

MEMBEDAH KEASLIAN MADU :

Fakta Ilmiah di Balik Pemalsuan Madu & Cara Sains Melindungi Konsumen

Madu dikonsumsi diseluruh dunia karena kualitas organoleptiknya dan manfaat nutrisi yang baik bagi kesehatan. Rasa dan nilai gizi yang tinggi dari madu alami ini membuat harganya jauh lebih tinggi dibandingkan dengan pemanis umum lainnya. Melihat harga jual madu yang tinggi dan kurangnya produksi madu pertahunnya mengakibatkan madu alami menjadi rentan terhadap pemalsuan. Akibatnya, banyak terjadi pemalsuan madu oleh beberapa oknum. Madu berada pada peringkat ketiga untuk makanan yang sering dipalsukan, setelah susu dan minyak zaitun. Praktik pemalsuan madu muncul seiring dengan meningkatnya kebutuhan madu untuk gaya hidup sehat, sehingga permintaan kebutuhan produk alami mengalami peningkatan.

Pemalsuan madu dilakukan dengan cara menambahkan larutan seperti pemanis buatan (**sirup jagung, sirup beras**), **sukrosa, glukosa, fruktosa dan air** ke dalam madu murni. Oleh karena itu, banyak orang yang tergiur membeli madu karena bisa memproduksinya dalam jumlah banyak dan menjualnya dengan harga lebih murah.

Sejalan dengan praktek tersebut maka perhatian akan autentikasi madu dan metode identifikasi secara analitik makin berkembang terutama berkaitan dengan pencampuran gula (dari berbagai jenis gula) terhadap madu alami.

Hadirnya buku ini akan memberikan pengetahuan tentang bagaimana pentingnya pengetahuan autentikasi pada madu, problem yang dihadapi, serta faktor-faktor yang mempengaruhinya. Termasuk diantaranya adalah berbagai riset mutakhir yang dikembangkan saat ini berkenaan dengan metode-metode mengidentifikasinya. Dengan demikian, akan memberikan wawasan kepada masyarakat secara umum untuk menghadirkan dan **menikmati madu alami yang berkhasiat tinggi**.



UIN JAKARTA PRESS

Kampus
Universitas Islam Negeri
Syarif Hidayatullah
Jakarta
Jl. Ir H. Juanda No.95, Ciputat,
Kec. Ciputat Timur,
Kota Tangerang Selatan,
Banten 15412



Tel. (021) 7401925

uinjktpress

<https://uinjakartapress.id/>

La Ode Sumarlin
Etyun Yunita

MEMBEDAH KEASLIAN MADU :
Fakta Ilmiah di Balik Pemalsuan Madu & Cara Sains Melindungi Konsumen



MEMBEDAH KEASLIAN MADU :

Fakta Ilmiah di Balik Pemalsuan Madu & Cara Sains Melindungi Konsumen

La Ode Sumarlin
Etyun Yunita



**MEMBEDAH KEASLIAN MADU:
Fakta Ilmiah di Balik Pemalsuan Madu & Cara
Sains Melindungi Konsumen**

**La Ode Sumarlin
Etyun Yunita**



**MEMBEDAH KEASLIAN MADU:
Fakta Ilmiah Dibalik Pemalsuan Madu & Cara
Sains Melindungi Konsumen**

Penulis:

La Ode Sumarlin

Etyun Yunita

Editor

Dian Damayanti Kurnia, S.S.

Desain Sampul:

Mohammad Yusuf, S.. Kom.

Diterbitkan oleh UIN Jakarta Press

Alamat Kantor: Gedung Rektorat Lantai III,

Kampus I UIN Syarif Hidayatullah Jakarta,

Jl. Ir. H. Djuanda No. 95, Ciputat 15412

Surel: Puslitpen@uinjkt.ac.id

ISBN : 978-602-346-305-3

e-ISBN : 978-602-346-306-0

xv+246 hlm

Copyright © 2026

Cetakan Ke-1 Januari 2026

PENGANTAR PENERBIT

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh

Penerbit menyambut dengan penuh apresiasi kehadiran buku *Membedah Keaslian Madu: Fakta Ilmiah di Balik Pemalsuan Madu & Cara Sains Melindungi Konsumen* sebagai sebuah kontribusi penting dalam khazanah literatur ilmiah di bidang pangan, kimia, dan sains hayati. Buku ini hadir pada momentum yang tepat, seiring meningkatnya perhatian global terhadap isu keaslian pangan, perlindungan konsumen, serta jaminan mutu produk alami bernilai ekonomi tinggi seperti madu.

Pemalsuan madu merupakan persoalan kompleks yang tidak hanya berdampak pada aspek kesehatan dan ekonomi, tetapi juga menyentuh dimensi kepercayaan publik terhadap produk pangan. Oleh karena itu, kehadiran buku ini menjadi sangat relevan karena menawarkan pendekatan ilmiah yang komprehensif, sistematis, dan berbasis bukti dalam memahami serta mendeteksi praktik pemalsuan madu. Penulis berhasil merangkum berbagai metode analisis modern—mulai dari teknik fisikokimia konvensional hingga pendekatan mutakhir berbasis omik, spektrometri, kemometrika, dan biomolekuler—dengan penjelasan yang runtut dan mudah dipahami.

Penerbit menilai bahwa keunggulan utama buku ini terletak pada keseimbangan antara kedalaman ilmiah dan keterbacaan. Materi yang disajikan tidak hanya relevan bagi akademisi dan peneliti, tetapi juga bermanfaat bagi mahasiswa, praktisi industri, regulator, serta masyarakat umum yang memiliki kepedulian terhadap keaslian dan mutu madu. Dengan cakupan pembahasan yang luas, buku ini berpotensi menjadi referensi utama dalam pengujian autentikasi madu sekaligus rujukan pendukung dalam pengembangan kebijakan pengendalian mutu pangan.

Melalui proses penyuntingan dan penerbitan yang mengacu pada standar akademik dan etika publikasi ilmiah, penerbit berharap buku ini dapat memberikan sumbangsih nyata bagi pengembangan ilmu pengetahuan, peningkatan literasi sains pangan, serta penguatan peran sains dalam melindungi konsumen. Kami juga berharap buku ini

dapat mendorong lahirnya kajian lanjutan dan inovasi metode analisis autentikasi pangan di masa mendatang.

Akhir kata, penerbit menyampaikan penghargaan kepada penulis atas dedikasi dan kerja ilmiah yang telah menghasilkan buku ini. Semoga kehadiran buku *Membedah Keaslian Madu* dapat memberikan manfaat luas, memperkaya referensi ilmiah nasional, serta menjadi bagian dari upaya berkelanjutan dalam menjaga integritas dan mutu produk pangan Indonesia.

Wassalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Dr. Siti Ummi Masruroh, M. Sc.
UIN Jakarta Press

PRAKATA

Segala puji bagi Allah Swt., Tuhan Yang Maha Esa. Atas rahmat dan karunia-Nya, sehingga buku *Membedah Keaslian Madu: Fakta Ilmiah Dibalik Pemalsuan Madu & Cara Sains Melindungi Konsumen* dapat diselesaikan. Salawat dan salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW, yang melalui keteladanan dan perjuangan Beliau, umat manusia terdorong untuk menempuh jalan ilmu pengetahuan dan kemaslahatan.

Buku ini disusun sebagai respons terhadap meningkatnya perhatian global terhadap isu keaslian bahan pangan, khususnya madu, yang dalam beberapa dekade terakhir menghadapi tantangan serius berupa pemalsuan, penurunan mutu, serta risiko terhadap kesehatan dan kepercayaan konsumen. Madu, sebagai produk alami bernilai gizi dan ekonomi tinggi, kerap menjadi sasaran praktik penambahan gula, sirup fruktosa, maupun bahan asing lainnya yang sulit dikenali secara kasat mata.

Melalui buku ini, pembaca diajak memahami keaslian madu secara komprehensif, mulai dari konsep dasar autentikasi pangan, karakteristik fisikokimia dan biologis madu, hingga berbagai teknik analisis ilmiah modern yang digunakan untuk mendeteksi pemalsuan. Pendekatan yang dibahas meliputi analisis omik, kromatografi gas dan cair, spektrometri massa, teknik spektroskopi, analisis isotop, kemometrika, biosensor, hingga metode biomolekuler seperti DNA *barcoding* dan analisis enzim. Setiap metode disajikan beserta prinsip kerja, keunggulan, keterbatasan, serta relevansinya dalam konteks pengujian madu komersial.

Selain membahas aspek teknis analisis, buku ini juga mengulas dampak ekonomi dan mutu global akibat pemalsuan madu, implikasinya terhadap sifat fisik, kimia, gizi, dan khasiat madu, serta tantangan regulasi dan pengendalian kualitas di tingkat nasional maupun internasional. Dengan demikian, buku ini tidak hanya menempatkan sains sebagai alat analisis, tetapi juga sebagai instrumen perlindungan konsumen dan penjaga integritas produk pangan.

Meskipun memuat materi ilmiah yang mendalam dan berbasis literatur terkini, penyajian buku ini dirancang dengan bahasa yang sistematis dan komunikatif, sehingga dapat diakses oleh pembaca dari berbagai latar belakang. Buku ini diharapkan dapat menjadi rujukan bagi dosen, peneliti, mahasiswa, serta praktisi di bidang ilmu pangan, kimia, biologi, kesehatan, farmasi, dan sains hayati, sekaligus menjadi sumber pengetahuan bagi masyarakat umum yang ingin memahami cara membedakan madu asli dan madu yang telah dipalsukan secara ilmiah.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang telah memberikan dukungan moral, akademik, dan material dalam penyusunan buku ini, khususnya kepada orang tua, rekan sejawat, serta Pusat Penelitian dan Penerbitan (Puslitpen) UIN Syarif Hidayatullah Jakarta atas dukungan pembiayaan dan fasilitasi penulisan buku.

Akhir kata, semoga buku ini dapat memberikan kontribusi nyata dalam pengembangan ilmu pengetahuan, meningkatkan kesadaran akan pentingnya keaslian madu, serta menjadi referensi yang bermanfaat dalam upaya menjaga mutu pangan dan melindungi konsumen.

Januari 2026

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
PENGANTAR PENERBIT.....	iii
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
BAB I. KEASLIAN BAHAN PANGAN.....	1
1.1. Pengantar.....	1
1.2. Peran teknologi dan analisis data untuk menargetkan keaslian pangan.....	3
BAB II. MENGUNGKAP KEASLIAN PANGAN DENGAN ANALISIS OMIK.....	5
2.1. Pengantar.....	5
2.2. Proteomik.....	7
BAB III. ANALISIS INFORMASI BERTEMA AUTENTIKASI.....	13
3.1. Pengantar.....	13
3.2. Perkembangan Topik Keaslian Madu: Analisis Scientometrik	16
BAB IV. PEMALSUAN MADU: DAMPAK EKONOMI DAN RISIKO PENGENDALIAN KUALITAS GLOBAL.....	21
4.1. Pengantar.....	21
4.2. Penyebab dan Tantangan dalam Pengendalian Kualitas Madu.....	24
4.2.1. Penurunan produksi dalam negeri.....	24
4.2.2. Kurangnya standar identitas federal.....	25
4.2.3. Metode analisis kualitas madu yang tidak memadai.....	26
4.2.4. Kebijakan Perdagangan.....	27
4.2.5. Strategi Peningkatan Pengujian Residu Antibiotik pada Madu Cina.....	29
4.3. Analisis Permasalahan dalam pemalsuan madu.....	30
BAB V. MADU DAN KEASLIAN.....	33
5.1. Pengantar.....	33
5.2. Isu Global Pemalsuan Madu.....	38
BAB VI. WARNA MADU DAN RASA.....	39
6.1. Pengantar.....	39

