

Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) Ekstrak Madu Sebelum dan Sesudah Pemanasan

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Honey Extract Before and After Heating

La Ode Sumarlin^{1*}, Anna Muawanah², Amalia Istiqomah³, Nurul Amilia⁴, Tarso Rudiana⁵,
Sri Yadi Chalid⁶, Hajar⁷

^{1,2,3,4,5,6}Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Syarif Hidayatullah

Jl. Ir H Juanda No 95 Cemp. Putih, Banten 15412 Indonesia

⁷Program Studi Peternakan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Sulawesi Tenggara

Jl. Kapten Piere Tendean No. 109. A Kendari 93121 Indonesia

*Corresponding author: sumarlin@uinjkt.ac.id

ABSTRAK

DOI;
[10.30595/jrst.v7i2.16855](https://doi.org/10.30595/jrst.v7i2.16855)

Histori Artikel:

Diajukan:
05/02/2023

Diterima:
09/07/2023

Diterbitkan:
15/09/2023

Pemanasan pada suhu dan waktu optimum dapat meningkatkan aktivitas antioksidan pada madu apis dan trigona karena meningkatnya total fenolik, total flavonoid dan pigmen coklat. Kemampuan antioksidan dapat diukur melalui kemampuan menangkap radikal oleh DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl). Tujuan penelitian ini untuk membandingkan perubahan aktivitas antioksidan melalui parameter penangkapan radikal DPPH serta pigmen coklat pada 5 jenis madu apis dan 5 jenis madu trigona dari kota Bogor, Kalimantan, Sulawesi, dan Lombok pada sebelum dan sesudah dipanaskan yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian ini menunjukkan persen inhibisi baik pada madu jenis apis maupun pada madu jenis trigona, cenderung mengalami peningkatan seiring dengan pertambahan suhu dan waktu pemanasan. Pigmen coklat didapatkan cenderung mengalami peningkatan seiring dengan pertambahan suhu dan waktu pemanasan. Kemampuan penangkapan radikal DPPH paling tinggi terdapat pada madu jenis trigona asal Lombok dengan nilai inhibisi 93% dan IC_{50} sebesar $3.435 \pm 29,3$ ppm dengan persentase kenaikan 59,1 % pada suhu 50° C selama 9 hari. Dengan demikian, madu jenis Apis dan Trigona memiliki senyawa bioaktif dengan kemampuan menangkap radikal DPPH diantaranya terbentuknya pigmen coklat serta berpotensi meningkat kemampuan antioksidannya melalui pemanasan pada suhu tertentu.

Kata Kunci: Antioksidan, Penangkapan DPPH, Madu, Pemanasan, Pigmen Coklat

ABSTRACT

Heating at the optimum temperature and time can increase the antioxidant activity of apis and trigona honey due to increased total phenolics, total flavonoids and brown pigments. The aim of this study was to compare changes in antioxidant activity through the parameters of DPPH radical scavenging and brown pigment in 5 types of apis honey and 5 types of trigona honey from Bogor, Kalimantan, Sulawesi and Lombok before and after heating as measured using a UV-Vis spectrophotometer. The results of this study indicated that the percentage of inhibition in both apis and trigona honey tended to increase with increasing temperature and heating time. Brown pigment was found to tend to increase with increasing temperature and heating time. The highest DPPH radical scavenging ability was found in trigona honey from Lombok with an inhibition value of 93% and an IC_{50} of 3.435 ± 29.3 ppm with a percentage increase of 59.1% at 50°C for 9 days. Thus, Apis and Trigona types of honey have bioactive compounds with the ability to capture DPPH radicals including the

formation of brown pigments and have the potential to increase their antioxidant abilities through heating at certain temperatures.

Keywords: *Antioxidant, Brown Pigment, Scavenging DPPH, Honey, Heating Treatment*

1. PENDAHULUAN

Keberadaan senyawa-senyawa radikal menjadi masalah serius yang dapat mengganggu kesehatan. Salah satu solusi untuk menangkai radikal bebas adalah dengan mengonsumsi makanan yang mengandung antioksidan, karena antioksidan berperan menangkap radikal sehingga menghentikan reaksi berantai (Khan et al., 2019). Salah satu makanan yang mengandung antioksidan adalah madu. Madu adalah produk alami yang mengandung nutrisi dan senyawa yang bermanfaat seperti flavonoid dan asam fenolat yang dihasilkan oleh lebah. Kandungan gizi yang terkandung dalam madu antara lain karbohidrat, protein, dan beberapa jenis mineral (Putu et al., 2017) menunjukkan bahwa bahwa berbagai spesies lebah tak bersengat (*Trigona* sp) menghasilkan madu dengan berbagai sifat-sifat (misalnya, kisaran kadar air: 25,88–40,07%; kisaran keasaman: 18,59–140,36 mEq kg⁻¹; kisaran gula total: 45,33–77,69%, dan rentang 5-HMF: 0,15–3,19 mg kg⁻¹) (Ávila et al., 2019).

