

# PENGARUH METODE EKSTRAKSI TERHADAP RENDEMEN, KADAR FLAVONOID TOTAL, DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK FLAVONOID CAIR MADU KALIANDRA

Ichda Chayati<sup>1</sup> & Isnatin Miladiyah<sup>2</sup>

[ichda\\_chayati@uny.ac.id](mailto:ichda_chayati@uny.ac.id) & [isnatin@uii.ac.id](mailto:isnatin@uii.ac.id)

<sup>1</sup> Fakultas Teknik, Universitas Negeri Yogyakarta

<sup>2</sup> Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui: 1) proses pembuatan ekstrak flavonoid madu kaliandra (EFMK) cair, 2) rendemen, kadar flavonoid total, dan aktivitas antioksidan dari EFMK cair.

Bahan baku madu didapat dari peternak lebah di Bukit Menoreh, Kulon Progo, Yogyakarta. Ekstrak flavonoid madu kaliandra menggunakan metode ultrasonik, *magnetic stirrer*, dan *solid phase extraction*. Analisis kadar flavonoid total menggunakan analisis aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) menurut Hussein dkk (2011), dan kapasitas antioksidan metode FRAP (*ferric ion reducing antioxidant power*) dilakukan menurut metode Aljadi & Kamaruddin (2004). Analisis data dilakukan dengan LSD untuk mengetahui perbedaan antar sampel.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa: 1) pembuatan ekstrak cair menggunakan metode *solid phase extraction*, ultrasonik, dan stirrer; variasi bahan pelarut adalah metanol, *aquades*-HCl, metanol-*aquades*-HCl, dan *aquades*-asam sitrat; 2) rendemen EFMK cair tertinggi diperoleh dengan pelarut metanol-*aquades*-HCl, dan *aquades*-asam sitrat, baik dengan metode stirrer maupun sonikasi, rendemen EFMK cair terendah dengan metode *solid phase extraction*; EFMK cair dengan penghambatan DPPH tertinggi adalah dengan metode *solid phase extraction*, terendah dengan pelarut *aquades*-asam sitrat baik metode stirrer maupun sonikasi; EFMK cair dengan aktivitas antioksidan FRAP tertinggi adalah dengan pelarut metanol-*aquades*-HCl baik metode stirrer maupun sonikasi; sedangkan yang terendah adalah EFMK cair dengan metode *solid phase extraction*.

**Kata kunci:** Ekstrak flavonoid, madu kaliandra, aktivitas antioksidan

## **PENDAHULUAN**

Seiring dengan perubahan gaya hidup, orang banyak mencari makanan dan minuman yang memberikan kesehatan bagi tubuh, tidak hanya sekedar mengenyangkan dan menghilangkan haus. Hal ini mendorong perkembangan makanan dan minuman fungsional secara pesat. Banyak sekali minuman fungsional yang beredar, salah satunya adalah minuman fungsional yang mengandung antioksidan. Selama ini belum ditemukan minuman fungsional tinggi antioksidan yang dibuat dari ekstrak flavonoid madu Indonesia, sehingga penelitian ini diperlukan untuk mengetahui jenis madu yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi, kaitannya dengan kandungan flavonoid di dalam madu, dan cara mengekstraksi kandungan flavonoid tersebut sehingga didapat ekstrak flavonoid madu berbentuk cair dan bubuk.

Tujuan umum dari penelitian ini adalah memproduksi ekstrak flavonoid madu kaliandra (EFMK) sebagai ingredient minuman fungsional tinggi antioksidan. Untuk mencapai target tersebut diperlukan beberapa tahap penelitian dengan tujuan spesifik sebagai berikut : mengetahui proses pembuatan EFMK cair dengan metode solid phase extraction, ekstraksi ultrasonic dan magnetic stirrer, mengetahui kadar flavonoid total, aktivitas antioksidan metode DPPH dan FRAP dari EFMK cair.

## **Metode Penelitian**

### **1. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini menggunakan dua laboratorium, yaitu: Lab. Kimia Bahan Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk analisis flavonoid dan aktivitas antioksidan dan Lab. Biologi Farmasi Universitas Islam Indonesia untuk pembuatan ekstrak cair.