6.2. Parameter warna madu segar.....	42
6.3. β -karoten, likopen, dan karakteristik warna.....	45
BAB VII. PEMALSUAN MADU DAN GULA.....	47
7.1. Pengantar.....	47
7.2. Pemalsuan Madu.....	48
7.3. Pemalsuan Gula.....	50
7.4. Tipe Pemalsuan madu.....	52
BAB VIII. TEKNIK ANALISIS CAMPURAN GULA.....	55
8.1. Pengantar.....	55
8.2. <i>Liquid Chromatography</i> (LC) dan Gula Madu.....	57
8.3. <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (LC-MS/MS)..	58
8.4. <i>Image Analysis</i> dengan <i>Smartphone</i>	61
8.5. <i>K-Nearst Neighbor</i>	64
BAB IX. DETEKSI SIRUP FRUKTOSA TINGGI PADA MADU MENGUNAKAN <i>GAS CHROMATOGRAPHY (GC)</i> BERBASIS INULIN.....	67
9.1. Pengantar.....	67
9.2. Derivat karbohidrat.....	69
9.3. Analisis hasil deteksi GC-MS.....	69
9.4. Analisis hasil deteksi GC.....	70
9.5. Interpretasi Data Analisis	71
BAB X. DETEKSI ZAT KONTAMINAN DALAM MADU: INOVASI, TANTANGAN, DAN ARAH MASA DEPAN.....	75
10.1. Pengantar.....	75
10.2. Jenis-Jenis Kontaminan yang Sering Ditemukan pada Madu.....	78
10.3. Metode Analisis untuk Identifikasi Kontaminan pada Madu.....	85
10.3.1. Kromatografi lapisan tipis.....	85
10.3.2. Analisis rasio isotop karbon stabil.....	86
10.4. Teknik Kromatografi.....	92
10.4.1. Kromatografi Gas.....	92
10.4.2 Kromatografi Cair.....	93
10.4.3. Penerapan Kromatografi Pertukaran Anion HPLC Disertai Deteksi Amperometrik Berdenyut.....	97
10.4.4. Kromatografi Cair dan Spektrometri Massa Kuadrapol Waktu Terbang untuk Analisis Tingkat Lanjut.....	102
10.5. Teknik spektroskopi.....	103

10.5.1. Spektroskopi resonansi magnetik nuklir.....	103
10.5.2. Spektroskopi Raman.....	104
10.5.3. Spektroskopi inframerah.....	105
10.6. Analisis Terintegrasi Kemometrik untuk Deteksi Zat Kontaminan.....	106
10.6.1. Pendekatan Kemometrika Terintegrasi pada Kromatografi Anion dengan Deteksi Amperometrik Berdenyut.....	106
10.6.2. Spektroskopi Raman terintegrasi dengan kemometrika.....	108
10.6.3. Spektroskopi inframerah terintegrasi kemometrika....	109
10.7. Biosensor.....	112
10.8. Perbandingan Berbagai teknik analisis.....	120
10.9. Prospek dan kesimpulan masa depan.....	122
BAB XI. PENGARUH PEMALSUAN PADA KHASIAT MADU.....	123
11.1. Pengantar.....	123
11.2. Efek pemalsuan pada sifat madu.....	124
11.2.1. Efek pada sifat fisik.....	124
11.2.1.1. Efek pada warna madu.....	124
11.2.1.2. Kadar air atau indeks bias dan aktivitas air.....	125
11.3. Efek pada sifat kimia.....	126
11.3.1. Pengaruh pemalsuan pada kadar abu.....	127
11.3.2. Efek pemalsuan nilai pH.....	127
11.3.3. Efek pemalsuan pada gula.....	128
11.3.3.1. Efek pemalsuan pada sukrosa.....	129
11.3.4. Efek pemalsuan pada konduktivitas listrik.....	130
11.3.5. Efek pemalsuan pada Hidroksimetil furfural (HMF).....	131
11.3.6. Efek pemalsuan pada Enzim (diastase, invertase).....	132
11.3.7. Efek pemalsuan pada prolin.....	133
11.4. Efek pada sifat reologi.....	134
11.4.1. Viskositas.....	134
11.4.2. Kepadatan.....	135
11.4.3. Tegangan Permukaan.....	135
11.5. Efek pada Sifat Gizi.....	136
BAB XII. DETEKSI MADU PALSU DENGAN TEKNIK <i>DNA BARCODING</i>	139
12.1. Pengantar.....	139
12.2. Spesifikasi madu dan Data Identifikasi.....	142

12.3. Analisis Data.....	144
12.3.1. Amplifikasi dan spesifisitas primer.....	144
12.3.2. Ekstraksi DNA dari sirup gula.....	145
12.3.2.1. Amplifikasi penanda tanaman umum.....	145
12.3.2.2. Amplifikasi penanda spesifik tanaman.....	147
12.3.3. Deteksi penanda beras dan jagung pada madu yang dipalsukan.....	148
12.3.4. Amplifikasi penanda pada berbagai jenis madu.....	148
12.3.4.1. Amplifikasi asal-usul penanda beras dan jagung.....	148
12.3.4.2. Amplifikasi penanda beras dalam 5% madu campuran.....	150
12.3.4.3. Penerapan pada madu komersial.....	151
12.3.5. Komposisi gula pada madu murni, madu campuran, dan madu komersial.....	151
12.4. Interpretasi data analisis.....	153
12.4.1. Penanda DNA dan spesifisitasnya.....	153
12.4.2. Ekstraksi DNA dari sirup gula.....	155
12.4.3. Penanda DNA dalam ekstrak sirup.....	157
12.4.4. Amplifikasi penanda beras dan jagung pada madu alami dan yang dipalsukan.....	158
12.4.5. Madu komersial yang digunakan.....	160
12.4.6. Kombinasi pengujian dengan metode tradisional.....	160
BAB XIII. DETEKSI PEMALSUAN MADU MELALUI ENZIM AMILASE DENGAN METODE <i>native</i> PAGE.....	163
13.1. Pengantar.....	163
13.2. Deteksi dan Konfirmasi Amilase Asing pada Madu dengan metode pewarnaan aktivitas <i>native</i> <i>PAGE</i>	165
BAB XIV. DETEKSI MADU PALSU: PERBANDINGAN DUA METODE SPEKTROSKOPI.....	171
14.1. Pengantar.....	171
14.2. Kandungan Gula pada Madu.....	172
14.3. Hubungan antara Panjang Gelombang Maksimum dan Komposisi Gula Madu.....	173
14.4. Spektral Ultraviolet-Tampak sebagai Alat Verifikasi Keaslian Madu.....	175
14.4.1. Persiapan dan Pemrosesan madu untuk analisis.....	175

14.4.2. Pengukuran dan Interpretasi Spektrum UV-Vis Sirup dan Madu.....	176
GLOSARIUM.....	179
DAFTAR PUSTAKA.....	191
TENTANG PENULIS.....	245

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Tantangan Terkini dalam Menjamin Keaslian Makanan dan Peran Teknologi Omik dalam Analisisnya	6
Gambar 3.1. Tinjauan umum tentang autentikasi madu.....	14
Gambar 3.2. Evolusi temporal artikel tentang keaslian madu.....	17
Gambar 3.3. Isu-isu keaslian madu dalam berbagai artikel ilmiah	17
Gambar 3. 4. Evaluasi temporal studi per masalah autentikasi.....	18
Gambar 3.5. Perbandingan Teknik Analisis dalam Artikel Autentikasi Madu.....	19
Gambar 3.6. Persentase Artikel tentang Keaslian Madu Berdasarkan Teknik Analisis dan Isu Utama.....	20
Gambar 4.1. Jumlah produksi madu domestik dan impor AS, 1965–2010.....	23
Gambar 4.2. Jumlah Impor Madu ke Amerika Serikat dari Negara-Negara dengan Produksi Madu Rendah.....	24
Gambar 5.1. Gambaran Skematis Strategi Pemalsuan Madu.....	38
Gambar 7.1. Klasifikasi Publikasi ilmiah tentang Autentikasi Madu Berdasarkan Tsagkaris et al. (2021).....	49
Gambar 7.2. Bahan Campuran yang Umum Ditemukan pada Madu di Pasaran.....	54
Gambar 8.1. Ilustrasi Peralatan untuk penentuan gula pereduksi	63
Gambar 9.1. Profil karbohidrat dari: (A) madu (H1) dan (B) madu (H1) yang dipalsukan dengan 5% HFIS4. MS: monosakarida; IS: standar internal, DS: disakarida dan TS: trisakarida.....	72
Gambar 10.1. Klasifikasi Pemalsuan Madu dan Bahan Tambahan yang Terdeteksi.....	82
Gambar 10.2. Distribusi $\delta^{13}\text{C}$ Madu dan $\delta^{13}\text{C}$ Berprotein untuk Madu Murni (segitiga), Madu Campuran(kotak), dan Madu Diragukan (berlian).....	91
Gambar 10.3. Profil GC-FID dari daerah difruktosa anhidrida (DFAs): (a) madu murni, (b) dipalsukan dengan 20% gula invert dan (c) dipalsukan dengan 20% 80HFCS setelah perlakuan dengan ragi.....	95
Gambar 10.4. Profil karbohidrat GC–MS dari (a) madu murni dan (b) yang dicampur dengan 5% HFIS.....	97
Gambar 10.5. Kromatogram HPLC-DAD dari sirup beras dan madu alami.....	100
Gambar 10.6. Profil oligosakarida HPAEC-PAD dari (a) sirup jagung, (b) 20HFCS, (c) 40HFCS, dan (d) 80HFCS.....	101
Gambar 10.7. Spektrum FTIR-ATR madu yang dipalsukan dengan (a) COSS dan (b) HFCS 2009).....	110

Gambar 10.8.	Jenis-Jenis Metode Analisis dalam Identifikasi Kontaminan Madu.....	119
Gambar 12.1.	Perbandingan visualisasi amplifikasi penanda DNA (A) rice_rrn26, (B) corn_rrn26 dan (C) beet_matK pada ekstrak tanaman dan sirup gula.....	149
Gambar 12.2.	Perbandingan visualisasi amplifikasi penanda DNA (A–C) rice_rrn26 dan (D) corn_rrn26 untuk madu yang dicampur dengan sirup beras (A) R1, (B) R2, (C) R4 dan sirup jagung (D) C2.....	150
Gambar 12.3.	Visualisasi amplifikasi rice_rrn26 dan corn_rrn26 dalam madu alami.....	152
Gambar 12.4.	Perbandingan visualisasi amplifikasi rice_rrn26 dalam berbagai jenis madu yang dicampur dengan sirup beras 5% (R1), dan sirup beras murni (R1).....	153
Gambar 13.1.	Perbandingan <i>native PAGE</i> menggunakan gel tanpa (A) dan dengan maltodekstrin (B).....	168
Gambar 13.2.	Analisis Aktivitas Protein Menggunakan <i>Native PAGE</i> dengan Gel 1% Maltodekstrin.....	169
Gambar 14.1.	Hubungan antara panjang gelombang puncak dengan kadar gula pada madu.....	175
Gambar 14.2.	Spektrum UV–Vis dari (a) madu, (b) sirup, (c) madu bunga matahari yang dipalsukan dengan 5–50% gula jagung (APIMERA), dan (d) madu bunga matahari yang dipalsukan dengan 5–50% gula enzimatik invertase.....	177

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Distribusi Metode Proteomik Terkini dalam Autentikasi Pangan.....	7
Tabel 6.1 Standar pengukuran warna berdasarkan Pfund	40
Tabel 6.2. Tingkat kecerahan (L^*), intensitas warna merah atau hijau (a^* , nilai positif dan negatif), intensitas warna kuning (b^* , nilai positif), kroma metrik (C^*) dan sudut Hue (h°) madu nektar segar.....	43
Tabel 6.3. β -karoten, Likopen dan warna (mm Pfund) pada madu yang berbeda.....	45
Tabel 8.1. Karya Ilmiah tentang Deteksi Sirup Gula dalam Madu (Lanjewar et al. 2024).....	59
Tabel 9.1. Spesifikasi Sirup Inulin Fruktosa Tinggi (HFIS) Menurut Produsen	68
Tabel 9.2. Komposisi Karbohidrat Berat Molekul Rendah (mg g^{-1}) pada Sirup Inulin Fruktosa Tinggi (HFIS)	71
Tabel 9.3. Konsentrasi DFA, Inulobiosa, Kestosa, dan Inulotriosa (mg g^{-1}) pada Madu H1, HFIS4, dan Madu H1 yang Dipalsukan dengan HFIS4 (5%, 10%, 20%).....	74
Tabel 10.1. Standar komposisi madu.....	77
Tabel 10.2. Jenis-Jenis Bahan Pengotor yang Ditemukan dalam Produk Madu.....	79
Tabel 10.3. Kelimpahan relatif (%) monosakarida (MS), disakarida (DS), dan trisakarida (TS) pada madu dari Calabria.....	99
Tabel 10.4. Perbandingan Berbagai Metode untuk Mengidentifikasi Pemalsuan Madu.....	114
Tabel 12.1. Spesifikasi madu yang digunakan.....	142
Tabel 12.2. Gula sirup dan informasi bahan sebagai kontrol	143
Tabel 12.3. Informasi senyawa Primer sekuens DNA.....	143
Tabel 12.4. Komposisi gula madu, madu yang dicampur dengan sirup beras 10% (R1) dan sirup	146
Tabel 12.5. Amplifikasi penanda DNA pada kontrol tanaman padi, jagung dan bit gula menggunakan qPCR.....	148
Tabel 13.1. Aktivitas enzim dan amilase asing yang terdeteksi pada madu.....	166

Tabel 14.1.	Spesifikasi madu untuk analisis amilase.....	173
Tabel 14.2.	Visualisasi Warna Madu Sebelum dan Setelah Eksitasi dengan Laser 405 nm	174

BAB I

KEASLIAN BAHAN PANGAN

1.1 Pengantar

Fenomena dalam aktivitas manusia bahwa praktik penipuan, dalam berbagai bentuknya, telah lama menyertai transaksi komersial, termasuk dalam perdagangan bahan pangan. Prinsip *caveat emptor* (biarkan pembeli berhati-hati) pernah diterapkan, namun pepatah ini kini mulai kabur seiring munculnya kontrak tertulis yang memuat spesifikasi produk secara rinci dan metode analisis yang cermat.