Indonesia memiliki berbagai macam jenis madu yang berbeda-beda setiap daerah. Lebah penghasil madu juga memiliki jenis yang berbeda-beda, diantaranya lebah apus dan lebah trigona (Lamerlabel, 2011). Madu jenis trigona memiliki asam amino sistein lebih banyak daripada asam amino prolin. Kandungan sistein madu trigona sekitar 34,67 ± 2,09 mg/Kg sampel sedangkan prolin sekitar 16,23 ± 5,68 mg/Kg sampel. Madu apus memiliki kadar prolin yang tinggi yaitu 145,9 ± 3,39 mg/Kg sampel (Shamsudin et al., 2019). Madu yang disimpan dapat mengalami kristalisasi karena kadar glukosa dan fruktosanya, oleh karena itu perlu dilakukan pemanasan untuk mencegah kristalisasi pada madu (Tosi et al., 2004). Manfaat lain dari pemanasan ternyata dapat meningkatkan aktivitas antioksidan pada madu komersial di Turki (Turkmen et al., 2006) dan madu di Kroasia (Šaric et al., 2013). Beberapa senyawa bioaktif seperti flavonoid dan fenolik yang berperan sebagai antioksidan pada madu akan rusak apabila dipanaskan (Nicoli et al., 1997).

Metode yang biasa digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan adalah DPPH (difenil-1-pikrilhidrazil). Elektron bebas pada senyawa radikal DPPH (difenil-1-pikrilhidrazil) akan akan berpasangan dengan hidrogen dari senyawa antioksidan sehingga DPPH (difenil-1-

pikrilhidrazil) akan menjadi senyawa yang stabil yang ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning pudar (Liang & Kitts, 2014). Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa keberadaan pigmen coklat pada akhir proses pemanasan, diduga memiliki peran yang sama dengan senyawa fenolik dan flavonoid yang mengalami perubahan selama proses pemanasan, terutama pada aktivitas antioksidan dan bioaktivitas lainnya (Nugraha et al., 2022).

Madu apus dan trigona di Indonesia memiliki beragam jenis madu, yang berasal dari daerah yang berbeda-beda. Kondisi lingkungan dan iklim yang berbeda, dapat menyebabkan kandungan yang ada dalam madu juga berbeda-beda, karena sumber makanan lebah menjadi berbeda-beda (Tosi et al., 2004). Madu lokal Indonesia seperti madu kelengkeng dan madu dari Papua memiliki nilai IC₅₀ sebesar 19.511 ppm dan 5.453 ppm, yang masih tergolong kecil (Sumarlin et al., 2014, 2018). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk membandingkan perubahan aktivitas penangkapan radikal DPPH serta pigmen coklat pada madu apus dan trigona sebelum dan setelah dipanaskan. Hal ini dapat digunakan sebagai dugaan awal perubahan aktivitas antioksidan akibat pemanasan tertentu.

2. METODE PENELITIAN

Metode untuk menentukan suhu dan waktu optimum pemanasan dilakukan dengan mencari % inhibisi pada madu dengan menggunakan DPPH (difenil-1-pikrilhidrazil), variasi suhu pemanasan pada 0, 50, 70, dan 80 °C dan variasi waktu 1-10 hari.

2.1 Material dan Instrumentasi

Akuades, DPPH (sigma), kertas saring, metanol, kuersetin (sigma), asam galat (merck), Na₂CO₃, folin ciocalteu (merck), AlCl₃ (merck), aluminum foil). Sampel madu sebanyak 10 sampel (terdiri dari madu Apus dan madu trigona) dari berbagai wilayah Indonesia. **Madu apus** : AP LK (apus lengkung); AP LMB (apus Lombok utara); AP MG (apus mangrove) MAC (madu Aceh); MG KLS (apus Kalimantan selatan). **Madu Trigona** : SL BB (trigona Sulawesi tenggara); TR BIR (trigona Sulawesi selatan); TRG BGR (trigona Bogor); TR LMB (trigona Lombok); TR SLS (trigona Sulawesi).

Oven (Mettler), spektrofotometer UV-Vis (Genesys s101), *hand* refraktometer brix ATC 0% – 80% (yierly).

2.2. Preparasi Madu Sebelum Pemanasan

Sebanyak 2 gram sampel ditempatkan pada tabung reaksi pada suhu ruang, kemudian dilarutkan dalam 10 ml akuades dan dikocok menggunakan vortex, setelah itu larutan disaring dengan kertas saring wathman no.1. Setelah itu, sampel digunakan untuk pengujian aktivitas penangkapan radikal DPPH.

2.3. Preparasi Madu Setelah Pemanasan

Sebanyak 2 gram sampel madu ditempatkan pada botol vial dan ditutup rapat, kemudian dimasukkan ke dalam oven pada temperatur 50, 70, dan 80 °C. Dalam waktu 1 sampai 10 hari masing-masing suhu dilakukan triplo. Dalam setiap waktu 24 jam, masing-masing sampel pada suhu diambil dan segera didinginkan. Masing-masing sampel kemudian dikocok dengan vortex dan disaring menggunakan kertas saring wathman No.1 kemudian dianalisis aktivitas penangkapan radikal DPPH-nya.

