

## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN DISERTASI .....	ii
<b>PERNYATAAN</b> .....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR PUBLIKASI.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	17
DAFTAR SINGKATAN .....	18
INTISARI.....	23
ABSTRACT .....	24
1. PENDAHULUAN .....	25
1.1 Latar Belakang .....	25
1.2 Rumusan Masalah .....	30
1.3 Tujuan Penelitian.....	31
1.4 Manfaat Penelitian.....	32
1.5 Kebaruan Penelitian .....	33
2. TINJAUAN PUSTAKA .....	36
2.1 Definisi, sifat, kandungan dan nilai fungsional madu .....	36
2.1.1 Karakterisasi Madu.....	37
2.1.2 Klasifikasi Madu .....	55
2.1.3 Sifat Fungsional Madu .....	59
2.2 Autentikasi Madu .....	69
2.2.1 Definisi dan Penjelasan Autentikasi.....	69

2.2.2	Teknik Autentikasi .....	76
2.3	Komponen Penanda.....	93
2.3.1	Penanda Senyawa Volatile .....	96
2.3.2	Penanda Karbohidrat .....	97
2.3.3	Penanda Fenolik .....	97
2.3.4	Penanda Asam Amino .....	99
2.3.5	Penanda Mineral dan Komponen Organik Lainnya .....	100
2.4	Landasan Teori .....	101
2.5	Hipotesis.....	105
3.	METODE PENELITIAN.....	107
3.1	Bahan Penelitian.....	107
3.2	Peralatan Penelitian .....	107
3.3	Lokasi Penelitian .....	108
3.3.1.	Pulau Sumatera.....	109
3.3.2	Kepulauan Bangka dan Belitung .....	110
3.3.3	Pulau Jawa.....	111
3.3.4	Pulau Kalimantan .....	112
3.3.5	Pulau Sulawesi.....	113
3.3.6	Pulau Nusa Tenggara Timur.....	115
3.3.7	Pulau Nusa Tenggara Barat.....	116
3.4	Tahapan Penelitian .....	117
3.5	Prosedur Penelitian.....	120
3.5.1	Tahap 1: Karakterisasi Madu Hutan Indonesia .....	120
3.5.2	Tahap 2: Autentikasi Madu Hutan Indonesia .....	120
3.5.1.	Tahap 3: Identifikasi Komponen Penanda Madu Hutan Indonesia.....	122
3.6	Metode Analisis.....	122
3.6.1	Sampling madu .....	122
3.6.2	Kadar Air .....	124
3.6.3	pH .....	124
3.6.4	Electrical Conductivity .....	124
3.6.5	Warna .....	124
3.6.6	Spektra secara FTIR .....	125
3.6.7	Kadar Gula Secara HPLC.....	126
3.6.8	Kadar Mineral.....	127
3.6.9	Total fenolik .....	129
3.6.10	Total Flavonoid .....	129

3.6.11	Aktivitas Penangkapan Radikal/ <i>Radical Scavenging Activity</i> DPPH 130	
3.6.12	Ferric reducing <i>antioxidant</i> power (FRAP).....	130
3.6.13	Aktivitas Anti-Alergi.....	131
3.6.14	Aktivitas Anti Bakteri.....	136
3.6.15	Profil Komponen Fenol .....	137
3.6.16	Spektra secara <sup>1</sup> H-NMR .....	138
3.6.17	Spektra secara LC-HRMS .....	139
3.6.18	Visualisasi dan Klasifikasi Madu Indonesia.....	141
3.7	Matriks Hubungan Rumusan Masalah, Tujuan, Hipotesis, dan Metode Penelitian.....	149
3.8	Analisis Data .....	151
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	152
4.1	Karakterisasi dan Analisis Sifat Madu Hutan Indonesia.....	152
4.1.1	Karakter Fisika kimia .....	152
4.1.2	Karakter Antioksidan.....	164
4.1.3	Kandungan Fenolik total dan flavonoid total .....	164
4.1.4	Karakter Anti-Alergi .....	168
4.1.5	Karakter Anti Bakteri .....	173
4.2	Autentikasi Madu Hutan Indonesia.....	176
4.2.1	Autentikasi madu murni terhadap madu palsu .....	177
4.2.2	Autentikasi Madu Hutan Indonesia Berdasarkan Asal Geografis	186
4.2.3	Data Antioksidan .....	189
4.2.4	Model Regresi Logisik Multinomial untuk Klasifikasi Madu Hutan Indonesia.....	191
4.2.5	Evaluasi dan Validasi Model.....	203
4.3	Identifikasi Penanda Madu Hutan Indonesia .....	206
4.3.1	Identifikasi Penanda Target.....	206
4.3.2	Identifikasi Penanda Non Target.....	210
4.4	Pembahasan Umum.....	227
5.	KESIMPULAN.....	238
5.1	Kesimpulan.....	238
5.2	Saran.....	239
	DAFTAR PUSTAKA .....	240
	LAMPIRAN.....	281