Meskipun ada tren menuju transparansi tersebut, beberapa dekade terakhir tetap menunjukkan adanya kasus penipuan berskala besar dalam transaksi komersial yang melibatkan komoditas. Dalam banyak kasus, konsumen pada akhirnya harus mengandalkan pelabelan dan iklan produk untuk memperoleh informasi mengenai sifat suatu produk. Oleh karena itu, menjadi tanggung jawab otoritas penegak hukum publik untuk mengawasi klaim yang dibuat serta menindak pelaku penipuan.

Bab ini akan membahas persoalan keaslian komoditas pangan tunggal, khususnya madu, yang masih merupakan sektor penting dalam industri makanan. Akan terlihat bahwa, kecuali persoalan keaslian dalam komoditas ini dapat diatasi, maka sangat kecil kemungkinan permasalahan keaslian bahan makanan yang diformulasikan dapat diselesaikan.

Dalam permasalahan keaslian, bukan hanya konsumen akhir yang dirugikan. Para pengolah makanan, yang kini semakin menjadi bagian dari konglomerat bisnis besar, juga dapat terdampak. Tuntutan hukum yang berhasil dapat menyebabkan kerugian besar, bahkan kehancuran bagi produsen makanan.

Pengawasan terhadap keaslian makanan umumnya menjadi tanggung jawab badan penegak hukum publik yang berwenang. Sebagai contoh, di Inggris, sebagian besar masalah terkait keaslian makanan ditangani melalui proses hukum berdasarkan peraturan pelabelan makanan, apabila suatu produk tidak sesuai dengan

deskripsi yang tertera. Hal ini berada dalam lingkup kewenangan Otoritas Standar Perdagangan (*Trading Standards Authority*). Sementara itu, isu kesehatan masyarakat saat ini ditangani oleh departemen Kesehatan Lingkungan.

Secara umum, persoalan keaslian pangan tidak selalu menimbulkan risiko langsung bagi kesehatan masyarakat. Namun, kondisi ini sangat dipengaruhi oleh integritas individu yang terlibat dalam praktik ilegal serta, dalam batas tertentu, tingkat pemahaman mereka terhadap kimia pangan. Apabila pelaku mengesampingkan dampak kesehatan demi memperoleh keuntungan ekonomi, maka dampak yang serius berpotensi muncul. Contoh nyata ditunjukkan oleh kasus minyak goreng terkontaminasi di Spanyol, yang mencerminkan pentingnya kewaspadaan terhadap keaslian makanan.

Oleh karena itu, isu keaslian ini menjadi sangat krusial bagi lembaga penegak hukum, yang harus memiliki pemahaman tidak hanya mengenai bagaimana masalah ini muncul, tetapi juga bagaimana cara memantau dan mengevaluasinya.

Autentikasi makanan dan minuman merupakan topik terkini yang mendapat perhatian luas dari seluruh pelaku dalam rantai pasok pangan, termasuk industri makanan, konsumen, dan peneliti di bidang ilmu pangan. Autentikasi makanan mencakup berbagai aspek yang berkaitan dengan kesalahan pelabelan, pemalsuan, serta klaim yang menyesatkan mengenai asal usul, metode produksi, atau teknologi pemrosesan yang digunakan.

Mengingat banyaknya faktor yang dapat memengaruhi komposisi kimia suatu makanan seperti asal geografis, varietas atau jenis, kondisi budidaya, pembiakan, dan/atau pemberian pakan diperlukan penerapan metode analisis yang akurat, andal, dan berkapasitas tinggi untuk menilai keaslian dan keterlacakan produk tersebut.

Akhirnya, autentikasi juga bertujuan untuk menjamin keamanan dan mutu pangan, khususnya dalam hal karakteristik organoleptik, kandungan nutrisi, dan senyawa bioaktif. Untuk mendukung tujuan ini, berbagai alat analisis dapat digunakan, termasuk kombinasi dengan kemometrika tingkat lanjut, seperti teknik spektroskopi dan kromatografi, metode berbasis DNA, serta pendekatan omik yang canggih.

1.2. Peran teknologi dan analisis data untuk menargetkan keaslian pangan

Meningkatnya perhatian terhadap pemalsuan dan penipuan pangan oleh konsumen serta industri manufaktur pangan telah menimbulkan berbagai peluang dan tantangan. Misalnya, analisis dan pemantauan masalah autentikasi pangan telah membuka peluang bagi teknologi baru yang memanfaatkan era digital, seperti blockchain, teknologi penginderaan, dan Internet of Things (IoT) (Ruiz-Garcia et al., 2009; Kamble et al., 2020). Hal ini juga mendorong pengembangan strategi atau sistem baru untuk memantau pemalsuan pangan (Fritsche, 2018; Moore et al., 2012; Cavanna et al., 2018; Cortés et al., 2019). Target autentikasi dan pencegahan penipuan pangan memerlukan pendekatan baru dalam jenis analisis yang digunakan serta interpretasi datanya (Cavanna et al., 2018; Moore et al., 2012; Serazetdinova et al., 2019; Cortés et al., 2019). Selain itu, untuk memahami sistem pangan secara menyeluruh—mulai dari kebun hingga meja makan penting untuk melibatkan informasi dari berbagai sumber lain, seperti data terkait fungsi pangan, jenis bahan, preferensi konsumen, dan informasi pasar.

Keterlambatan dalam penerapan teknologi baru dan analisis data oleh industri manufaktur pangan, otoritas regulasi, serta laboratorium pengendalian kualitas merupakan beberapa masalah utama. Penerapan dan pemilihan metode analisis yang tangkas dan modern, dikombinasikan dengan penggunaan analisis data seperti alat pembelajaran mesin (machine learning), termasuk tantangan terkait pengambilan bahan dan definisi mengenai apa yang dianggap sebagai bahan autentik, di antara masalah lainnya, masih belum didefinisikan atau dipahami dengan baik. Selain itu, pemanfaatan teknologi dan analisis data dalam menangani pemalsuan dan penipuan pangan terhambat oleh kurangnya pelatihan atau pendidikan, tidak hanya pada tingkat praktis, tetapi juga pada tingkat akademis. Oleh karena itu, kebutuhan akan staf yang sangat terampil dan berkualifikasi menjadi sangat penting.

Sebagian besar teknik analisis yang diterapkan untuk memastikan dan memantau keaslian maupun praktik penipuan pangan umumnya bersifat nontarget. Meskipun demikian, banyak bukti empiris serta berbagai penerapan yang berhasil di bidang ini telah memperlihatkan bahwa pendekatan tersebut berpotensi

digunakan sebagai metode rutin dalam pengendalian mutu. (Rubert et al., 2016; Saa et al., 2019; Saeys et al., 2019; Wielogorska et al., 2018; Wilde et al., 2019; Cavanna et al., 2018). Metodologi tradisional atau pendekatan analisis yang saat ini digunakan relatif lebih mahal, memakan waktu, serta memerlukan instrumentasi yang sangat terspesialisasi dan operator yang terampil (Cavanna et al., 2018). Oleh sebab itu, penggabungan teknologi penginderaan yang membutuhkan lebih sedikit bahan habis pakai dan waktu yang lebih singkat dalam persiapan bahan menjadi semakin menarik karena dapat menghasilkan analisis yang lebih hemat waktu dan biaya pengujian.

Sudah menjadi hal yang umum bahwa penggunaan teknologi digital dan teknologi penginderaan untuk menilai keaslian makanan di pusat distribusi sangat penting guna memastikan kepatuhan terhadap sistem pengendalian kualitas dan regulasi (Beć & Huck, 2019; Beć et al., 2020). Pengujian komoditas pertanian dan makanan di titik pengumpulan (misalnya, pusat distribusi atau pasar) dapat meminimalkan kemungkinan kerusakan dan penurunan mutu makanan selama proses transportasi menuju laboratorium analisis atau pengendalian kualitas secara tradisional.

Selain itu, kemunculan teknologi penginderaan menghilangkan kebutuhan akan analisis yang mahal dan memakan waktu yang biasa digunakan sepanjang rantai pasok dan nilai makanan untuk menjamin kualitas serta keaslian produk. Teknologi ini sangat bergantung pada keahlian operator karena untuk memperoleh hasil yang andal dengan akurasi tinggi, juga diperlukan pengetahuan khusus. Oleh karena itu, pelatihan bagi individu yang terlibat dalam rantai pasok dan nilai makanan akan sangat bermanfaat.

Perkembangan terbaru dalam perangkat portabel juga telah menghadirkan alat baru yang mampu mengumpulkan data multidimensi dan kompleks. Integrasi sistem transfer data antarperangkat akan memungkinkan penyimpanan data secara jarak jauh sehingga memudahkan pemeliharaan catatan untuk analisis penipuan pangan (Esteki et al., 2019). Sensor telah terbukti berguna untuk memantau hampir seluruh tahap dalam rantai pasok dan nilai (dari hulu hingga hilir). Penggabungan teknologi penginderaan, *Internet of Things* (IoT), dan *blockchain* di seluruh rantai nilai pangan memberikan banyak manfaat, seperti peningkatan produktivitas, keamanan, kepercayaan konsumen, serta transparansi sistem pangan.

BAB II

MENGUNGKAP KEASLIAN PANGAN DENGAN ANALISIS OMIK

2.1 Pengantar

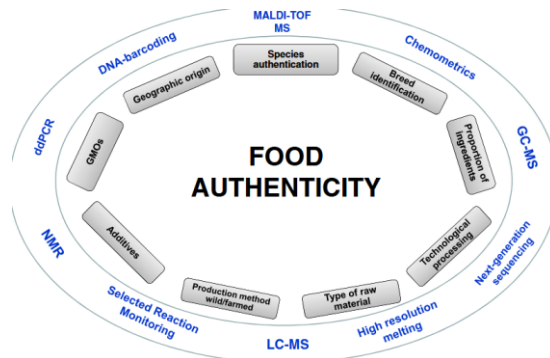
Informasi yang lengkap, akurat, dan jujur mengenai pangan yang kita konsumsi merupakan tuntutan utama tidak hanya bagi konsumen, tetapi juga bagi pelaku industri (pengecer pangan, produsen, dan importir) serta pemerintah. Pemalsuan pangan, kesalahan pelabelan, dan penipuan, baik yang disengaja maupun yang tidak disengaja demi keuntungan ekonomi, merupakan masalah yang terus berkembang di seluruh dunia. Meskipun skala penuh dari penipuan pangan mungkin sulit untuk diketahui, biaya yang ditimbulkan bagi industri pangan global diperkirakan mencapai 15 miliar dolar AS setiap tahunnya (Johnson, 2014). Oleh karena itu, banyak peraturan telah diberlakukan secara global guna menghindari pemalsuan pangan dan kesalahan pelabelan (Ortea et al., 2016). Untuk itu, metode analisis yang akurat dan andal sangat diperlukan agar dapat memenuhi peraturan tersebut dan menjamin keaslian produk pangan mulai dari pertanian hingga meja makan.