2.4 Uji Aktivitas Pengkapan Radikal Sebagai Persen Inhibisi

Sampel yang sudah dipreparasi dilarutkan dengan akuades sampai sebesar 1 brix dengan menggunakan refraktometer brix (*yieryi*), kemudian 1 mL sampel dicampur dengan 3 mL DPPH setelah itu campuran dikocok dengan vortex dan diinkubasi dalam keadaan gelap selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan menggunakan metanol sebagai blanko dan campuran DPPH dengan akuades sebagai kontrol. Aktivitas penangkapan radikal DPPH dihitung sebagai persen inhibisi dengan persamaan persen inhibisi sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{AC - AS}{AC} \times 100 \%$$

Dengan :

AC = Absorbansi kontrol

AS = Absorbansi sampel

Pengujian ini dilakukan pada sampel sebelum dan sesudah pemanasan pada variasi suhu 50, 70 dan 80 °C dan variasi waktu yaitu 1-10 hari sehingga pada persen inhibisi yang paling besar dijadikan sebagai suhu dan waktu optimum pemanasan madu.

2.5. Uji Nilai IC₅₀

Pengujian IC₅₀ dilakukan pada sampel sebelum pemanasan dan pada suhu 50°C, selama 9 hari (Nugraha et al., 2022). Sebanyak 500 mg sampel ditimbang lalu dilarutkan dengan menggunakan akuades dalam labu 50 mL

(konsentrasi 10.000 ppm). Deret konsentrasi dibuat variasi konsentrasi 500, 1000, 2000, 4000, 6000 dan 8000 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet 1 mL, kemudian ditambahkan dengan 3 mL DPPH 0,1 mM kemudian divortex 30 detik dan diinkubasi 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum (516 nm). Kurva dibuat dengan konsentrasi sebagai x dan % inhibisi sebagai y. Nilai IC₅₀ didapat dari persamaan $y = ax + b$ (Sumarlin et al., 2018).

2.6 Uji Kadar Pigmen Coklat

Pengujian pigmen coklat dilakukan dengan mengukur absorbansi dari ekstrak yang dilarutkan dengan akuades sebesar 1 brix pada panjang gelombang 420 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis, setiap interval 24 jam pada sampel sebelum dan sesudah pemanasan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Persen Inhibisi

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui suhu dan waktu optimum pemanasan dengan mengamati perubahan aktivitas penangkapan radikal DPPH (persen inhibisi) madu pada variasi waktu dan suhu dengan konsentrasi sebesar 1 brix. Waktu 0 menunjukkan aktivitas penangkapan radikal tanpa dipanaskan.

Uji-H menghasilkan nilai $p < 0,05$ yang menunjukkan ada perbedaan yang signifikan terhadap persen inhibisi pada setiap variasi suhu dan waktu. Ketidakstabilan kenaikan aktivitas antioksidan pada setiap harinya (Gambar 1), dimungkinkan terjadi karena beberapa faktor seperti terbebasnya senyawa flavonoid dan fenolik serta terbentuknya pigmen coklat yang menyebabkan peningkatan ((Jeong et al., 2004). Hasil penelitian ini menunjukkan % inhibisi baik pada madu jenis apis maupun pada madu jenis trigona, cenderung mengalami peningkatan seiring dengan pertambahan suhu dan waktu pemanasan (Gambar 1).

Persen inhibisi baik pada madu apis maupun trigona mengalami peningkatan setelah dipanaskan, dan memiliki suhu dan waktu optimum pemanasan yang berbeda-beda tiap sampel untuk mendapatkan aktivitas antioksidan terbesar (Tabel 1). Perbedaan ini, dapat disebabkan karena kandungan pada setiap madu yaitu fenolik, flavonoid dan pigmen coklat yang berbeda-beda (Tosi et al., 2004).

Perubahan struktur flavonoid juga mempengaruhi kemampuan penangkapan radikal oleh DPPH yang pada akhirnya dapat mempengaruhi sifat antioksidan. Hilangnya gugus karbonil pada C4 yang terkonjugasi dengan gugus hidroksil pada ikatan rangkap di cincin 2-3 pada cincin C dapat menyebabkan

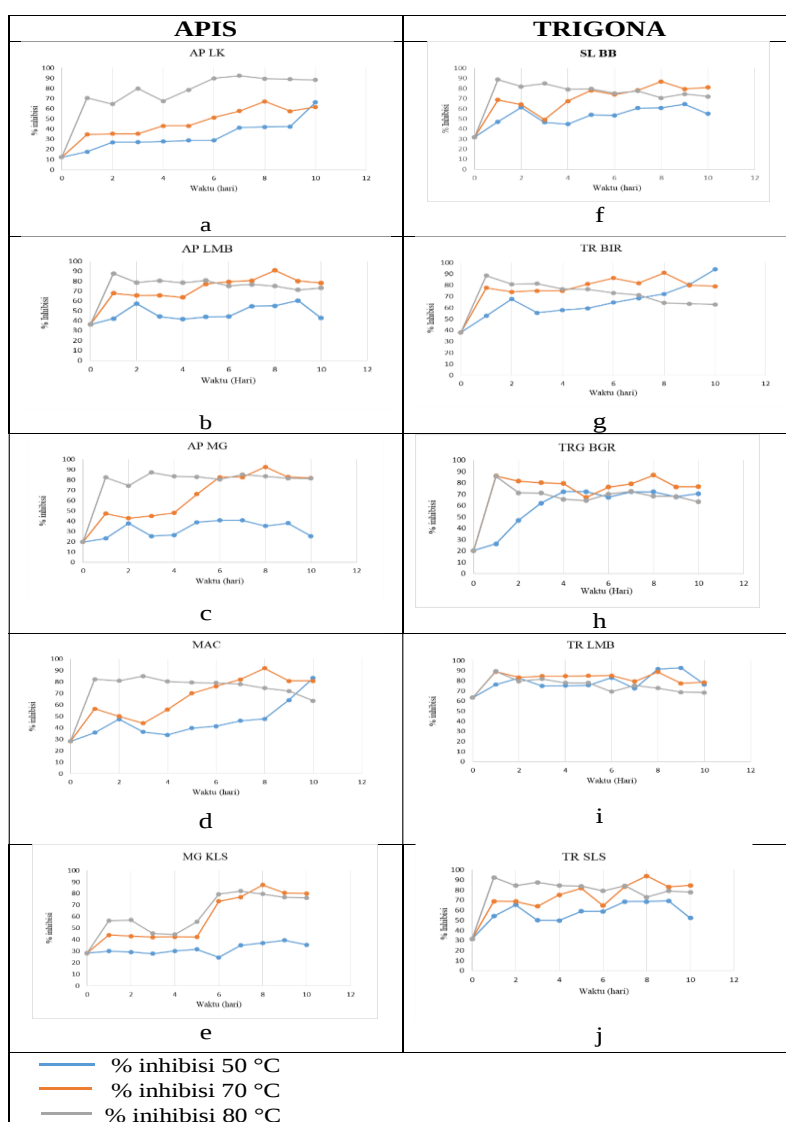
penurunan aktivitas antioksidan (Arifin & Ibrahim, 2018).

