etanol-air), **2** (fraksi etil asetat), **3** (fraksi *n*-heksana)

Tabel 3. Aktivitas antioksidan fraksi etanol madu *Trigona incisa* dengan uji peredaman radikal DPPH dan nilai IC_{50}

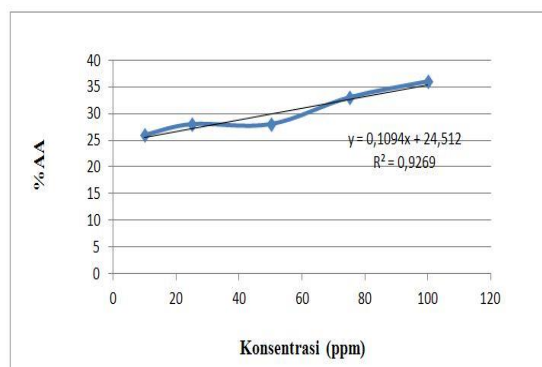
% AA	Konsentrasi (ppm)				
	10	25	50	75	100
1	26,87	28,48	28,85	33,17	36,82
2	36,07	37,56	42,66	46,77	51,37
3	33,21	37,19	35,74	37,56	41,42
4	39,93	47,64	64,68	75,37	89,56

Keterangan: **1** (fraksi etanol-air), **2** (fraksi etil asetat), **3** (fraksi *n*-heksana), dan **4** (vitamin C)

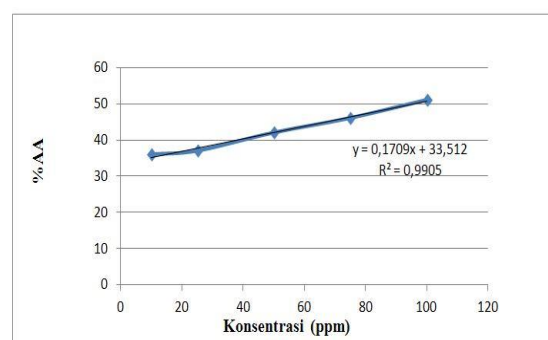
Metode yang paling sering digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah metode uji dengan menggunakan radikal bebas DPPH atau 2,2 – *diphenyl-1-picrylhydrazyl*. Berdasarkan Khopkar (2003) keunggulan metode ini adalah sederhana, mudah, cepat, peka dan hanya memerlukan sedikit sampel [8]. Radikal bebas DPPH merupakan radikal sintetik yang stabil pada suhu kamar dan larut dalam pelarut polar yaitu metanol dan etanol. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya pada radikal bebas DPPH. Hal tersebut ditandai dengan terjadinya perubahan warna ungu

menjadi kuning pucat dengan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm.

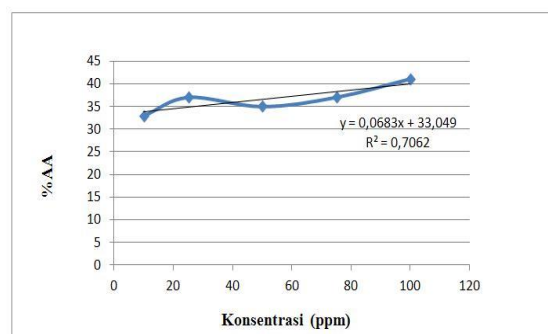
Berdasarkan hasil analisa data dengan menggunakan regresi linier sederhana, diperoleh grafik linear dan persamaan regresi linear antara konsentrasi ekstrak total, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air dengan persen inhibisi adalah sebagai berikut.



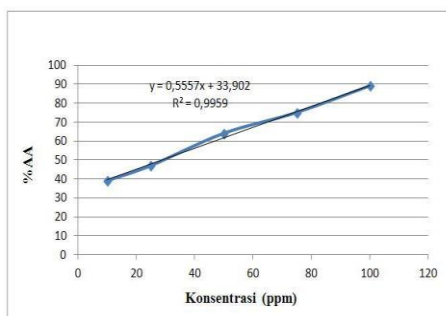
Gambar 1. Grafik regresi linear antara konsentrasi dengan persen inhibisi dari fraksi etanol madu *Trigona incisa*