Tantangan terkini yang terkait dengan keaslian pangan telah didefinisikan oleh Ortea et al. (2016) (Gambar 2.1). Penggantian spesies dengan spesies lain yang kualitasnya lebih rendah serta kesalahan pemberian label merupakan bentuk penipuan pangan yang paling umum, meskipun otentikasi pangan mencakup banyak aspek lain, seperti asal geografis, identifikasi ras atau varietas, metode produksi, aturan pemberian pakan, teknologi pemrosesan dan pengawetan, penambahan komponen yang tidak dideklarasikan, serta deteksi organisme hasil rekayasa genetika (GMO). Faktanya, tingkat kesalahan pemberian label yang tinggi masih sering dilaporkan (Tantillo et al., 2015; Kane & Hellberg, 2016). Oleh karena itu, sejumlah besar metode analisis yang dikembangkan untuk otentikasi pangan lebih banyak difokuskan pada deteksi dan identifikasi spesies.

Otentikasi asal produk pangan, yang memungkinkan penelusuran produk hingga wilayah tertentu, juga telah memperoleh perhatian luas, terutama dalam upaya verifikasi produk dengan asal bersertifikat serta pembedaan varietas atau kultivar. Dalam konteks

ini, sistem pelabelan telah dibuat untuk mendukung keaslian asal regional atau produksi tradisional, seperti label mutu yang dikeluarkan oleh Uni Eropa, yaitu *Protected Designation of Origin* (PDO), *Protected Geographical Indications* (PGI), dan *Traditional Specialties Guaranteed* (TSG).

Produk makanan yang diproduksi secara organik, karena sifatnya yang dianggap lebih sehat dan ramah lingkungan dibandingkan produk konvensional, semakin diminati dan memiliki harga yang lebih tinggi sehingga sering menjadi target penipuan pangan. Oleh karena itu, kemampuan berbagai platform analitis untuk membedakan metode produksi telah banyak dipelajari. Selain itu, keaslian pangan juga mencakup pendeteksian GMO guna memenuhi persyaratan yang ditetapkan oleh peraturan yang berlaku.



Gambar 2.1. Tantangan terkini terkait keaslian makanan dan teknologi utama berbasis omik yang digunakan untuk mempelajarinya. Diadaptasi dari Ortea et al. (2016)

Meskipun pendekatan konvensional seperti pemfokusan isoelektrik, SDS-PAGE, serta teknik genetik klasik (misalnya RFLP dan *Real Time PCR/Polymerase Chain Reaction* [rtPCR]) masih dimanfaatkan, penggunaan perangkat berbasis molekuler berskala besar, termasuk teknik yang berkaitan dengan proteomik, metabolomik, dan genomik telah membantu mengatasi keterbatasan metode sebelumnya. Pada bab ini disajikan uraian umum yang menyeluruh dan mutakhir mengenai berbagai temuan dalam tiga tahun terakhir (2015–2018) yang menerapkan teknologi proteomik, metabolomik, dan genomik untuk penilaian keaslian pangan pada

beragam jenis bahan makanan, dengan penekanan pada topik-topik yang telah diuraikan sebelumnya.

2.2. Proteomik

Sifat protein dapat menjadi penanda berbagai fitur dari komponen dan produk pangan, sehingga dapat digunakan sebagai alat berbasis proteomik untuk menilai kualitas makanan, seperti otentikasi bahan pangan (Gallardo et al., 2013). Spektrometri massa (MS) merupakan metode pilihan dalam menganalisis protein, karena memungkinkan karakterisasi dan sekuensing peptida serta protein, sehingga dapat mengidentifikasi, bahkan dalam beberapa kasus mengukur protein yang spesifik untuk spesies atau kelompok generik komponen makanan (misalnya dengan sidik jari massa peptida (PMF) atau spektrometri massa tandem (MS/MS) setelah pencernaan enzimatik protein menjadi peptida) (Ortea et al., 2016). Selain itu, MS juga memungkinkan pengambilan sidik jari spesifik dari komponen pangan berdasarkan massa protein utuh (misalnya pembuatan profil protein) atau massa peptida yang diperoleh setelah pencernaan (misalnya pembuatan profil peptida). Setelah protein penanda atau peptida diidentifikasi, metode berbasis LC-MS yang cepat dan sensitif untuk deteksi atau pengukuran dapat dikembangkan (misalnya pemantauan reaksi terpilih (SRM) atau pemantauan reaksi ganda (MRM)). Tabel 2.1 menyajikan gambaran umum studi proteomik terkini yang dilakukan dalam autentikasi pangan.

Tabel 2.1. Distribusi Metode Proteomik Terkini dalam Autentikasi Pangan. Rincian spesifik seperti bahan yang dianalisis, batas deteksi, dan akurasi identifikasi disertakan jika tersedia/dinilai (Bohme et al., 2019).

Makanan	Tujuan analisis	Teknik Utama	Penanda Utama	Referensi	Detail Spesifik
Makanan Laut	Penentuan 54 spesies ikan komersial	Sidik jari protein MALDI-TOF MS	Sidik jari MS spesifik spesies dari protein otot	Stahl & Schroder, 2017	Sampel ikan dari 54 spesies, diperoleh dari pengecer makanan, supermarket, dan toko ikan. Metode divalidasi pada 118 sampel yang diperoleh dari supermarket dan toko ikan.
	Diferensiasi ikan <i>gilthead bream</i> liar	Proteomik kuantitatif LC-MS/MS	Protein sarkoplasma Parvalbumin	Piovesana et al. 2016	Sampel ikan <i>gilthead bream</i>

	dan hasil budidaya		(diekskresikan berlebihan pada kelompok hasil budidaya) 155 dan 37 protein DE ditemukan menggunakan dua metode berbeda.		liar dan hasil budidaya.
Daging	Deteksi daging sapi, kuda, sapi muda, ayam, dan babi dalam produk makanan	Pembuatan profil protein MALDI-TOF MS	Protein otot Sidik jari MS spesifik dari protein otot DL: 50% dalam campuran (sapi/babi).	Flaudrops et al. 2015	Potongan daging (sapi, babi, kuda, ayam, domba, kalkun) dari tukang daging lokal; enam olahan kuliner dari supermarket dan restoran.
	Identifikasi 26 spesies	Pencocokan spektral LC- MS/MS	Pustaka spektral MS dari protein otot Akurasi: 100% (tingkat genus) dan 95% (tingkat spesies); DL: 10% kuda dalam daging sapi.	Ohana et al. 2016	Sampel daging (16 spesies mamalia dan 10 spesies burung) dari tukang daging/superma rket.
	Deteksi daging ayam, babi, sapi, bebek, dan angsa dalam produk daging	LC-MS/MS bebas label	20 peptida tahan panas dari protein miofibrilar dan sarkoplasma DL: 1,0% dalam campuran daging; 0,8% sapi dalam sosis ayam.	Montowska et al. 2017	Daging segar dan matang, serta produk komersial.
	Deteksi pemalsuan produk daging	Identifikasi peptida LC-MS/MS dan SRM	Peptida spesifik spesies tahan panas (dari beberapa protein) DL:	Li et al. 2018	Sampel daging (babi, sapi, domba, ayam, bebek) dari rumah potong hewan dan

			0,5% pemalsuan.		supermarket. Bubuk kacang dan kacang polong serta tepung kedelai dari peternakan.
		SRM	16 peptida spesifik spesies dari mioglobin DL: 1% dalam campuran.	Watson et al. 2015	Sampel daging (sapi, babi, kuda, domba) dari supermarket/tuk ang daging.
		pSRM	Peptida spesifik spesies dari mioglobin DL: 1% daging babi dalam campuran.	Orduna et al. 2015	Sampel daging sapi, babi, kuda, dan domba.
Susu dan produk susu	Deteksi kasein kerbau air dan sapi dalam susu, dadih, dan keju. Diferensiasi ras kerbau air.	Pembuatan profil peptida MALDI-TOF MS	Peptida triptik kasein spesifik spesies DL: 0,78% sapi; 2% kerbau air.	Caira et al. 2016	Sampel susu, dadih, dan keju dari pabrik susu dan keju.
	Pemalsuan susu kerbau air, kambing, dan domba. Identifikasi perlakuan panas.	Pembuata n profil protein & peptida MALDI- TOF MS	Protein: Kasein, serum amiloid A, laktalbumin, laktoglobuli, pepton Campuran biner hingga 1% disiapkan. Akurasi: 100% (identifikasi spesies) dan 100% (pengenalan perlakuan panas).	Sassi et al. 20156	
Anggur & Minuman	Diskriminasi 33 anggur	Analisis langsung	Puncak spesifik dalam	Re Satar et al. 2016	33 botol anggur putih dari produsen anggur

	putih Kroasia	MALDI- TOF MS	spektrum MALDI-TOF MS		terdaftar Kroasia.
GMO	Perbandin gan kacang- kacangan GM dan non-GM	2-DE	23 dan 21 protein biji- bijian DE	Balsamo et al. 2015	Biji kacang dari peristiwa Embrapa 5.1 GM dan non-GM, untuk dua varietas.
	Perbandin gan jagung GM dan non-GM	2-DE & iTRAQ	148 protein biji DE	Tan et al. 2017	Biji jagung GM yang mengekspresika n fitase secara berlebihan, dan pasangan non- GM. 148 protein yang diekspresikan secara berbeda ditemukan (kebanyakan terkait dengan modifikasi pasca- translasi dan perputaran protein).
		2-DE DIGE	99 protein DE	Vidal et al. 2015	Tepung jagung komersial dari peristiwa MON810 dan pasangan non- GM. 99 bintik yang diekspresikan secara berbeda ditemukan (beberapa enzim, protein kejut panas, dan protein lainnya).
		LC-MS/MS	Protein metabolisme karbohidrat dan energi	Mesnage et al. 2016	Sampel biji jagung giling dari peristiwa NK603 (jagung toleran glifosat) dan pasangan non- GM. 117 protein ditemukan DE dalam peristiwa NK603.

Lainnya	Penentuan asal gelatin	LC-MS/MS	Peptida penanda sapi dan babi	Grundy et al. 2016	Sembilan gelatin komersial (asal sapi, babi, dan ikan). DL: 2,3% gelatin sapi/babi. Spesies yang tidak diumumkan ditemukan dalam gelatin komersial.
		Pembuatan profil peptida MALDI-TOF MS	Sidik jari spesifik dari peptida gelatin DL: 1% gelatin dalam permen; 20% gelatin babi dalam gelatin sapi.	Flaudrops et al. 2015	Standar gelatin babi dan sapi serta permen.

2-DE, elektroforesis dua dimensi; **DE**, diekspresikan secara berbeda; **DIGE**, elektroforesis gel diferensial; **DL**, batas deteksi; **GM**, dimodifikasi secara genetik; **iTRAQ**, tag isobarik untuk kuantifikasi relatif dan absolut; **LC**, kromatografi cair; **MALDI-TOF**, desorpsi/ionisasi laser terbantu matriks-waktu terbang; **MS**, spektrometri massa; **MS/MS**, spektrometri massa tandem; **pSRM**, pemantauan reaksi pseudo-terpilih; **SRM**, pemantauan reaksi terpilih.

BAB III

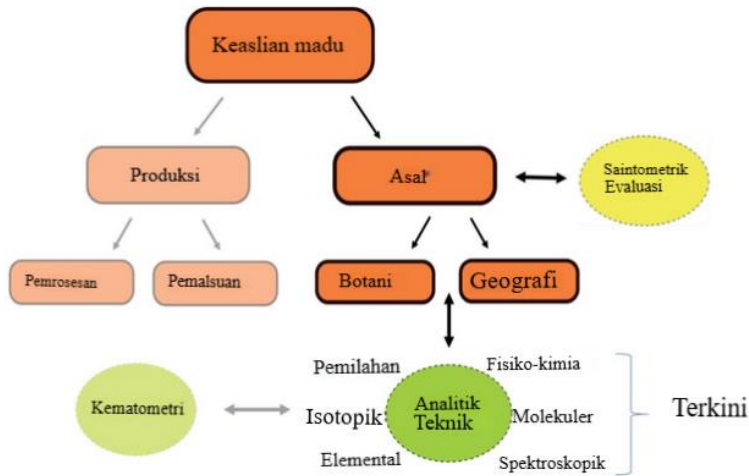
ANALISIS INFORMASI BERTEMA AUTENTIKASI

3.1 Pengantar

Madu merupakan larutan gula yang terkenal karena manfaatnya bagi kesehatan (Cianciosi et al., 2018; Miguel et al., 2017) akibat komposisinya yang sangat beragam (da Silva et al., 2016). Temuan terbaru mengungkapkan bahwa madu memiliki potensi sebagai agen pencegah kanker (Cianciosi et al., 2020; Afrin et al., 2020) serta berperan sebagai antiinflamasi (Ranneh et al., 2021). Oleh karena itu, konsumsi madu terus meningkat seiring dengan gaya hidup sehat yang diikuti banyak orang. Namun, fakta ini menimbulkan masalah pasokan, karena banyak negara di seluruh dunia tidak mampu memproduksi madu secara mandiri (sebagian besar disebabkan oleh kondisi iklim dan tingginya populasi), sehingga mereka terpaksa mengimpor madu (Garcia, 2018). Dengan demikian, madu menjadi salah satu produk yang rawan penipuan mengingat harganya yang tinggi, tingkat konsumsi yang besar, dan pasar globalnya (Hassoun et al., 2020). Selain itu, persyaratan peraturan terkait madu bervariasi tergantung pada negaranya. Kualitas madu sangat bergantung pada proses produksi dan asal madu tersebut.