Penelitian juga telah dilakukan terhadap 31 sampel madu akasia dan 8 sampel madu kastanye yang dilakukan dua temperatur – pada 23°C (suhu kamar) dan setelah 5 menit pemanasan pada 95°C menunjukkan. Hasil yang diperoleh menunjukkan perubahan aktivitas antioksidan dan kandungan fenolik total yang tidak merata di antara masing-masing sampel, yaitu pada beberapa sampel aktivitas antioksidan menurun setelah pemanasan, sementara pada sampel lainnya justru meningkat (Šaric et al., 2013).

Senyawa aglikon flavonoid dan aglikon fenolik pada penelitian lain dilaporkan memiliki antioksidan yang lebih tinggi daripada bentuk glikosidanya (Csepregi et al., 2016). Senyawa aglikon flavonoid juga memiliki kelebihan yaitu lebih mudah diserap oleh tubuh di usus halus

karena strukturnya yang lebih sederhana, sedangkan glikosida flavonoid butuh didegradasi terlebih dahulu oleh enzim atau bakteri pada usus, sehingga penyerapannya membutuhkan waktu yang lebih lama (Kumar & Pandey, 2013).

Antara Madu apis dan Trigona pada sampel yang diuji pada penelitian ini menunjukkan kecenderungan yang hampir sama. Artinya semakin tinggi suhu maka kecenderungan adanya peningkatan inhibisi, meskipun di beberapa waktu ada persilangan antar suhu. Fenomena ini dijelaskan bahwa hal ini dimungkinkan karena berbagai alasan seperti peningkatan total fenolik, total flavonoid pada sampel. Meskipun ada sampel yang mengalami penurunan total fenolik dan flavonoid setelah pemanasan, aktivitas antioksidan pada madu tetap meningkat (Nugraha et al., 2022).



Gambar 1. Grafik % Inhibisi madu di berbagai suhu dan waktu (a) % inhibisi AP LK; (b) % inhibisi AP LMB; (c) % inhibisi AP MG; (d) % inhibisi MAC; (e) % inhibisi MG KLS; (f) % inhibisi SL BB; (g) % inhibisi TR BIR; (h) % inhibisi TRG BGR; (i) % inhibisi TR LMB; (j) % inhibisi TR SLS

Selain itu, fenomena tersebut menunjukkan ada senyawa lain yang mempengaruhi aktivitas inhibisi menggantikan senyawa fenolik dan flavonoid yang rusak selama pemanasan. Salah satunya yaitu pigmen coklat, merupakan senyawa hasil reaksi Maillard yang terbentuk dari kondensasi antara gula pereduksi dan asam amino pada madu yang dipanaskan (Turkmen et al., 2006). Salah satu senyawa pemberi warna coklat yang dapat berperan sebagai antioksidan yaitu Pirolotiazolat (Noda et al., 2016). Senyawa ini terbentuk dari sistein dengan glukosa (Yanagimoto et al., 2002).

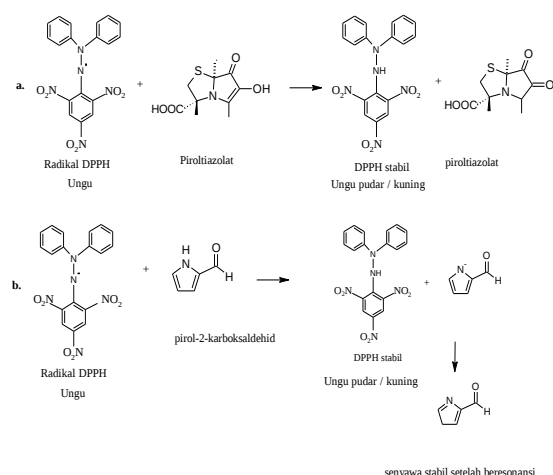
Pirolotiazolat memiliki aktivitas antioksidan 187 ± 3.0 mg Trolox eq/gram sampel (Noda et al., 2016). Asetilpirol juga merupakan senyawa hasil reaksi Maillard yang berfungsi sebagai antioksidan, terbentuk dari glukosa dan prolin (Yanagimoto et al., 2002). Madu jenis trigona memiliki asam amino sistein lebih banyak daripada prolin, kandungan sistein madu trigona sekitar $34,67 \pm 2,09$ mg/Kg sampel dan prolin sekitar $16,23 \pm 5,68$ mg/Kg sampel (Shamsudin et al., 2019).