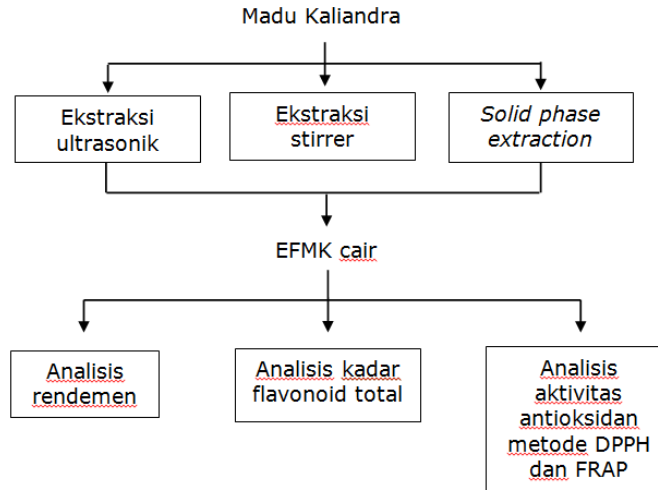
### **2. Sampel dan Bahan Kimia**

Madu yang digunakan adalah madu kaliandra dari Pegunungan Menoreh, Kulonprogo, Yogyakarta, berasal dari 2 kali panen (2 batch). Madu dikemas dalam botol bening, ditutup

kertas koran untuk menghindari sinar matahari. Madu disimpan di suhu ruang sampai saat digunakan. Semua bahan kimia merupakan *analitic grade* dengan merk Merck dan BDH. Amberlite XAD-2 dari Supelco, sedangkan TPTZ, DPPH, Trolox, dan asam galat dari Sigma.

### 3. Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Alur penelitian

### 4. Pembuatan EFMK

Prosedur pembuatan EFMK *solid phase extraction* adalah sebagai berikut: 50 gr madu dilarutkan dengan 100 ml aquades yang diasamkan dengan HCl ( $\text{pH} = 2$ ). Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 250 ml dan ditambahkan air asam sampai tanda. Larutan disaring dengan kapas dan dilewatkan kolom Amberlite TM XAD-2 resin (tinggi 250 mm diameter eksternal 20 mm), pada kecepatan aliran 2 ml/menit. Senyawa fenolik akan tertahan dalam kolom. Kolom dicuci dengan air asam 100 ml. Cairan dibuang. Kolom dicuci untuk kedua kalinya dengan 200 ml air suling netral. Cairan dibuang. Kolom dicuci untuk ketiga kalinya dengan 300 ml metanol murni. Methanol akan memisahkan komponen fenolik dalam kolom. Metanol dikumpulkan kembali dalam gelas atau erlenmeyer bersih dan dilewatkan ke 500 ml rotary evaporator. Larutan metanol diuapkan sampai kering dalam rotary evaporator pada 45°C (Rizzardini, 2009).

Prosedur pembuatan EFMK metode sonikasi dan magnetic stirrer adalah sebagai berikut: 50 gr madu dilarutkan dengan 250 ml aquades yang diasamkan dengan HCl (pH = 2) atau 40% metanol/aquades asam (v/v) dan dicampur dengan magnetic stirrer atau sonikator selama 15 menit. Larutan diuapkan sampai kental dalam rotary evaporator pada 45oC (Biesaga & Pyrzyn, 2013).

## **5. Analisis Kadar Flavonoid Total**

Satu mililiter sampel madu dalam air (0,1-0,4 g/ml) dicampur dengan 1 ml aluminium chloride 2% dalam metanol. Setelah didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang, absorbansi ditera pada panjang gelombang 430 nm. Standar menggunakan konsentrasi quercetin berbeda-beda antara 5-114 µg/ml. Kadar flavonoid dinyatakan dalam mg quercetin equivalent (RE) per 100 gram (Al dkk, 2009).