Kasus pertama berkaitan dengan proses pengolahan madu selama prosedur produksi, yang melibatkan beberapa tahapan, seperti sentrifugasi, penyaringan, atau pasteurisasi (Bogdanov & Martin, 2002). Arahan Komisi Eropa (EC) 2001/110/EC menyatakan bahwa proses penyaringan madu harus dicantumkan pada label, namun hal ini tidak selalu dilakukan. Selain itu, pemalsuan madu dengan penambahan berbagai komponen selama proses produksi merupakan masalah yang umum terjadi. Praktik pemalsuan ini didorong oleh motif keuntungan, mengingat madu merupakan produk bernilai tinggi dengan harga pasar yang mahal. Salah satu caranya adalah dengan menambahkan pemanis murah ke dalam madu untuk mengurangi jumlah madu asli dalam setiap kemasan. Contoh bahan yang sering digunakan adalah sirup jagung fruktosa tinggi (HFCS), sirup glukosa, atau sirup gula invert (Siddiqui et al., 2017).

Penambahan air juga merupakan praktik penipuan lain yang tidak disukai, karena dapat mempengaruhi masa simpan dan nilai gizi madu (Yang et al., 2018). Secara umum, berbagai metode analisis untuk mendeteksi pemalsuan madu telah dikembangkan dan dijelaskan secara rinci (Wu et al., 2017a; Hassoun et al., 2020; Se et al., 2019).



Gambar 3.1. Tinjauan umum tentang autentikasi madu. Persegi panjang mewakili berbagai masalah keaslian, sedangkan oval menggambarkan bidang penting untuk mendeteksi penipuan madu (Tsagkaris et al., 2021)

Berdasarkan asal madu, terdapat karakteristik yang secara langsung berkaitan dengan harga pasar dan kualitas produk. Pentingnya informasi mengenai asal madu tercermin dalam peraturan Uni Eropa (UE), yang menekankan: (i) kewajiban mencantumkan asal madu pada label, misalnya “campuran madu UE” (Direktif 2001/110/EC dan amandemennya, Direktif 2014/63/EU), serta (ii) penetapan skema kualitas.

Secara rinci, terdapat dua skema kualitas yang diatur dalam Peraturan (UE) No. 1151/2012, yaitu “Protected Designation of Origin” (PDO) dan “Protected Geographical Indication” (PGI), yang menyoroti adanya hubungan yang erat antara kualitas pangan dengan asal geografisnya. Oleh karena itu, madu yang berasal dari wilayah, daerah, atau negara tertentu—misalnya madu PDO Mel de Barroso

dari Portugal dapat memperoleh pangsa pasar dan harga yang lebih tinggi.

Namun demikian, asal geografis bukanlah satu-satunya parameter penting dalam menentukan keaslian madu. Asal botani juga dapat memengaruhi harga pasar. Sebagai contoh, di Uni Eropa terdapat tren konsumsi madu embun, yang menyebabkan harga pasar jenis madu tersebut menjadi lebih tinggi (Pita-Calvo & Vázquez, 2017).

Secara keseluruhan, pemantauan dan pengendalian asal madu sangat penting, dan hal ini hanya dapat dilakukan melalui kombinasi metode analisis yang andal dengan dukungan alat kemometrik yang canggih.

Berbagai komponen dalam madu, seperti karakteristik fisikokimia, senyawa fenolik, atau kandungan logam, telah digunakan sebagai penanda untuk membedakan asal botani dan/atau geografisnya. Data-data tersebut diperoleh melalui berbagai teknik analisis, seperti kromatografi cair yang dikombinasikan dengan spektrometri massa (LC-MS) atau resonansi magnetik nuklir (NMR), yang mampu memberikan beragam informasi.

Namun demikian, pemrosesan data mentah dan ekstraksi informasi yang relevan merupakan tantangan tersendiri. Pada kenyataannya, penggunaan alat kemometrik yang canggih sering kali diperlukan untuk mencapai tingkat diskriminasi yang diinginkan. Umumnya, dilakukan pengukuran terhadap sejumlah variabel X pada sejumlah data N untuk membentuk matriks Y ($X \times N$), yang bertujuan mengungkap pola-pola potensial. Pola-pola ini dapat dimanfaatkan baik secara kualitatif (misalnya, sebagai sidik jari kimiawi) maupun secara kuantitatif (misalnya, senyawa penanda yang menunjukkan asal botani tertentu, seperti hotrienol, nerol oksida, dan benzil sinamat dalam madu goldenrod) (Jasicka-Misiak et al., 2018). Analisis data multivariat mencakup metode tanpa pengawasan, seperti analisis komponen utama (PCA) dan analisis kluster hierarkis (HCA), serta metode dengan pengawasan, seperti analisis diskriminan kuadrat terkecil parsial (PLS-DA) dan regresi kuadrat terkecil parsial (PLSR) (Khakimov et al., 2015).

Perlu dicatat bahwa dalam metode tanpa pengawasan, algoritma yang digunakan tidak memiliki informasi apa pun mengenai kelas bahan. Sebaliknya, pada metode dengan pengawasan, diperlukan himpunan data pelatihan dengan klasifikasi bahan yang

telah diketahui untuk membangun model prediktif. Selain itu, banyak makalah yang diterbitkan menunjukkan hasil yang saling bertentangan, tergantung pada prosedur statistik yang digunakan. Hal ini menegaskan pentingnya peran kemometrika dalam menentukan keaslian pangan (Granato et al., 2018).

Untuk memahami lebih lanjut penerapan analisis data multivariat dan pembelajaran mesin (machine learning) dalam studi keaslian madu, studi tinjauan terbaru oleh Maione et al. (2019) sangat direkomendasikan. Namun, bahkan alat kemometrik yang paling canggih sekalipun tidak dapat mengatasi keterbatasan data analitis yang berkualitas rendah. Oleh karena itu, penting untuk menyoroti tren serta membahas berbagai kendala yang dihadapi dalam metodologi analitis yang tersedia.

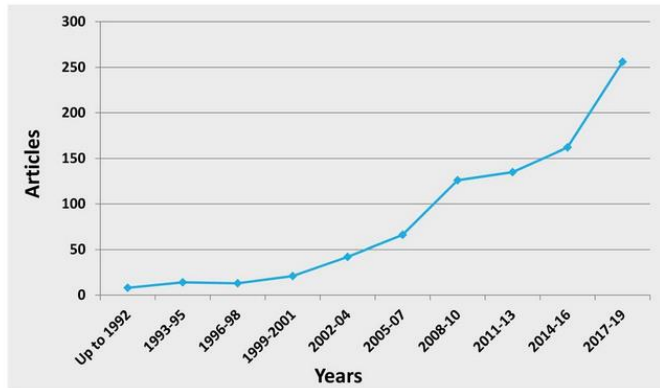
Pada bab ini dipaparkan berbagai perangkat canggih yang berkaitan dengan teknik analitis untuk penentuan asal madu (Gambar 3.1). Sebagai ilustrasi meningkatnya perhatian terhadap topik keaslian madu, untuk pertama kalinya dilakukan evaluasi scientometrik secara komprehensif di bidang ini. Beragam metode analitis beserta penerapannya yang dilaporkan selama periode 2014–2019 dibahas secara kritis, sehingga memberikan pemahaman mengenai persoalan keaslian, penanda potensial, serta pemanfaatan alat kemometrik.

3.2. Perkembangan Topik Keaslian Madu: Analisis Scientometrik

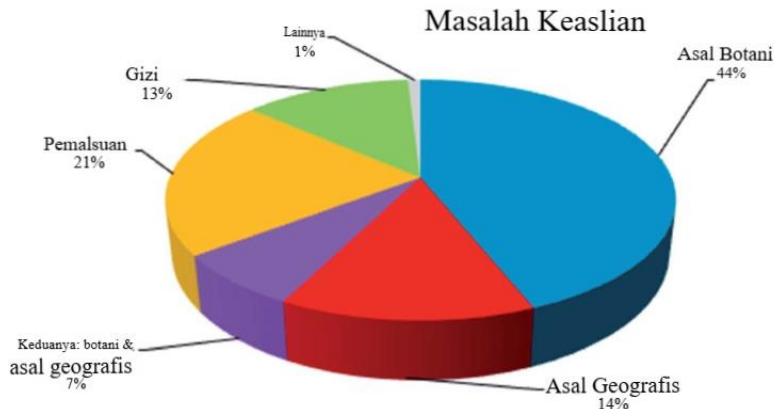
Menarik untuk menelusuri perkembangan topik keaslian madu dari waktu ke waktu melalui evaluasi scientometrik. Penelusuran dilakukan menggunakan basis data Scopus dengan string pencarian sebagai berikut: “authentication” ATAU “geographical origin” ATAU “botanical origin” ATAU “authenticity” ATAU “fraud” ATAU “adulteration” DAN “honey”. Perlu dicatat bahwa hanya artikel ilmiah berbahasa Inggris yang dimasukkan dalam analisis ini.

Lebih lanjut, makalah yang tersisa dievaluasi dalam konteks untuk memastikan keterkaitan makalah tersebut dengan keaslian madu. Semua abstrak (sebanyak 1.129 makalah yang diterbitkan hingga tahun 2019) dianalisis untuk menentukan relevansinya, dan semua artikel terpilih diperiksa secara komprehensif. Terlihat bahwa keaslian madu merupakan bidang yang berkembang pesat (Gambar 3.2). Meskipun jumlah artikel ilmiah sempat relatif stabil pada periode

2011–2013, peningkatan yang signifikan dalam jumlah publikasi tampak jelas pada periode 2017–2019, yang menandakan bahwa perhatian terhadap bidang ini terus meningkat.



Gambar 3.2. Evolusi temporal artikel tentang keaslian madu (basis data Scopus 12/2020) (Tsagkaris et al., 2021)

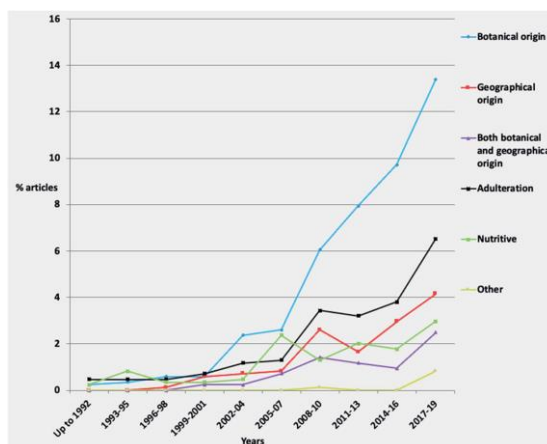


Gambar 3.3. Isu-isu keaslian madu dalam berbagai artikel ilmiah (Tsagkaris et al., 2021)

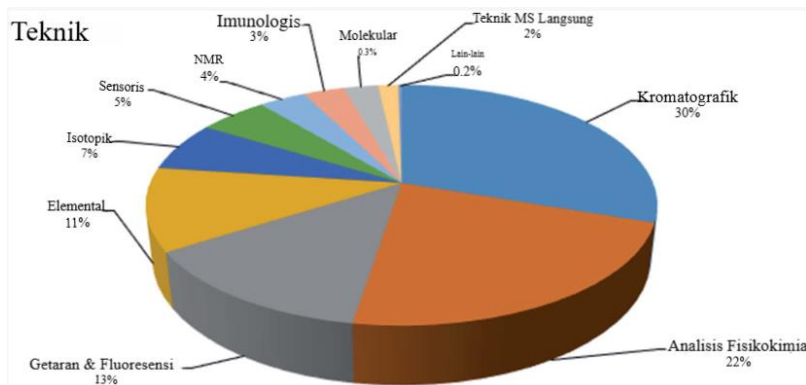
Penting untuk menyelidiki pengelompokan makalah yang terkait dengan berbagai isu keaslian, yaitu asal botani, asal geografis, dan pemalsuan (Gambar 3.3). Diskriminasi asal botani merupakan isu keaslian yang paling banyak dipelajari, yakni sekitar 44% dari makalah yang ditinjau, diikuti oleh pemalsuan (sekitar 21%) dan diskriminasi asal geografis (14%). Ada pula makalah yang meneliti asal botani dan geografis secara bersamaan, yaitu sekitar 7%.