Tabel 1. Waktu dan suhu optimum pemanasan Madu

No	Sampel	Waktu dan Suhu Optimum Pemanasan	Persen Inhibisi Sebelum Pemanasan (%)	Persen Inhibisi Optimum (%)	Persen Kenaikan (%)
APIS					
1	AP LK	hari ke-7 suhu 80 °C	$12,55 \pm 2,4$	$92,31 \pm 0,31$	635
2	AP LMB	hari ke-8 suhu 70 °C	$36,14 \pm 1,7$	$90,97 \pm 0,16$	150
3	AP MG	hari ke-8 suhu 70 °C	$19,70 \pm 1,2$	$92,85 \pm 0,16$	371
4	MAC	hari ke-8 suhu 70 °C	$28,19 \pm 1,4$	$91,86 \pm 0,31$	225
5	MG KLS	hari ke-8 suhu 70 °C	$28,28 \pm 1,1$	$87,35 \pm 0,31$	208
TRIGONA					
6	SL BB	hari ke-1 suhu 80 °C	$31,90 \pm 2,2$	$88,87 \pm 0,13$	179
7	TR BIR	hari ke-10 suhu 50 °C	$38,07 \pm 0,2$	$94,00 \pm 0,62$	146
8	TRG BGR	hari ke-8 suhu 70 °C	$20,42 \pm 0,7$	$86,85 \pm 0,23$	255
9	TR LMB	hari ke-9 suhu 50 °C	$66,40 \pm 1,4$	$93,00 \pm 0,20$	42,2
10	TR SLS	hari ke-8 suhu 70 °C	$31,40 \pm 1,8$	$93,00 \pm 0,22$	198

Keterangan : AP LK (apis lengkeng); AP LMB (apis lombok utara); AP MG (apis Mangrove) MAC (madu aceh); MG KLS (apis kalimantan selatan), SL BB (trigona sulawesi utara); TR BIR (trigona sulawesi selatan); TRG BGR (trigona bogor); TR LMB (trigona Lombok); TR SLS (trigona sulawesi).

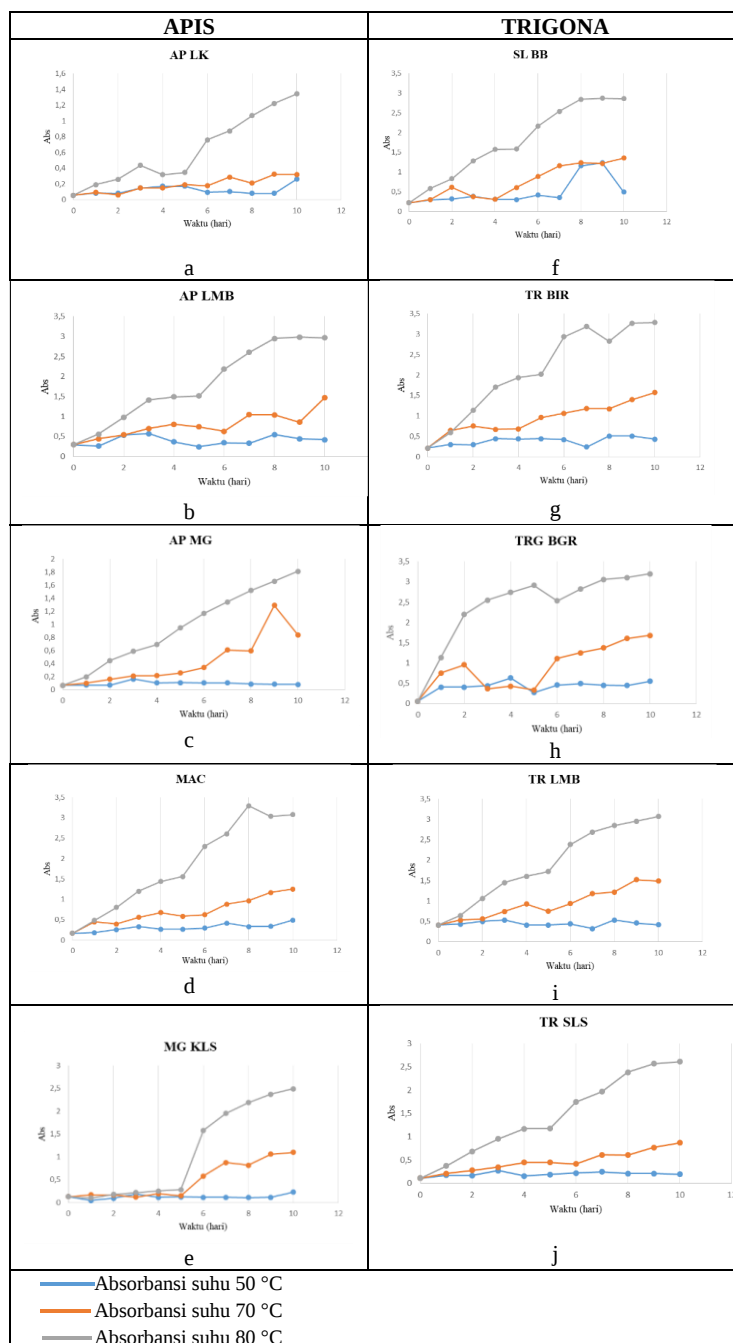
Aktivitas penangkapan radikal oleh senyawa pirolotiazolat dan asetilpirol karena kedua senyawa tersebut dapat mendonorkan atom H kepada senyawa radikal DPPH (difenil-1-pikrilhidrazil) yang berwarna ungu (Gambar 2), sehingga DPPH (difenil-1-pikrilhidrazil) menjadi senyawa yang stabil dengan warna ungu yang memudar. Pirolotiazolat memiliki enol pada strukturnya, sehingga dapat menjadi senyawa yang stabil kembali setelah mendonorkan atom H kepada DPPH (difenil-1-pikrilhidrazil) (Noda et al., 2016). Asetilpirol memiliki gugus hidroksil dan rantai rangkap pada cincin furan yang berperan penting sebagai aktivitas antioksidan, sehingga ketika atom H didonorkan kepada DPPH (difenil-1-pikrilhidrazil) senyawa ini mengalami delokalisasi elektron untuk menjadi stabil kembali (Kundu & Pramanik, 2020).