## **6. Analisis Aktivitas Antioksidan Metode DPPH**

Larutan madu (0,75 ml, konsentrasi 0,1-0,4 g/ml) dicampur dengan 1,5 ml larutan DPPH dalam metanol 0,09 mg/ml. Campuran didiamkan 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap dan selanjutnya ditera absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan sampel dihitung dengan rumus:

$$\text{Antiradical activity (\%)} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

Dimana Ac adalah absorbansi kontrol dan As adalah absorbansi sampel(Hussein dkk, 2011).

## **7. Analisis Aktivitas Antioksidan Metode FRAP**

Penelitian ini menggunakan pengujian ferric reducing/antioxidant power (FRAP), yang dikembangkan oleh Benzie & Strain(1996)sebagai metode langsung untuk menentukan kekuatan antioksidan total dari cairan biologis. Pada pH rendah, reduksi kompleks ferric tripyridyltriazine (Fe-TPTZ) menjadi bentuk ferro, yang mempunyai warna biru yang intens, dapat diketahui dengan penentuan perubahan absorpsi pada panjang gelombang 593 nm. Reduksi bersifat non-spesifik, dimana

pertengahan reaksi yang mempunyai potensi redoks yang lebih rendah, di bawah kondisi reaksi, daripada yang pertengahan reaksi berikutnya yang mengubah ferri (Fe(III)) menjadi ferro (Fe (II)). Secara ringkas, 300 ml reagen FRAP dimasukkan ke dalam tabung, tambahkan 10 µl sampel madu (10%, 0,1 g/ ml), sampel ekstrak madu (0,25-4,0 mg/ml), dan standar dengan kadar FeII yang diketahui (1000mM Fe SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, Merck) dimasukkan ke dalam tabung, dengan aquades 10 ml digunakan sebagai blanko. Tabung divortex dan diinkubasi pada 37oC selama 30 menit dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 593 nm. Nilai absorbansi diubah menjadi nilai FRAP (mM) dengan rumus:

$$\frac{\Delta A_{593nm} \text{ test sample}}{\Delta A_{593nm} \text{ standard}} \times \text{FRAP value of standard (1000 } \mu\text{M)}$$

(Aljadi & Kamaruddin, 2004)

## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

### 1. Proses Pembuatan Ekstrak Cair

Pembuatan ekstrak flavonoid madu kaliandra (EFMK) berbentuk cair menggunakan tiga macam pelarut dan tiga metode ekstraksi. Pelarut yang digunakan adalah metanol, aquades-HCl, dan metanol-aquades-HCl, sedangkan metode ekstraksi ada tiga macam yaitu solid phase extraction, stirrer, dan sonikasi. Metode solid phase extraction menghasilkan ekstrak yang tidak mengandung gula karena gula terikat pada kolom Amberlite, sedangkan metode yang lain menghasilkan ekstrak yang masih mengandung gula. Proses penghilangan pelarut dilakukan dengan menggunakan rotary evaporator. Kolom Amberlite yang digunakan untuk pembuatan EFMK metode *solid phase extraction* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kolom untuk pembuatan EFMK metode solid phase extraction

## 2. Sifat Fisik Ekstrak Flavonoid Madu Kaliandra

Hasil pengamatan sifat fisik EFMK dengan berbagai metode ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh pelarut dan metode ekstraksi terhadap sifat fisik EFMK

No	Pelarut	Metode Ekstraksi	Sifat Fisik
1	Metanol	Fase solid	Coklat, encer, tanpa aroma
2	Aquades-HCl	Stirrer	Coklat tua, kental, aroma caramel
3	Metanol-aquades-HCl	Stirrer	Coklat, kental, aroma gula
4	Aquades-sitrat	Stirrer	Kuning, kental, aroma madu
5	Aquades-HCl	Sonikator	Coklat tua, kental, aroma caramel
6	Metanol-aquades-HCl	Sonikator	Coklat, kental, aroma netral
7	Aquades-sitrat	Sonikator	Kuning, kental, aroma madu

Ekstrak flavonoid madu kaliandra yang diperoleh dengan metode ekstraksi fase solid diperoleh cairan yang berwarna coklat, encer, dan tanpa aroma. Produk berbentuk cair dan encer ini disebabkan kolom Amberlite mengikat gula sehingga sudah kadar gula di dalam EFMK minimal.