Seperti yang telah disebutkan, harga madu secara langsung berkaitan dengan asal botani dan geografisnya (Soares et al., 2017a), sebuah fakta yang menjelaskan mengapa mayoritas makalah difokuskan pada asal madu. Selain itu, penelusuran menunjukkan bahwa sekitar 13% artikel ilmiah membahas nilai gizi madu berdasarkan perbedaan asal botani dan/atau geografis. Terdapat pula persentase yang sangat kecil, yakni sekitar 1%, dari artikel yang membahas isu keaslian lainnya, seperti jenis produksi (Barriel, 2018), pembedaan antara madu embun dan madu bunga (Bergamo et al., 2019), serta pembedaan madu berdasarkan sumber entomologi yang berbeda (Zuccato et al., 2017). Namun, yang penting dicatat adalah hampir seluruh artikel tersebut diterbitkan setelah tahun 2017, yang menunjukkan adanya isu keaslian baru dan yang sedang berkembang yang akan diselidiki lebih lanjut di masa mendatang.

Mengenai evolusi temporal artikel berdasarkan isu keaslian, studi tentang asal botani menunjukkan peningkatan yang signifikan sejak periode 2008–2010 (Gambar 3.4). Artikel mengenai pemalsuan dan asal geografis menunjukkan peningkatan yang relatif stabil, sedangkan persentase studi mengenai nilai gizi madu tetap konstan sejak periode 2005–2007. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan fakta bahwa nilai gizi madu secara umum telah terdefinisi dengan baik.



Gambar 3. 4. Evaluasi temporal studi per masalah autentikasi (Tsagkaris et al., 2021)

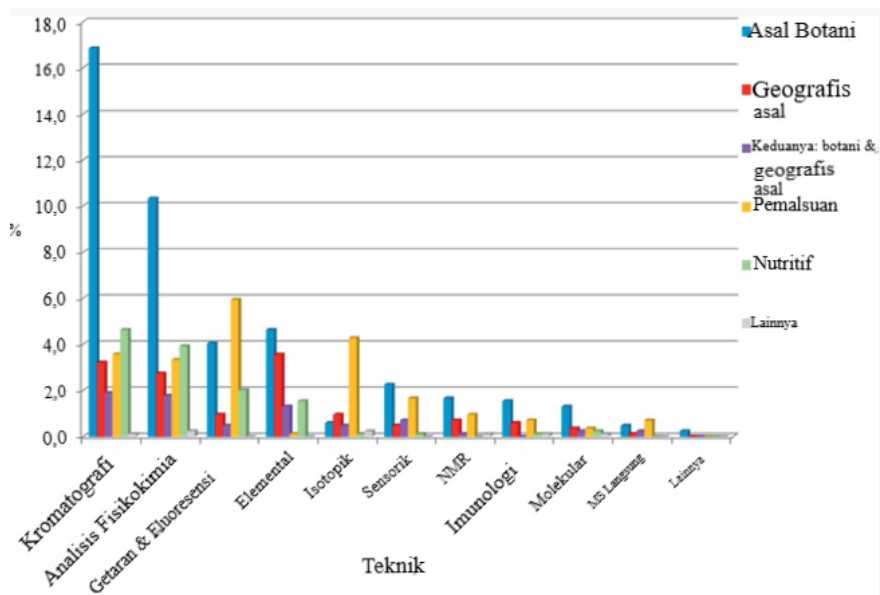


Gambar 3.5. Perbandingan Teknik Analisis dalam Artikel Autentikasi Madu (Tsagkaris et al., 2021)

Keaslian madu dipelajari menggunakan berbagai teknik analisis (Gambar 3.5). Menariknya, lebih dari 50% artikel menggunakan teknik kromatografi (30%) dan analisis fisikokimia (22%) untuk menentukan sifat fisikokimia madu, seperti pH, konduktivitas elektrokimia, warna, dan viskositas. Meskipun teknik kromatografi mahal, rumit, dan memakan waktu, teknik ini dianggap sebagai alat yang ampuh dan mampu menghasilkan perbedaan yang signifikan apabila dikombinasikan dengan kemometrik. Di sisi lain, analisis fisikokimia biasanya menjadi langkah awal dalam memantau asal madu karena biayanya yang murah, proses yang cepat, dan penerapannya yang sederhana. Selain itu, spektroskopi vibrasi dan fluoresensi, serta teknik analisis unsur, isotop, sensorik, NMR, imunologi, dan molekuler juga digunakan.

Menarik untuk memperhatikan teknik mana yang paling banyak dipelajari pada setiap masalah keaslian (Gambar 3.6). Teknik kromatografi dan analisis fisikokimia terutama digunakan dalam studi penentuan asal botani. Teknik vibrasi dan fluoresensi sebagian besar diterapkan untuk mengungkap kasus pemalsuan, sekaligus untuk studi penentuan asal botani. Sedangkan teknik imunologi dan molekuler lebih banyak digunakan untuk penentuan asal botani, sebagaimana diharapkan, karena teknik tersebut telah lama digunakan dalam penentuan asal genetik. Teknik isotop terutama digunakan dalam studi pemalsuan. Secara khusus, analisis rasio isotop karbon stabil (SCIRA) merupakan metode resmi untuk mendeteksi pemalsuan madu, yang didasarkan pada rasio isotop karbon stabil,

khususnya $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ atau $\delta^{13}\text{C}$. Rasio ini dapat mengungkap penambahan gula ke dalam madu serta pemberian makan berlebihan oleh lebah.



Gambar 3.6. Persentase Artikel tentang Keaslian Madu Berdasarkan Teknik Analisis dan Isu Utama (Tsagkaris et al., 2021)

BAB IV

PEMALSUAN MADU: DAMPAK EKONOMI DAN RISIKO PENGENDALIAN KUALITAS GLOBAL

4.1. Pengantar

Pemalsuan bermotif ekonomi (EMA), menurut definisi kerja Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat (FDA), adalah "penggantian atau penambahan zat secara curang dan disengaja dengan tujuan meningkatkan nilai produk atau mengurangi biaya produksinya, yaitu demi keuntungan ekonomi" (*United States Food and Drug Administration*, 2011a). EMA dapat terjadi pada semua produk makanan dan sering disebut sebagai penipuan makanan. Dalam arti yang luas, kami menganggap EMA dalam makanan mencakup penjualan produk makanan yang tidak memenuhi standar.

EMA bukanlah masalah baru. Masalah ini telah diatur dalam undang-undang daging Mesir kuno, undang-undang anggur Yunani dan Romawi, serta undang-undang pangan Amerika Serikat sejak tahun 1784 (Crawford, 1954). Produk makanan bernilai tinggi sering menjadi sasaran EMA karena insentif ekonomi yang kuat. Dalam industri pemanis, sasaran umum EMA meliputi sirup maple dan madu. *Codex Alimentarius*, yang ditetapkan oleh Organisasi Pangan dan Pertanian (FAO) serta Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), berfungsi sebagai seperangkat standar pangan internasional sukarela, pedoman, dan kode praktik yang "berkontribusi pada keamanan, kualitas, dan keadilan perdagangan pangan internasional" (*United States Food and Drug Administration*, 2012a).

Codex Alimentarius mendefinisikan madu sebagai "zat manis alami yang dihasilkan oleh lebah madu dari nektar tanaman atau dari sekresi bagian tanaman yang hidup, atau ekskresi serangga penghisap tanaman pada bagian tanaman yang hidup, yang dikumpulkan oleh lebah, diubah dengan menggabungkan zat-zat tertentu milik lebah sendiri, kemudian disimpan, dikeringkan, dan dibiarkan di sarang madu hingga matang" (*Codex Alimentarius Commission*, 1981).

Salah satu tantangan dalam mengidentifikasi EMA dalam madu adalah kurangnya standar identitas federal untuk madu di Amerika Serikat. Beberapa negara bagian berupaya mengatasi ambiguitas ini. Misalnya, Florida memiliki standar identitas yang sangat mirip dengan

definisi Codex Alimentarius, sedangkan badan legislatif negara bagian Wisconsin sedang mempertimbangkan definisi madu yang sesuai dengan standar *Codex Alimentarius* (Florida Department of State, 2010; Wisconsin Legislative Documents, 2011). Uni Eropa memiliki standar identitas untuk madu yang hampir identik dengan *Codex Alimentarius* (Europa, 2010).

Beberapa jenis EMA telah diidentifikasi dalam industri madu. Jenis-jenis tersebut meliputi aditif yang digunakan untuk mengencerkan dan memperpanjang umur simpan madu, pemberian pakan tambahan secara intensif kepada lebah madu guna meningkatkan produksi madu, penggunaan antibiotik dan bahan kimia lain pada populasi lebah madu yang dapat meninggalkan residu dalam madu, serta penutupan asal negara madu yang sebenarnya untuk menghindari tarif dan pemeriksaan.

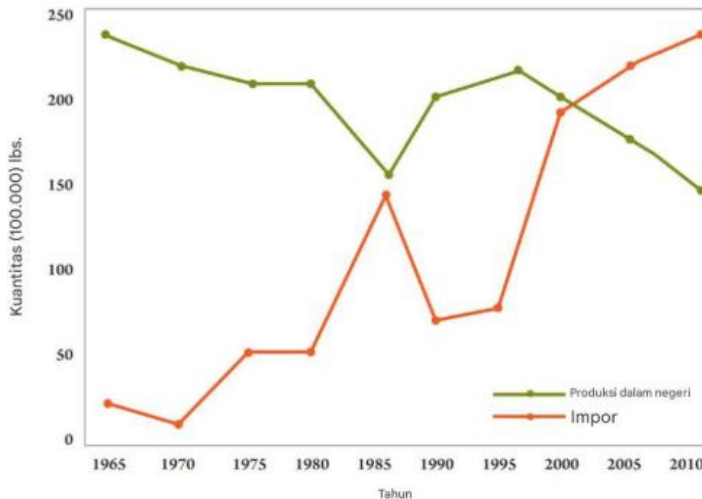
Salah satu jenis EMA yang umum adalah perpanjangan atau pengenceran madu dengan pemanis lain yang lebih murah. Pengencer yang sering ditemukan antara lain sirup jagung, tebu, dan bit (Fairchild et al., 2000; Paradkar & Irudavarai, 2001). Pada tahun 2011, harga rata-rata madu dalam jumlah besar sekitar 173 sen per pon, sedangkan sirup jagung fruktosa tinggi sekitar 32 sen per pon dan gula bit olahan sekitar 56 sen per pon (United States Department of Agriculture Economic Research Service, 2013). Dengan perbedaan harga yang mencapai tiga hingga lima kali lipat, penggunaan bahan pengencer madu dapat memberikan keuntungan ekonomi yang signifikan.

Pemberian pakan tambahan berupa sirup gula kepada lebah madu mungkin diperlukan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi koloni di daerah yang sumber makanan alaminya kurang memadai, serta dapat penting dalam membangun koloni (Standifer et al., 1977). Pakan tambahan ini juga dapat digunakan sebagai sumber makanan selama musim dingin dan awal musim semi sebelum produksi madu dimulai. Namun, jika pemberian pakan tambahan dilakukan selama masa produksi madu, hasilnya dapat menyerupai madu yang dicampur dengan sirup gula tambahan (Cordella et al., 2005).

Kualitas madu yang dihasilkan melalui pemberian pakan tambahan secara intensif memiliki profil gula yang berbeda dari madu murni dan mengencerkan sifat nutrisi alami madu. Dengan demikian, perubahan kualitas produk akhir ini melalui pemberian pakan

tambahan intensif pada lebah madu merupakan salah satu bentuk EMA pada madu.