Gambar 2. Reaksi senyawa pigmen coklat sebagai penangkap radikal bebas DPPH (a) pirolotiazolat + DPPH (b)asetilpirol + DPPH

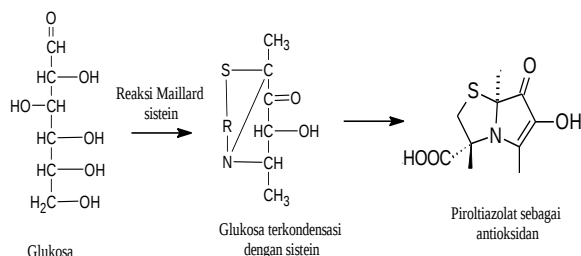
Pigmen coklat didapatkan cenderung mengalami peningkatan seiring dengan pertambahan suhu dan waktu pemanasan (Gambar 3), jika dibandingkan dengan pola kenaikan pada grafik % inhibisi (Gambar 1), sampel MG KLS dan AP LK memiliki pola yang hampir sama antara pola kenaikan pigmen coklat dengan persen inhibisi. Hal ini mungkin dikarenakan, total fenolik dan total flavonoid pada kedua sampel tersebut tergolong sangat kecil sehingga aktivitas antioksidannya lebih dipengaruhi oleh pigmen coklat yang terbentuk.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pembentukan pigmen coklat, terjadi peningkatan pada semua sampel madu antara 32 – 1.428%. Keberadaan pigmen coklat pada akhir proses pemanasan sampel madu, diduga memiliki peran yang sama dengan senyawa fenolik dan flavonoid yang mengalami perubahan selama proses pemanasan terutama pada aktivitas antioksidan dan bioaktivitas lainnya (Nugraha et al., 2022).



Gambar 3. Grafik absorbansi pigmen coklat di berbagai waktu dan suhu (a) Absorbansi AP LK; (b) Absorbansi AP LMB; (c) Absorbansi AP MG; (d) Absorbansi MAC; (e) Absorbansi MG KLS; (f) Absorbansi SL BB; (g) Absorbansi TR BIR; (h) Absorbansi TRG BGR; (i) Absorbansi TR LMB; (j) Absorbansi TR SLS

Aktivitas antioksidan dapat meningkat dimungkinkan karena terbentuknya senyawa pigmen coklat yang merupakan hasil dari reaksi Maillard (Nayik & Nanda, 2016). Pirolotiazolat merupakan salah satu pigmen coklat yang diklaim memiliki aktivitas antioksidan hasil reaksi glukosa dengan sistein (Gambar 4).



Gambar 4. Reaksi Maillard (Noda et al., 2016)

Gugus amin dari asam amino bagian protein dan senyawa lain yang mengandung gugus amin bereaksi secara non enzimatis dengan gula pereduksi dan menghasilkan senyawa-senyawa baru seperti pirolotiazolat (Gambar 4) (Noda et al., 2016). Salah satu contoh MRPs (*Maillard Reaction Product*) adalah melanoidin yang berperan sebagai warna coklat pada makanan selain itu senyawa ini juga memiliki aktivitas antioksidan (Rufián-Henares & Morales, 2007) yang dapat diukur pada panjang gelombang 420 nm (de la Cueva et al., 2017).

Nilai IC₅₀ Madu Sebelum dan Sesudah Pemanasan (Pada Suhu dan Waktu Optimum)

Nilai IC₅₀ adalah konsentrasi yang dapat meredam 50 % radikal bebas DPPH, semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Penentuan IC₅₀ dilakukan pada sampel sebelum dipanaskan dan sampel yang telah dipanaskan pada suhu dan waktu optimum. Suhu dan waktu optimum berdasarkan data total fenolik tertinggi yang telah diuji sebelumnya yaitu suhu 50°C selama 9 hari (Nugraha et al., 2022). Pengujian dilakukan triplo dengan variasi konsentrasi yang digunakan adalah 500, 1000, 2000, 4000, 6000 dan 8000 ppm. Grafik hubungan antara konsentrasi dengan % inhibisi akan menghasilkan persamaan $y = ax + b$, kemudian IC₅₀ didapatkan dari persamaan tersebut.