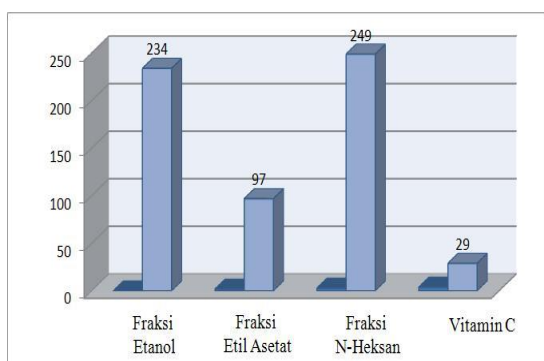
Gambar 2. Grafik regresi linear antara konsentrasi dengan persen inhibisi dari fraksi etil asetat madu *Trigona incisa*



Gambar 3. Grafik regresi linear antara konsentrasi dengan persen inhibisi dari fraksi *n*-heksana madu *Trigona incisa*



Gambar 4. Grafik regresi linear antara konsentrasi dengan persen inhibisi dari vitamin C



Gambar 5. Grafik nilai IC₅₀ pada fraksi etanol, etil asetat, fraksi n-heksana dan vitamin C

Berdasarkan klasifikasi di atas dapat disimpulkan bahwa pada fraksi etil asetat diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 97,00 oleh karena itu etil asetat memiliki potensi sebagai antioksidan yang kuat karena memiliki nilai IC₅₀ pada rentang 50-100 ppm sesuai dengan tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH, nilai IC₅₀ diperoleh pada fraksi n-heksana sebesar 249,41 dan madu fraksi etanol memiliki nilai IC₅₀ sebesar 233,85 dapat disimpulkan fraksi n-heksana memiliki aktivitas antioksidan yang lemah karena memiliki nilai IC₅₀ di atas range 101-150.

Jika ditinjau berdasarkan hasil uji fitokimia, fraksi etanol dan fraksi etil asetat mengandung senyawa metabolit sekunder seperti Alkaloid, Triterpenoid dan Flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik mereka menghambat banyak reaksi oksidasi, baik enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung radikal yang baik radikal hidroksi dan superoksida. Berdasarkan dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa sampel madu *Trigona incisa* mengandung bahan aktif antiradikal bebas. Dimana pada fraksi semi polar lebih tinggi meredam radikal bebas dibandingkan dengan fraksi non polar hal ini disebabkan karena pada madu *Trigona incisa* banyak mengandung metabolit sekunder yang cenderung bersifat semi polar atau polar. Dimana senyawa-

senyawa kimia pada fraksi semi polar seperti golongan flavonoid selain memiliki ikatan rangkap juga memiliki gugus hidroksi lebih banyak yang dapat berpotensi untuk meredam radikal DPPH. Untuk fraksi etanol juga mengandung senyawa alkaloid dan Flavonoid namun tidak sekuat pada fraksi etil asetat dikarenakan masih adanya senyawa-senyawa polar dan non polar pada fraksi tersebut sehingga menurunkan aktivitas antioksidannya.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian diketahui bahwa madu *Trigona incisa* dapat berfungsi sebagai aktivitas antioksidan dan pada fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan tertinggi IC₅₀ yaitu sebesar 97,00 ppm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Laboratorium riset atas fasilitas yang diberikan selama penelitian dan seluruh pihak yang telah membantu.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Saputra dan Arminudin, A., T.2007. *Beternak Lebah*. Yogyakarta: PT Citra Aji Pramana.
- [2] Lembang, Y. 2010. *Identifikasi Madu Liar Tanpa Sengat (Stingless bee) Di Kebun Raya Unmul Samarinda*. Skripsi Mahasiswa Biologi Fakultas Mipa UNMUL.
- [3] Siddiq, I. M., 2008, *Potensi Madu Kelengkeng Perhutani dan Madu Randu Perhutani Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri MRSA (Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus) yang Diisolasi Dari Spesimen Apus Luka di Laboratorium Patologi Klinik RS. dr. Hasan Sadikin Bandung*, Program Studi Sarjana Mikrobiologi SITH, ITB, Bandung.
- [4] Rohdiana, D. 2001, *Aktifitas Daya Tangkap Radikal Polifenol Dalam Daun Teh*, majalah jurnal indonesia 12,(1),53-58.
- [5] Molyneux, P. 2004. *The Use Of The Stable Free Radical Diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity*. Songklanakarin Journal Science Technology, 26(2) : 211-219.
- [6] Kadarisman, I. 2000. *Isolasi dan identifikasi senyawa kimia bioktif dari rimpang bangle (zingiber cassumunar roxb)*. Skripsi jurusan kimia FMIPA.IPB Bogor.
- [7] Harborne, J.B.1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Penerbit ITB.
- [8] Khopkar, S.M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.