Antibiotik tertentu dan bahan kimia lainnya dapat digunakan dalam pemeliharaan lebah untuk memastikan kesehatan koloni lebah. Di Amerika Serikat, terdapat 10 bahan kimia yang disetujui untuk digunakan dalam koloni lebah madu, tiga di antaranya adalah antimikroba (*Mid-Atlantic Apicultural Research & Extension Consortium*, 2005). Penggunaan obat yang disetujui mencakup waktu penarikan yang diperlukan, yaitu periode selama dan setelah perawatan di mana madu dari sarang yang dirawat tidak boleh dikumpulkan untuk dikonsumsi.



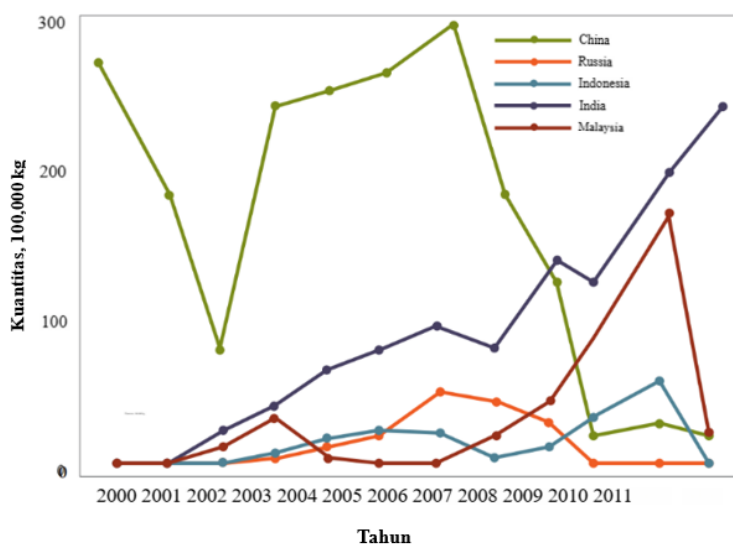
Gambar 4.1. Jumlah produksi madu domestik dan impor AS, 1965–2010.

(Sumber: Departemen Pertanian Amerika Serikat Layanan Informasi Pertanian dan Komisi Perdagangan Internasional Amerika Serikat Data Tarif dan Perdagangan Interaktif Web).

Proses ini harus membantu memastikan bahwa residu obat tidak masuk ke dalam persediaan makanan manusia. Ketika obat yang tidak disetujui digunakan atau obat yang disetujui digunakan tanpa periode penarikan yang tepat, residu antibiotik dan obat lain dapat terkandung dalam madu. Ini merupakan jenis ketiga dari masalah yang telah diidentifikasi oleh EMA dalam produksi madu.

Selain itu, dalam beberapa tahun terakhir, beberapa kasus penyembunyian asal negara madu yang sebenarnya telah

didokumentasikan (Standifer et al., 1977; Ward et al., 2009). Praktik ini memungkinkan produsen madu dari negara tertentu untuk menghindari pengujian tambahan atau tarif yang mungkin dikenakan saat mengimpor ke negara lain. Pengiriman madu melalui negara perantara dan pelabelan ulang, yang sering disebut sebagai "*transshipment*" atau "pencucian madu", adalah salah satu metode untuk menyembunyikan asal negara sebenarnya (Schneider, 2011a). Metode lain yang digunakan adalah penghilangan serbuk sari melalui penyaringan madu, karena serbuk sari dapat digunakan untuk mengidentifikasi asal geografis madu.



Catatan: kuantitas termasuk 4 jenis madu curah dan madu yang dikemas untuk penjualan eceran

Gambar 4.2. Jumlah Impor Madu ke Amerika Serikat dari Negara-Negara dengan Produksi Madu Rendah (Sumber: Bea Cukai dan Perlindungan Perbatasan AS; bukan statistik perdagangan resmi AS)

4.2 Penyebab dan Tantangan dalam Pengendalian Kualitas Madu

4.2.1 Penurunan produksi dalam negeri

Dalam dua dekade terakhir, pasar madu di Amerika Serikat telah mengalami pergeseran signifikan, dari pasar yang sebagian besar produksinya berasal dari dalam negeri menjadi pasar yang lebih dari separuh madunya diimpor. Salah satu penyebab penurunan produksi madu tersebut adalah gangguan runtuhnya koloni, yaitu suatu sindrom yang belum diketahui penyebabnya pada lebah madu.

Gangguan ini menyebabkan hilangnya sekitar 33 persen koloni setiap tahun di Amerika Serikat pada periode 2006 hingga 2011 (*United States Department of Agriculture Agricultural Research Service*, 2013). Puncak produksi madu di Amerika Serikat terjadi pada tahun 1969, dengan jumlah produksi hampir mencapai 267 juta pon. Pada tahun 2012, jumlah tersebut menurun hampir 45% menjadi 147 juta pon (*United States Department of Agriculture Economic Research Service*, 2013; Ward et al., 2009). Sementara itu, impor madu meningkat setiap tahun sejak 1969 hingga 2012, mencapai 298 juta pon dan mencakup lebih dari 66% dari total persediaan madu yang tersedia pada tahun 2012 di Amerika Serikat (Gambar 4.1).

4.2.2 Kurangnya standar identitas federal

Pada tahun 1995, juri di Michigan memutuskan untuk mendukung pengolah madu yang didakwa atas penjualan madu palsu, sebagian disebabkan oleh kurangnya peraturan pemerintah mengenai madu (Breen, 2010; *United States Department of Justice*, 1995). Meskipun saat ini belum ada standar identitas federal untuk madu di Amerika Serikat, industri madu di negara tersebut telah berupaya untuk menetakannya. Pada tahun 2006, sebuah Petisi Warga Negara yang diajukan ke FDA oleh berbagai pemangku kepentingan mengusulkan amandemen terhadap Kode Peraturan Federal AS guna memasukkan standar identitas yang serupa dengan definisi Codex Alimentarius. Tanggapan dari FDA menyatakan bahwa keputusan atas petisi tersebut belum dapat diambil karena "prioritas lembaga lain dan keterbatasan sumber daya". Petisi serupa diajukan kembali pada tahun 2007 dan diulang lagi pada tahun 2009 (Litton, 2011). Industri madu mendapatkan dukungan pada tahun 2010 ketika 15 senator AS mengirimkan surat kepada FDA yang menekankan pentingnya mengadopsi standar identitas federal untuk madu. Baru-baru ini, Dewan Perwakilan Rakyat AS menyetujui sebuah Rancangan Undang-Undang yang, jika disahkan, akan mewajibkan Menteri Pertanian untuk menyerahkan temuan yang menjelaskan "bagaimana standar federal yang tepat untuk identitas madu akan sesuai dengan kepentingan konsumen, industri madu, dan pertanian Amerika Serikat" (*United States 112th Congress – 2nd Session*, 2012). Beberapa negara bagian telah menetapkan standar identitas untuk madu (*Florida Department of State*, 2010; *Wisconsin Legislative Documents*,

2011). Namun, standar negara bagian tersebut hanya dapat diberlakukan di wilayah masing-masing. Standar identitas federal untuk madu akan meningkatkan efektivitas penegakan peraturan dengan memberikan definisi hukum mengenai madu yang dijual di Amerika Serikat.

Pengendalian kualitas atau "pengawasan internal" dalam industri madu bervariasi. Survei terhadap pengepak madu di Amerika Serikat yang dilakukan pada tahun 1999 menemukan bahwa hanya 58% responden yang melaporkan melakukan pengujian madu untuk EMA (Fairchild et al., 2000). Berita media yang lebih baru menunjukkan bahwa beberapa pengepak secara rutin melakukan pengujian untuk memastikan kualitas madu yang mereka impor, sementara yang lain enggan membahas topik tersebut (Schneider, 2011b). Menurut CEO *National Honey Board*, banyak pengepak menguji madu yang mereka kelola terutama dari aspek kemurnian, keaslian, dan sumbernya, tetapi tidak ada data spesifik yang tersedia mengenai siapa yang melakukan pengujian dan metode analisis apa yang digunakan (Boynton, 2012).

4.2.3 Metode analisis kualitas madu yang tidak memadai

Metode analisis umum untuk madu yang digunakan oleh industri pangan mencakup teknik yang dapat mengidentifikasi keberadaan gula C4, seperti yang terdapat dalam sirup jagung, dan gula C3, seperti yang terdapat dalam sirup beras (Boynton, 2012). Spektrometri massa rasio isotop karbon stabil (SCIRA) dapat digunakan untuk mendeteksi pemalsuan madu dengan sirup yang meniru profil gula madu (Elflein & Raezke, 2008). Batas deteksi metode laboratorium ini sekitar 20%, sehingga masih memungkinkan terjadinya pengenceran dengan sirup gula lain hingga tingkat yang memberikan keuntungan ekonomi yang signifikan.

Metode resmi Asosiasi Komunitas Analisis (AOAC) Internasional untuk menguji EMA dalam madu, yaitu AOAC 998.12, menggabungkan SCIRA dengan pengukuran kadar protein madu yang terisolasi. Metode ini meningkatkan sensitivitas pengujian dan menurunkan batas deteksi hingga 7%, yang masih memungkinkan beberapa pemalsuan, namun dapat mengidentifikasi pemalsuan dalam tingkat tinggi.

Selain itu, penggunaan metode ini untuk identifikasi EMA madu oleh badan pengawas menjadi rumit karena FDA saat ini belum mampu melakukan bagian SCIRA dari pengujian ini, yaitu AOAC 991.41. Menurut peringatan impor madu yang dikeluarkan oleh FDA, “laboratorium FDA tidak memiliki kemampuan instrumental untuk menganalisis madu menurut Metode Analisis Resmi AOAC Internasional, Metode Resmi AOAC 991.41, yang memerlukan spektrometer massa rasio isotop” (*United States Food and Drug Administration*, 2013a). Kondisi ini mengharuskan FDA mengirimkan bahan untuk dianalisis oleh pihak ketiga, sehingga pengujian lebih berguna sebagai survei industri daripada sebagai strategi intervensi.

4.2.4 Kebijakan perdagangan

Pada bulan Oktober 1994, sebuah petisi diajukan kepada Komisi Perdagangan Internasional Amerika Serikat (USITC) dan Departemen Perdagangan Amerika Serikat atas nama Federasi Peternakan Lebah Amerika dan Asosiasi Produsen Madu Amerika. Petisi tersebut menuduh bahwa industri madu di Amerika Serikat terancam oleh impor madu Cina yang dijual dengan harga murah. Pada bulan November tahun yang sama, USITC mengeluarkan penetapan awal yang menyatakan bahwa “ada indikasi yang wajar bahwa industri di Amerika Serikat mengalami kerugian material atau terancam kerugian material akibat impor madu dari Republik Rakyat Tiongkok (Tiongkok), yang diduga dijual di Amerika Serikat dengan harga di bawah nilai wajar” (*United States International Trade Commission*, 1994).

Ekspor produk dalam jumlah besar dengan harga di bawah nilai pasar dikenal sebagai praktik “*dumping*” di pasar. Sebagai hasil dari penetapan ini, tarif antidumping diberlakukan pada impor madu dari Tiongkok. Penetapan serupa juga dilakukan oleh USITC pada tahun 2000 terkait impor madu dari Argentina dan Tiongkok. (*United States International Trade Commission*, 2013).

Pada tahun 2000, lebih dari 16% dari total impor madu ke Amerika Serikat berasal dari Tiongkok dan Argentina. Persentase tersebut menurun menjadi 12% pada tahun 2001 dan kurang dari 4% pada tahun 2002. Pada tahun 2012, USITC memberikan suara bulat agar perintah yang berlaku terkait impor madu dari Tiongkok tetap dipertahankan (*United States International Trade Commission*, 2012).

Selain tarif Amerika Serikat terhadap madu dari Tiongkok yang diberlakukan pada tahun 2000, Uni Eropa juga memberlakukan larangan impor madu dari Tiongkok pada tahun 2002. Kebijakan ini menyebabkan terjadinya surplus madu Tiongkok di pasar internasional.

Pada saat impor dari Tiongkok menurun, terjadi peningkatan impor madu dari negara-negara yang secara historis tidak memproduksi atau mengeksport madu dalam jumlah besar (Gambar 4.2). Untuk menghindari tarif tinggi saat mengimpor ke Amerika Serikat dan larangan madu di Uni Eropa, produsen madu Tiongkok menyiapkan rute pengiriman ulang (*transshipment*) madu (Schneider, 2011b). *Transshipment* adalah pengangkutan madu melalui negara perantara, diikuti dengan pelabelan ulang untuk menyembunyikan asal madu yang sebenarnya, sebuah proses yang juga dikenal sebagai "pencucian madu".