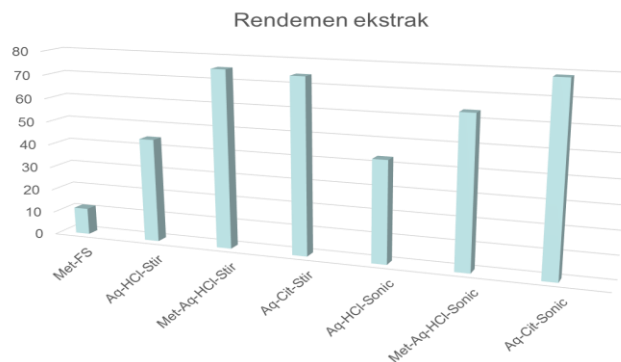
Pada EFMK dengan metode stirrer dan sonikasi, produk berbentuk kental karena masih ada gula di dalamnya. Warna coklat diperoleh karena penggunaan rotary evaporator bersuhu 50°C sehingga ekstrak mengalami pemanasan. Selain itu, warna coklat juga disebabkan oleh penggunaan HCl sehingga pH menjadi sangat rendah (pH=1), meskipun pengeringan menggunakan suhu rendah (-20°C). pH rendah ini menyebabkan flavonoid terhidrolisis sehingga berubah warna menjadi coklat.

Pada ekstrak yang menggunakan pelarut aquades-asam sitrat, EFMK yang diperoleh berwarna kuning karena pH=2,5 dan belum cukup untuk menghidrolisis flavonoid sehingga warna tetap kuning.

Hal baru dalam penelitian ini adalah penggunaan pelarut aquades-asam sitrat. Selama ini ekstraksi flavonoid selalu melibatkan metanol padahal metanol bersifat toksik kalau dikonsumsi. Jika ekstrak akan digunakan sebagai ingredient minuman fungsional, maka pelarut harus yang bersifat aman. Penggunaan pelarut aquades-asam sitrat merupakan hal baru dan bertujuan untuk mendapatkan EFMK yang aman sebagai ingredient minuman fungsional.

### 3. Rendemen Ekstrak Flavonoid Madu Kaliandra

Pengaruh metode ekstraksi terhadap rendemen EFMK dapat dilihat pada Gambar 3.

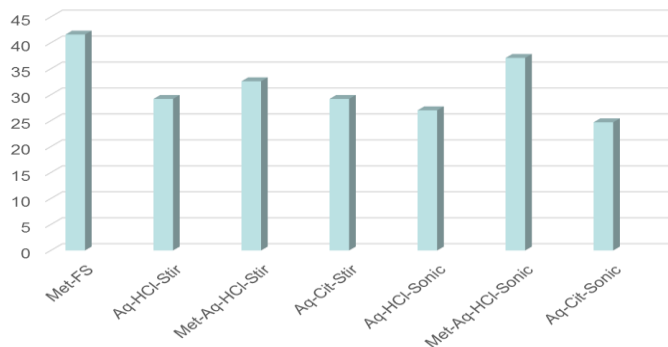


Gambar 3. Pengaruh Metode Ekstraksi terhadap Rendemen EFMK

Metode ekstraksi fase solid menghasilkan EFMK dengan jumlah paling rendah (11,4%). Hal ini bisa dijelaskan karena sebagian besar gula dalam madu telah terikat pada kolom Amberlite sehingga tidak ada di dalam EFMK. Rendemen EFMK terbesar diperoleh pada metode sonikasi dengan pelarut aquades-asam sitrat yaitu sebesar 78,7%, diikuti oleh metode stirrer dengan pelarut metanol-aquades-HCL dan aquades-asam sitrat (masing-masing sebesar 75,5% dan 74,3%). Hal ini menunjukkan menggunakan pelarut aquades-asam sitrat mampu menghasilkan rendemen EFMK yang tinggi.

#### 4. Aktivitas Antioksidan DPPH dari Ekstrak Flavonoid Madu Kaliandra

Pengaruh metode ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan DPPH dari EFMK dapat dilihat pada Gambar 4.