RINGKASAN DISERTASI.....	351
SUMMARY .....	363

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Beberapa penelitian yang terkait dengan autentikasi dengan madu serta keterbaruan penelitian saat ini.....	34
Tabel 2.1. Persyaratan Kualitas Madu sesuai Standar Nasional Indonesia 8664:2018 .....	38
Tabel 2.2. Persyaratan Kualitas Madu sesuai <i>Council Directive 2001/110/EC</i> .....	39
Tabel 2.3. Hasil kolaborasi kadar gula pada madu Eropa (Oddo & Piro, 2004) .....	47
Tabel 2.4. Asam Fenolik dan Flavonoid dalam Madu dari Berbagai Sumber Nektar	49
Tabel 2.5. Rata-rata kadar asam organik (mg/kg) dan standard deviasi madu dari nektar 7 jenis tanaman di Perancis (Daniele et al, 2002) .....	54
Tabel Tabel 2.6. Kriteria zona Penghambatan Penghambatan (CLSI, 2012) .....	64
Tabel 2.7. Penanda Aktivasi Sel Mast dan Basofil (He et al, 2013).....	67
Tabel 2.8. Mode vibrasi Spektra FTIR pada madu (Tewari & Irudayaraj, 2005).....	91
Tabel 3.1. Variabel Analisis Regresi Logistik Multinomial Madu Hutan Indoensia	143
Tabel 3.2. Matrik Ketepatan Klasifikasi .....	148
Tabel 3.3. Matriks hubungan antara rumusan masalah, tujuan, hipotesis, dan metode penelitian.....	149
Tabel 4.1. Karakteristik Kadar Air Madu Hutan Indonesia .....	152
Tabel 4.2. Karakteristik pH Madu Hutan Indonesia .....	154
Tabel 4.3. Korelasi Warna, Kadar Air, pH dan Electrical Conductivity Madu Hutan Indonesia .....	156

Tabel 4.4. Karakteristik Warna Madu Hutan Indonesia .....	157
Tabel 4.5. Karakteristik Electrical Conductivity (EC) Madu Hutan Indonesia .....	158
Tabel 4.6. Kadar dan Rasio Gula Madu .....	160
<i>Tabel 4.7. Rata-rata dan Standar Deviasi Parameter Antioksidan Madu Hutan Indonesia .....</i>	<i>167</i>
Tabel 4.8. Korelasi Fenolik Total, Flavonoid Total, % Penghambatan DPPH dan FRAP .....	168
Tabel 4.9. Korelasi Total Fenolik, Total Flavonoid, % Penghambatan DPPH, FRAP, B-Hexosaminidase, Produksi IgE .....	173
Tabel 4.10. Aktivitas Anti bakteri Madu Hutan Indonesia .....	174
Tabel 4.11. Korelasi pH dan Anti Bakteri Madu Hutan Indonesia .....	176
Tabel 4.12. Kisaran Panjang gelombang Spektral FTIR dan Indek Performa Region .....	182
Tabel 4.13. Hasil Analisis Diskriminan Madu Berdasarkan Kadar Gula .....	186
Tabel 4.14. Eigenanalysis dari Matrix Korelasi Parameter Kadar Air, pH dan EC..	187
Tabel 4.15. Model Regresi Logistik Multinomial Madu Hutan Indonesia .....	192
Tabel 4.16. Peluang Sampel madu Hutan Indonesia Masuk ke Kelompok Asal Geografi .....	194
Tabel 4.17. Evaluasi Kelas Model PCA-DA berdasarkan Proporsi Sampel Madu Murni dan Palsu .....	203
Tabel 4.18. Evaluasi klasifikasi setelah Cross Validation dari Kadar Gula (Glukosa, sukrosa, Fruktosa) .....	204