Berdasarkan hasil analisis sampel madu jenis apis maupun trigona mengalami peningkatan nilai IC₅₀ sebelum dipanaskan dengan madu setelah dipanaskan pada suhu dan waktu yang optimum, madu jenis trigona memiliki rata-rata nilai IC₅₀ lebih besar dibandingkan madu apis (Tabel 2). Hal ini sesuai dengan penelitian madu trigona dan apis di

Malaysia yang menyatakan madu trigona memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan madu apis karena total fenolik dan flavonoidnya yang lebih tinggi (Ismail et al., 2021). Uji-Z menunjukkan nilai $p < 0,05$ artinya terdapat perbedaan yang signifikan pada IC₅₀ madu sebelum dipanaskan dengan IC₅₀ madu setelah dipanaskan pada suhu dan waktu optimum. Madu yang memiliki nilai IC₅₀ paling tinggi adalah madu jenis trigona TR LMB dengan peningkatan 59,17 % memiliki nilai IC₅₀ setelah dipanaskan $3.435 \pm 29,3$ ppm. Sampel ini merupakan sampel dengan nilai total fenolik terbesar setelah dipanaskan yaitu $7,097 \pm 0,237$ (Nugraha et al., 2022).

Tabel 2. Perubahan IC₅₀ sebelum dan setelah pemanasan

No	Sampel	IC ₅₀ Sebelum Pemanasan (ppm)	IC ₅₀ Pada Suhu & Waktu Optimum (ppm)	Persentase Kenaikan (%)
APIS				
1	AP LK	45.784 $\pm$ 9,70	32.327 $\pm$ 37,8	29,39
2	AP LMB	16.924 $\pm$ 10,79	5.599 $\pm$ 12,50	66,92
3	AP MG	30.641 $\pm$ 36,70	11.112 $\pm$ 14,73	63,73
4	MAC	26.887 $\pm$ 39,51	11.989 $\pm$ 25,5	55,41
5	MG KLS	29.743 $\pm$ 35,60	17.640 $\pm$ 35,0	40,69
Rata-rata		30.595	15.733	48,58
TRIGONA				
1	SL BB	19.591 $\pm$ 32,50	8.244 $\pm$ 19,70	57,92
2	TR BIR	13.731 $\pm$ 17,01	6.586 $\pm$ 35,60	52,04
3	TRG BGR	31.177 $\pm$ 19,00	10.032 $\pm$ 16,50	21,15
4	TR LMB	8.412 $\pm$ 24,30	3.435 $\pm$ 29,30	59,17
5	TR SLS	8.561 $\pm$ 20,31	5.575 $\pm$ 3,53	34,88
Rata-rata		16.294	6.774	58,43

Keterangan : AP LK (apis Lengkung); AP LMB (apis Lombok utara); AP MG (apis mangrove) MAC (madu Aceh); MG KLS (apis Sulawesi selatan), SL BB (trigona Sulawesi Utara); TR BIR (trigona Sulawesi Selatan); TRG BGR (trigona Bogor); TR LMB (trigona Lombok); TR SLS (trigona Sulawesi).

Nilai IC₅₀ pada TR LMB ini, lebih besar dibandingkan dengan madu asal Indonesia lain, yaitu madu kelengkeng sebesar yang memiliki IC₅₀ 19.511,64 ppm (Sumarlin et al., 2018), dan madu asal Papua yang memiliki nilai IC₅₀ 5.453,75 ppm (Sumarlin et al., 2014). Madu yang memiliki nilai IC₅₀ paling rendah adalah sampel madu AP LK dengan nilai IC₅₀ setelah dipanaskan $32.327 \pm 37,8$ ppm, namun madu ini masih memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan madu komersil asal Jawa Tengah yang memiliki nilai IC₅₀ 745.750 ppm (Sumarlin et al., 2014).