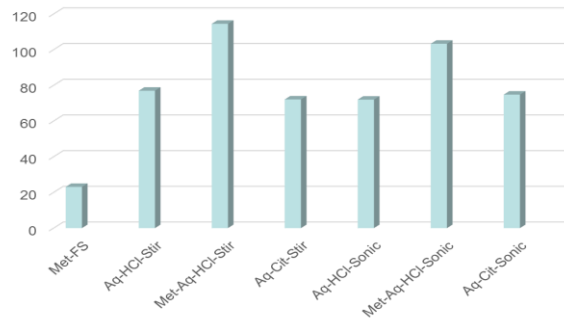
Gambar 4. Pengaruh Metode Ekstraksi terhadap Aktivitas Antioksidan DPPH

Dari Gambar 4 dapat diketahui bahwa EFMK dengan metode fase solid mempunyai aktivitas antioksidan berupa penghambatan radikal DPPH yang tertinggi yaitu 41,6%. Aktivitas antioksidan berupa penghambatan radikal DPPH tertinggi selanjutnya adalah EFMK dengan pelarut metanol-aquades-HCl baik dengan sonikasi maupun stirrer, masing-masing sebesar 37,1 dan 32,6%. Aktivitas antioksidan terendah diperoleh pada metode ekstraksi sonikasi dengan pelarut aquades-asam sitrat dengan persentase penghambatan DPPH sebesar 24,7%.



## 5. Aktivitas Antioksidan FRAP dari Ekstrak Flavonoid Madu Kaliandra

Pengaruh metode ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan FRAP dari EFMK dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Pengaruh Metode Ekstraksi terhadap Aktivitas Antioksidan FRAP

Gambar 5 menunjukkan bahwa pelarut metanol-aquades-HCl menghasilkan aktivitas antioksidan FRAP tertinggi baik dengan metode stirrer maupun sonikasi, yaitu 114,5 dan 103,3 µg/ g madu, sedangkan aktivitas terendah didapat pada pelarut metanol dengan metode fase solid.

### KESIMPULAN

1. Pembuatan ekstrak cair menggunakan metode solid phase extraction, ultrasonic, dan stirrer; variasi bahan pelarut adalah metanol, aquades-HCl, metanol-aquades-HCl, dan aquades-asam sitrat
2. Rendemen EFMK cair tertinggi diperoleh dengan pelarut metanol-aquades-HCl, dan aquades-asam sitrat, baik dengan metode stirrer maupun sonikasi, rendemen EFMK cair terendah dengan metode solid phase extraction; EFMK cair dengan penghambatan DPPH tertinggi adalah dengan metode solid phase extraction, terendah dengan pelarut aquades-asam sitrat baik metode stirrer maupun sonikasi; EFMK cair dengan aktivitas antioksidan FRAP tertinggi adalah dengan pelarut metanol-aquades-HCl baik metode stirrer maupun sonikasi; sedangkan yang terendah adalah EFMK cair dengan metode *solid phase extraction*.

## Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam pembuatan ekstrak flavonoid madu kaliandra berbentuk bubuk dan perubahan flavonoid serta aktivitas antioksidannya dibandingkan madu asli

## REFERENSI

- Al, M. L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., & Bogdanov, S. (2009). Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, *112*(4), 863–867. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.055>
- Aljadi, a. M., & Kamaruddin, M. Y. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, *85*(4), 513–518. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00596-4](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00596-4)
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma ( FRAP ) as a Measure of " Antioxidant Power " : The FRAP Assay. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, *239*(0292), 70–76.
- Biesaga, M., & Pyrzyn, K. (2013). Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chemistry*, *136*, 46–54. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.095>
- Hussein, S. Z., Yusoff, K. M., Makpol, S., & Yusof, Y. A. M. (2011). Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents Increase with Gamma Irradiation in Two Types of Malaysian Honey. *Molecules*, *16*(9), 6378–6395. <http://doi.org/10.3390/molecules16086378>
- Rizzardini, G. M. (2009). US Patent-Natural Composition Based on Chilean Monofloral Honey Extract from Native Vegetable Species for Bacterial Infection Control in Vegetables at All.