Tabel 4.19. Proporsi ketepatan sampel madu berdasarkan asal daerahnya berdasarkan analisis PCA-DA .....	205
Tabel 4.20. Evaluasi model Regresi Logistik Multinomial .....	206
Tabel 4.21. Kadar polifenol pada madu hutan di Indonesia .....	209
Tabel 4.22. Nilai Pergeseran Kimia Spesifik Madu Hutan Indonesia .....	215
Tabel 4.23. Validasi model PLS-DA data pengukuran menggunakan LC-QTOF ...	218
Tabel 4.24. Daftar senyawa penanda madu hutan di Indonesia berdasarkan evaluasi menggunakan LC-TOF .....	220
Tabel 4.25. Metode Klasik dan Modern yang digunakan dalam Autentikasi Madu.	228
Tabel 4.26. Hasil rata-rata parameter fisika-kimia dan biologi madu hutan di Indonesia .....	230
Tabel 4.27. Persentase jumlah sampel yang menunjukkan aktivitas anti-alergi .....	233

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Komponen yang terkandung dalam madu, proses yang mempengaruhi stabilitas madu, degradasi produk dan reaksi sekunder yang mungkin terjadi (Da Silva et al., 2016a).....	40
Gambar 2.2. Species lebah: Apis mellifera, A. cerana, A. dorsata, A. florea (dari kiri ke kanan). (Photo Institut fUr Bienenkunde, Oberursel) (Ruttner, 1988).....	59
Gambar 2.3. Fungsi Madu terhadap Kesehatan Manusia (Rao et al., 2016).....	60
Gambar 2.4. Mekanisme Alergi .....	68
Gambar 2.5 . Skema Isu Utama terkait Autentikasi Madu (Soares et al., 2017) .....	71
Gambar2.6. Diagram Ringkasan Pembagian Analisis Statistika Multivariat yang digunakan dalam Kemometrika (Granato et al, 2018). .....	80
Gambar2.7. Marker floral pada madu (Kaškonienė & Venskutonis, 2010) .....	94
Gambar3.1. Lokasi sampling Madu Hutan Indonesia.....	109
Gambar 3.2. Peta Daerah Pengambilan Sampel Madu di Sumatera .....	110
Gambar 3.3. Peta Daerah Pengambilan Sampel Madu di Bangka dan Belitung .....	111
Gambar3.4. Peta Daerah Pengambilan Sampel Madu di Banten (Java) .....	112
Gambar3.5. Peta Daerah Pengambilan Sampel Madu di Danau Sentarum, Kalimantan Barat (Kalimantan).....	113
Gambar 3.6. Peta Daerah Pengambilan Sampel Madu di Sulawesi Selatan (Sulawesi) .....	114
Gambar 3.7. Peta Daerah Pengambilan Sampel Madu di Nusa Tenggara Timur.....	116

Gambar 3.8. Peta Daerah Pengambilan Sampel Madu di NusaTenggara Barat .....	117
Gambar 3.9. Fishbone penelitian .....	119
Gambar 3.10. Diagram Alir Tahap Penelitian 2 .....	121
Gambar 3.11. Penanganan Madu Hutan Paska Panen .....	123
Gambar 3.12. Attenuated Total Reflectance (ATR) FTIR.....	126
Gambar 3.13 . Diagram alir analisis menggunakan LC-QTOF .....	141
Gambar 4.1. Ruang Warna L*a*b* Madu Hutan Indonesia menggunakan aplikasi Gamut Vision. ....	157
Gambar 4.2. Kromatogram Standar Gula dan Sampel Madu dari Bangka Belitung	159
Gambar 4.3. Bagan perbandingan konsentrasi gula pada madu hutan, madu hutan palsu dan gula komersial.....	162
Gambar 4.4. Reaksi IgE pada teknik in vitro menggunakan sel manusia U266.....	170
Gambar 4.5. Produksi IgE oleh sel U266 pada perlakuan dengan madu Sulawesi (C02), Sumatera (R04) dan Nusa Tenggara Barat (S09) dengan berbagai konsentrasi .....	170
Gambar 4.6 Aktivitas degranulasi sel RBL-2H3 pada perlakuan berbagai konsentrasi madu dari daerah bangka belitung (B04), Sulawesi (C04), Nusa Tenggara Barat (S04) dan Nusa Tenggara Timur (T07).....	171
Gambar 4.7. Mekanisme degranulasi sel mast dan pengeluaran enzim $\beta$ -hexosaminidase .....	172