4. KESIMPULAN

Pemanasan pada suhu dan waktu optimum dapat meningkatkan kemampuan penangkapan radikal DPPH pada madu jenis apis maupun trigona. Nilai IC₅₀ paling kuat terdapat pada madu trigona (TR LMB) dengan peningkatan 59,17 %. Hasil penelitian ini menunjukkan persen inhibisi baik pada madu jenis apis maupun pada madu jenis trigona, cenderung mengalami peningkatan seiring dengan pertambahan suhu dan waktu pemanasan. Pigmen coklat didapatkan cenderung mengalami peningkatan seiring dengan pertambahan suhu dan waktu pemanasan. Dengan demikian, madu jenis Apis dan Trigona memiliki senyawa bioaktif dengan kemampuan menangkap radikal DPPH diantaranya terbentuknya pigmen coklat serta berpotensi meningkat kemampuan antioksidannya melalui pemanasan pada suhu tertentu.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifin, B., & Ibrahim, S. (2018). Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan. *Jurnal Zarah*, 6(1), 21–29. <https://doi.org/10.31629/zarah.v6i1.313>
- Ávila, S., Lazzarotto, M., Hornung, P. S., Teixeira, G. L., Ito, V. C., Bellettini, M. B., Beux, M. R., Beta, T., & Ribani, R. H. (2019). Influence of stingless bee genus (*Scaptotrigona* and *Melipona*) on the mineral content, physicochemical and microbiological properties of honey. *Journal of Food Science and Technology*, 56(10), 4742–4748. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03939-8>
- Csepregi, K., Neugart, S., Schreiner, M., & Hideg, É. (2016). Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols. *Molecules*, 21(2), 208. <https://doi.org/10.3390/molecules21020208>
- de la Cueva, S., Seiquer, I., Mesías, M., Rufián-Henares, J., & Delgado-Andrade, C. (2017). Evaluation of the Availability and Antioxidant Capacity of Maillard Compounds Present in Bread Crust: Studies in Caco-2 Cells. *Foods*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.3390/foods6010005>
- Ismail, N. I., Kadir, M. R. A., Zulkifli, R. M., & Mohamed, M. (2021). Comparison Of Physicochemical, Total Protein And Antioxidant Profiles Between Malaysian Apis And Trigona Honeys. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 25(2), 243–256.
- Jeong, S.-M., Kim, S.-Y., Kim, D.-R., Jo, S.-C., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S.-C. (2004). Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Activity of Extracts from Citrus Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3389–3393. <https://doi.org/10.1021/jf049899k>
- Khan, M. K., Paniwnyk, L., & Hassan, S. (2019). Polyphenols as Natural Antioxidants: Sources, Extraction and Applications in Food, Cosmetics and Drugs. In *Plant Based Green Chemistry 2.0* (pp. 197–235). https://doi.org/10.1007/978-981-13-3810-6_8
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kundu, T., & Pramanik, A. (2020). Expedient and eco-friendly synthesis of new multifunctionalized pyrrole derivatives and evaluation of their antioxidant property. *Bioorganic Chemistry*, 98, 103734. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103734>
- Lamerlabel, J. (2011). Mengenal Jenis-Jenis Lebah Madu, Produk-Produk dan Cara Budidaya. *LOGIKA: Jurnal Ilmu Pengetahuan Dan Teknologi*, 9(1), 70–78.
- Liang, N., & Kitts, D. (2014). Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules*, 19(11), 19180–19208. <https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
- Nayik, G. A., & Nanda, V. (2016). Effect of thermal treatment and pH on antioxidant activity of saffron honey using response surface methodology. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(1), 64–70. <https://doi.org/10.1007/s11694-015-9277-9>
- Nicoli, M. C., Anese, M., Manzocco, L., & Lericci, C. R. (1997). Antioxidant Properties of Coffee Brews in Relation to the Roasting Degree. *LWT - Food Science and Technology*, 30(3), 292–297. <https://doi.org/10.1006/food.1996.0181>
- Noda, K., Terasawa, N., & Murata, M. (2016). Formation scheme and antioxidant activity of a novel Maillard pigment, pyrrolothiazolate, formed from cysteine and glucose. *Food & Function*, 7(6), 2551–

2556.
<https://doi.org/10.1039/C5FO01625H>
- Nugraha, A. T., Sumarlin, L. O., Muawanah, A., Amilia, N., & Wulandari, M. (2022). The Total Phenolic, Total Flavonoid, And Brown Pigment In Honey Before And After Heating. *Elkawnie: Journal of Islamic Science and Technology*, 8(1), 190–208.
- Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2007). Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Research International*, 40(8), 995–1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.05.002>
- Putu, N., Savitri, T., Hastuti, E. D., Widodo, S., & Suedy, A. (2017). Kualitas Madu Lokal dari Beberapa Wilayah di Kabupaten Temanggung The Local Honey Quality of Some Areas in Temanggung. *Buletin Anatomi Dan Fisiologi*, 2(1), 58–66.
- Šaric, G., Markovic, K., Vukicevic, D., Lez, E., Hruskar, M., & Vahcic, N. (2013). Changes of antioxidant activity in honey after heat treatment. *Czech Journal of Food Sciences*, 31(6), 601–606. <https://doi.org/10.17221/509/2012-CJFS>
- Shamsudin, S., Selamat, J., Sanny, M., Bahari, S., Jambari, N. N., & Khatib, A. (2019). A Comparative Characterization of Physicochemical and Antioxidants Properties of Processed Heterotrigona itama Honey from Different Origins and Classification by Chemometrics Analysis. *Molecules*, 24(21), 3898. <https://doi.org/10.3390/molecules24213898>
- Sumarlin, L. O., Muawanah, A., Wardhani, P., & Masitoh. (2014). Anticancer and Antioxidant Activity of Honey in the Market Local Indonesia. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 19(3), 136–144.
- Sumarlin, L. O., Tjachja, A., Octavia, R., & Ernita, N. (2018). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Madu Cair dan Madu Bubuk Lokal Indonesia. *Al - Kimia*, 6(1), 10–23.
- Tosi, E. A., Ré, E., Lucero, H., & Bulacio, L. (2004). Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *LWT - Food Science and Technology*, 37(6), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.005>
- Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E. S., & Velioglu, Y. S. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, 95(4), 653–657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.004>
- Yanagimoto, K., Lee, K.-G., Ochi, H., & Shibamoto, T. (2002). Antioxidative activity of heterocyclic compounds formed in Maillard reaction products. *International Congress Series*, 1245, 335–340. [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(02\)01007-5](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(02)01007-5)