Gambar 4.8. Table Kultur <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> dengan zona penghambatan pada sampel dan kontrol .....	176
Gambar 4.9. Spektra FTIR madu hutan Indonesia pada panjang gelombang mid-infrared (650-4000cm <sup>-1</sup> ).....	179
Gambar 4.10. Spektra FTIR madu hutan Indonesia vs Madu Palsu .....	179
Gambar 4.11 (a) Principle component analysis (PCA) untuk madu asli dan palsu (b) PCA untuk madu hutan dari berbagai daerah Ket. madu asli (Δ), palsu (◻) Sumatra(+), Java(△), Bangka Belitung(◻), Kalimantan (●), Sulawesi (⊕), NTT(■), and NTB(⊗), dan madu palsu (o).....	181
Gambar 4.12. PCA berdasarkan data dan rasio kadar glukosa, fruktosa dan sukrosa .....	185
Gambar 4.13. Visualisasi PCA (a) dan Loading Plot (b) berdasarkan kadar mineral dan logam berat .....	189
Gambar 4.14. Visualisasi PCA berdasarkan data kadar fenolik dalam madu Indonesia .....	190
Gambar 4.15. Kromatogram HPLC sampel madu Sumatera: asam galat, (+) katekin, 3,4 dihidroksi bensaldehid, quersetin, epigalokatekin, pinocembrin, asam 4-hidroksibensoat, crisin, galangin, sam vanilat, siringaldehid, asam ferulat, rutin (a) dan standar polifenol: asam askorbat, asam galat, (+) katekin, 3,4 dihidroksi bensaldehid, quersetin, epigalokatekin, pinocembrin, asam 4-hidroksibensoat, crisin, galangin, sam vanilat, siringaldehid, asam ferulat, rutin (b).....	207

Gambar 4.16. Spektra penuh NMR madu hutan Indonesia sebelum (A) dan sesudah pengolahan (B) .....	213
Gambar4.17. Spektra seluruh jenis madu sebelum dan setelah setelah pengolahan pada pergeseran kimia 1,6-0,6 ppm .....	213
Gambar4.18.Spektra seluruh jenis madu sebelum dan setelah pengolahan setelah pengolahan pada pergeseran kimia 3,00-1,50 ppm.....	214
Gambar4.19. Spektra seluruh jenis madu sebelum dan setelah pengolahan pada pergeseran kimia 5,3-3,1 ppm.....	214
Gambar 4.20. Spektra seluruh jenis madu setelah pengolahan pada pergeseran kimia 6,5-5,0 ppm .....	214
Gambar 4.21. Spektra seluruh jenis madu setelah pengolahan pada pergeseran kimia 9,60-7,2 ppm .....	215
Gambar 4.22 . PCA Plot madu hutan dari data LC-QTOF.....	217
Gambar 4.23. Loading Plot dari PCA (a) dan PLS-DA (b) dari komponen terdeteksi pada penggunaan LC-QTOF.....	219
Gambar 4.24. Korelasi parameter EC dengan kadar fenolik total pada madu hutan	231
Gambar 4.25. Hasil analisis parameter aktivitas antioksidan madu hutan Indonesia	231
Gambar 4.26. area pada cawan petri agar menunjukkan pertumbuhan mikroorganisme uji (Staphylococcus aureus) dihambat dengan adanya penampakan zona bulat tempat antibiotik bekerja (dibatasi lingkaran putih), zona tersebut disebut zona penghambatan dan garis putus-putus menunjukkan diameter zona hambatan .....	234

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Daftar Sampel Madu Hutan Indonesia .....	281
Lampiran 2 Gambar Refraktometer .....	284
Lampiran 3 Gambar Alat humidifier.....	284
Lampiran 4. Tabel Chataway .....	285
Lampiran 5.Tabel Hasil Pengukuran Parameter Warna Madu Hutan Indonesia .....	286
Lampiran 6. Korelasi Warna, Kadar Air, Electrical Conductivity (EC), Anti bakteri dan Kapasitas Antioksidan.....	287
Lampiran 7. Tabel Kadar Mineral dan Logam Berat Madu Hutan Indonesia .....	289
Lampiran 8. Tabel Korelasi Mineral, Warna dan parameter Antioksidan.....	290
Lampiran 9. Reagen dan Baku Kerja uji FRAP.....	334
Lampiran 10. Gambar Viabilitas Sel untuk Pengujian Anti Alergi .....	335
Lampiran 11. Kurva regresi linier model PLS madu hutan yang dipalsukan .....	336
Lampiran 12. Kurva Regresi Linier Madu+ Gula Komersial (Konsentrasi 10-50 ...	337
Lampiran 13. PCA Parameter Fisikimia .....	338
Lampiran 14. Table Data HPLC data untuk Standar Polifenol pada Panjang Gelombang 280 nm .....	338
Lampiran 15. gambar Hasil Integrasi dan Analisis Multiplet Spektra NMR Madu Hutan Indonesia .....	339
Lampiran 16. Tabel Rangkuman hasil integrasi, analisis multiplket dan perkiraan komponen kimia hasil 1H-NMR pada madu hutan Indonesia .....	346

## DAFTAR SINGKATAN

GI	:	Indek Glisemik
RDI	:	recommended daily intake
B POM RI	:	Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia
SNI	:	Standar Nasional Indonesia
IHC	:	<i>International Honey Commision</i>
PCA	:	<i>Principal Component Analysis</i>
PLS-DA	:	<i>Discriminant Partial Least Squares</i>
IG	:	Indikasi Geografis
FTIR-ATR	:	Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance
FAO	:	Food and Agricultural Organisation
WHO	:	World Health Organisation
EC	:	<i>Electrical Conductivity</i>
DPPH	:	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
FRAP	:	ferric reducing ability of plasma
GC	:	<i>gas chromatography</i>
HPLC	:	<i>high performance liquid chromatography</i>
CE	:	capillary electrophorensis
DAD	:	detektor dioda array

MIC	:	Minimum inhibitory concentration
ABTS	:	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
RH	:	kelembaban udara
APMTN	:	Asosiasi Pengusaha Madu TessoNilo
KTMHUK	:	Kelompok Tani madu Hutan Ujung Kulon
JMHU	:	Jaringan Madu Hutan Uessi
JMM	:	Jaringan Madu Hutan Mutis
JMHI	:	Jaringan Madu Hutan Indonesia
FAO	:	Food and Agriculture Organization
API	:	Ahli Perlebahan Indonesia
AR	:	<i>Allergic rhinitis</i>
ROS	:	<i>reactive oxygen species</i>
NADPH	:	<i>reduced nicotinamide- adenine dinucleotide)</i>
ORAC	:	The Oxygen Radical Absorbance Capacity
BP	:	bee pollen
IgE	:	Imunoglobulin E
PGD2	:	prostaglandin D2
IL-6	:	interleukin-6
TNF- $\alpha$	:	tumor necrosis factor-alpha
SCF	:	faktor sel induk
MC	:	mast cell

DC	:	dendritic cell
Eos	:	eosinophil
sIgE	:	specificIgE
mIgE	:	membrane binding IgE
TCR	:	T cell receptor
MHC II	:	class II major histocompatibility complex;
PGD	:	prostaglandin D;
LTC	:	leukotrie
IFTs	:	Institute of Food Technologists
NO	:	nitrat oksida
TNF- $\alpha$	:	Tumor necrosis factor- $\alpha$
MC-CPA	:	mast cell carboxypeptidase A
beta-HSD	:	beta-hexosaminidase
DC	:	Denditric Cells
HSC	:	hematopoietic stem cells
Mel	:	melanocytes; MC, mast cell
Bas	:	basophil; Eos, eosinophil
Mon	:	monocyte
SCF	:	stem cell factor
EC	:	epithelial cells
IL	:	interleukin
LTC4	:	leukotriene C4

PGD2	:	prostaglandin D2
EMA	:	Economically Motivated Adulteration-
CA	:	Cluster Analysis
PRT	:	Pattern Recognition Technique
SIMCA	:	soft independent modelling class analogy
GLM	:	General Linear Model
MLR	:	regresi logistic multinomial
PLSR	:	partial least-squares regression
MLR	:	<i>Multiple Linear Regression</i>
HCA	:	Hierarchical Cluster Analysis
RMSEP	:	root mean square error prediction
SEC	:	<i>Standard Error of Calibration</i>
SEP	:	<i>Standard Error of Prediction</i>
R	:	koefesien korelasi
SEC	:	<i>standard error of calibration</i>
SEV	:	<i>standard error of validation</i>
MAD	:	<i>minimum active dilution</i>
OPLS <sup>TM</sup> -HCA	:	OPLS <sup>TM</sup> -hierarchical cluster analysis
TP	:	<i>true positive</i>
TN	:	<i>true negative</i>
FP	:	<i>false positive</i>
FN	:	<i>false negative</i>

EC	:	Electrical Conductivity
HMF	:	Hidroksimetilfurfural
PDO	:	Protected Designation of Origin
PGI	:	Protected Geographical Identification
NMR	:	resonansi magnetik nuklir
EDA	:	Exploratory Data Analysis
SPE	:	Solid Phase Extraction
UPLC-QToF MS	:	Ultra Performance Liquid Chromatography- Quadropole-Time of Flight-Mass Spectrometer
ICP-MS	:	<i>Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometer</i>
BSA-PBS	:	Bovine Serum Albumin-ahospat Buffer Saline
TPC	:	Total Phenolic Content
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
TFC	:	Total Flavonoid Content
DNP	:	Dinitrophenil
MGO	:	metilglioksial
ANOVA	:	Analysis of Varians