Satu skema pencucian madu besar di Amerika Serikat mengakibatkan sebelas orang dan enam perusahaan didakwa atas tuduhan konspirasi global untuk mengimpor madu Tiongkok secara ilegal. Sebanyak 606 pengiriman madu asal Tiongkok masuk ke Amerika Serikat antara Maret 2002 dan April 2008, meskipun secara keliru dinyatakan bahwa madu tersebut berasal dari Rusia, India, Malaysia, Mongolia, Filipina, Korea Selatan, Taiwan, dan Thailand (*United States District Court Northern District of Illinois - Eastern Division*, 2009). Para terdakwa diduga bersekongkol mengimpor madu asal Tiongkok senilai lebih dari 40 juta dolar AS secara ilegal untuk menghindari bea antidumping hampir sebesar 80 juta dolar AS.

Dakwaan tersebut juga menyatakan bahwa madu tetap dijual ke Amerika Serikat meskipun telah diuji positif mengandung residu antibiotik. Sebagian madu ditolak oleh salah satu pembeli karena kandungan antibiotik, namun kemudian madu tersebut dijual kembali meskipun diketahui terkontaminasi antibiotik.

Dalam upaya menghindari penerimaan madu Tiongkok yang dikirim ulang dari India, Uni Eropa melarang impor madu dari India pada Juni 2010 (Schneider, 2011b). Tindakan ini diikuti oleh protes publik dari produsen dan konsumen yang meminta agar tindakan serupa diterapkan di Amerika Serikat (Schneider, 2011a). Namun, Amerika Serikat pada akhirnya tidak melarang impor madu apa pun.

4.2.5 Strategi Peningkatan Pengujian Residu Antibiotik pada Madu Cina

Keberadaan residu antibiotik diatur dalam semua produk makanan yang berasal dari hewan. Antibiotik dan bahan kimia lainnya digunakan dalam industri madu untuk memastikan kesehatan koloni lebah. Di Amerika Serikat, sangat sedikit antibiotik dan bahan kimia yang disetujui untuk digunakan dalam koloni lebah. Selain itu, bahan kimia tersebut hanya diizinkan pada dosis tertentu dengan periode penarikan yang diperlukan guna mengurangi kemungkinan residu antibiotik masuk ke dalam pasokan makanan (*Mid-Atlantic Apicultural Research & Extension Consortium*, 2005).

Misalnya, antibiotik oksitetrasiklin disetujui untuk pencegahan penyakit busuk daun Eropa dan Amerika, yaitu penyakit bakteri yang mempengaruhi populasi lebah madu, dengan dosis 200 mg per koloni sebanyak tiga kali, dengan interval 4–5 hari, serta periode penarikan selama 45 hari. Madu yang diproduksi selama periode penarikan tidak boleh dikumpulkan dan dipasarkan untuk dikonsumsi manusia. Madu yang diimpor dari Tiongkok telah diuji dan ditemukan mengandung residu antibiotik yang tidak disetujui untuk digunakan dalam koloni lebah di Amerika Serikat, seperti kloramfenikol, enrofloksasin, dan siprofloksasin (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2007).

Madu yang diimpor ke Uni Eropa dari beberapa negara, termasuk Tiongkok, Turki, Argentina, Republik Ceko, Uruguay, dan Meksiko, telah terbukti mengandung residu antibiotik, antara lain kloramfenikol, metronidazol, nitrofurantoin, sulfatiazol, streptomisin, linkomisin, oksitetrasiklin, sulfadimidin, dan tilosin (*European Commission*, 2013). Kloramfenikol merupakan antibiotik spektrum luas yang murah, namun dapat menyebabkan kondisi langka dan tidak dapat disembuhkan pada manusia, yaitu anemia aplastik, meskipun dikonsumsi dalam dosis yang sangat rendah. Oleh karena itu, antibiotik ini tidak disetujui untuk digunakan pada hewan penghasil pangan di Amerika Serikat (Merck, 2009). Sejak sekitar tahun 1997, kloramfenikol telah digunakan pada koloni lebah madu di Tiongkok sebagai respons terhadap wabah penyakit busuk daun yang mengancam industri peternakan lebah di negara tersebut (Dharmananda, 2003).

Antibiotik lain yang juga ditemukan dalam madu, seperti enrofloksasin, telah disetujui untuk digunakan pada beberapa jenis

hewan penghasil pangan, namun tidak disetujui untuk penggunaan pada lebah madu di Amerika Serikat (*Mid-Atlantic Apicultural Research & Extension Consortium*, 2005). Enrofloksasin termasuk dalam golongan antibiotik yang dianggap penting bagi kesehatan manusia oleh *Food and Drug Administration* (FDA), sehingga berbagai tindakan telah dilakukan untuk mengurangi penggunaan obat tersebut guna meminimalkan perkembangan resistensi yang meluas (*United States Food and Drug Administration*, 2012b).

Karena adanya residu antibiotik dalam madu Tiongkok, terutama kloramfenikol, pengiriman madu dari Tiongkok harus menjalani pengujian tambahan oleh FDA sebelum dapat dipasarkan di Amerika Serikat (*United States Food and Drug Administration*, 2013b). Keinginan untuk menghindari pengawasan tambahan tersebut memberikan insentif bagi perusahaan untuk mengirimkan madu dengan menyembunyikan negara asal sebenarnya.

4.3 Analisis permasalahan dalam pemalsuan madu

Banyak faktor yang telah diuraikan berdampak negatif pada pengendalian kualitas di pasar madu internasional, sehingga memungkinkan penjualan madu dengan kualitas di bawah standar. Peningkatan tajam impor madu diduga menyebabkan pengawasan regulasi terhadap madu yang dikonsumsi di Amerika Serikat menjadi lebih rendah. Namun, dampak terbesar pada pasar madu internasional berasal dari pergeseran sumber produksi utama dan kebijakan yang bertujuan melindungi produsen madu AS dari praktik perdagangan tidak adil serta madu berkualitas rendah. Kemajuan dalam perlindungan pangan umum beberapa tahun terakhir kemungkinan akan memengaruhi industri madu.

Undang-Undang Modernisasi Keamanan Pangan FDA (FSMA), yang disahkan pada 4 Januari 2011 (*United States 111th Congress*, 2011), menetapkan bahwa importir harus memiliki program untuk memverifikasi bahwa produk makanan yang mereka impor dari pemasok asing tidak dipalsukan atau diberi label yang salah (*United States Food and Drug Administration*, 2013a). Sebagaimana diatur dalam Aturan Usulan FSMA untuk Pengendalian Pencegahan Makanan Manusia, importir wajib memverifikasi bahwa pemasok mematuhi pengendalian pencegahan berbasis risiko yang memadai dan memberikan tingkat perlindungan kesehatan masyarakat yang setara

dengan ketentuan FSMA (*United States Food and Drug Administration, 2011b; United States Food and Drug Administration, 2013a*).

Salah satu risiko dari madu yang dikirim ulang adalah potensi masuknya madu yang menghindari persyaratan keamanan pangan AS karena asal madu dinyatakan secara tidak benar. Pada tahun 2012, total konsumsi madu di AS mencapai 400 juta pon (*United States Department of Agriculture Economic Research Service, 2013*). Ukuran porsi madu yang umum diterima adalah 21 gram, yang berarti sekitar 8,6 miliar porsi madu dikonsumsi di AS pada tahun tersebut (*United States Department of Agriculture Economic Research Service, 2013b*). Selama periode yang sama, hampir 70% madu yang dikonsumsi di AS adalah impor (*United States Department of Agriculture Economic Research Service, 2013c*). Perkiraan ini, dikombinasikan dengan adanya permasalahan luas terkait EMA pada madu, menimbulkan kekhawatiran terhadap kesehatan masyarakat.

Kekhawatiran serius terkait kesehatan manusia mengenai keberadaan kloramfenikol dan antibiotik lain yang dapat menyebabkan resistensi mikroba telah dibahas sebelumnya.

Meskipun jarang, terdapat dokumentasi mengenai reaksi alergi terhadap antibiotik pada beberapa individu yang terpapar residu antibiotik dalam jenis makanan lain (Dewdney et al., 1991). Selain itu, perluasan European Medicines Agency (EMA) terhadap madu menunjukkan kurangnya pengawasan yang berpotensi membuka peluang bagi pemalsuan madu secara sengaja, yang bahkan lebih mengkhawatirkan bagi kesehatan masyarakat. Hal ini memberikan kesempatan bagi Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat (FDA) dan badan kesehatan masyarakat lainnya untuk bersikap proaktif dalam mencegah insiden yang disebabkan oleh konsumsi madu tersebut.

Peraturan perdagangan madu terhambat oleh ketiadaan standar identitas federal untuk madu, keterbatasan metode analitis dalam mendeteksi residu, serta kebijakan perdagangan. Kebijakan ini meliputi larangan sementara impor madu, peraturan antidumping, dan penerapan tarif impor yang ketat terhadap madu dari negara tertentu. Tarif antidumping yang dikenakan pada madu asal Tiongkok, bersama dengan pengujian tambahan terhadap kloramfenikol pada madu Tiongkok di perbatasan AS, telah memberikan insentif yang kuat bagi EMA di pasar madu.

Meskipun upaya regulasi telah dilakukan, negara-negara besar dan organisasi perdagangan belum mampu menjamin keamanan dan kualitas madu impor secara konsisten. Kondisi ini menyebabkan kurangnya jaminan kualitas di seluruh pasar madu. Akibatnya, produk madu yang dipalsukan dapat sampai ke konsumen, yang berujung pada hilangnya kepercayaan konsumen serta meningkatnya risiko dampak negatif bagi kesehatan masyarakat. Pemalsuan madu yang meluas juga berpotensi memengaruhi harga madu di pasar global dan mata pencaharian peternak lebah.

BAB V

MADU DAN KEASLIANNYA

5.1. Pengantar

Madu adalah pemanis alami yang dihasilkan oleh lebah madu dan terdiri dari berbagai jenis gula, komposisi asam organik, asam amino, enzim, dan mineral (da Silva et al., 2016). Namun, madu juga dianggap sebagai salah satu makanan yang paling sering dipalsukan (Fakhlaei et al., 2020). Bentuk pemalsuan yang umum meliputi penambahan gula C4 (gula jagung atau tebu), gula C3 (sirup beras), dan gula invert secara sengaja. Selain itu, sering terjadi pemberian gula kepada lebah madu di luar musim, fermentasi akibat kondisi penyimpanan yang tidak tepat, atau pengolahan yang menyebabkan perubahan kandungan unsur kimia. Dengan demikian, pemalsuan madu dapat merusak manfaat asli madu. Oleh karena itu, upaya untuk mengidentifikasi keaslian madu dilakukan dengan berbagai alat kimia analitik yang beragam (Tura & Seboka, 2020).

Madu, sebagai pemanis alami yang diproduksi oleh lebah, memiliki sejarah panjang sebagai makanan favorit sekaligus obat tradisional. Namun, industri pangan global kini menghadapi tantangan serius akibat maraknya pemalsuan madu, di mana zat asing atau pemanis buatan ditambahkan sehingga merusak kualitas, keaslian, dan nilai gizi produk (Momtaz et al., 2023). Di antara berbagai kasus pemalsuan makanan yang dilaporkan belakangan ini, madu menempati peringkat tertinggi sebagai produk yang sering dipalsukan (Fakhlaei et al., 2020). Tren ini tidak hanya merugikan konsumen, tetapi juga berdampak negatif pada produsen madu asli yang kesulitan bersaing dengan produk palsu yang memenuhi pasar.

Dampak pemalsuan madu meluas ke berbagai bidang, seperti kesehatan konsumen, etika konsumerisme, standar industri, dan hukum perdagangan internasional. Untuk mengatasi tantangan ini, autentikasi madu menjadi sangat penting. Berbagai teknik telah dikembangkan oleh otoritas dan ahli untuk membedakan madu asli dari yang palsu, meskipun tugas ini semakin sulit karena metode pemalsuan yang kian canggih dan sifat madu yang bervariasi.

Industri madu global dipengaruhi oleh praktik di berbagai negara, yang berkaitan erat dengan dinamika pasar melalui perbedaan

budaya, regional, kualitas, perdagangan, keberlanjutan, dan inovasi. Praktik perdagangan madu bervariasi berdasarkan faktor seperti iklim dan tradisi, yang memengaruhi jenis dan rasa madu. Pasar madu merespons perbedaan regional untuk memastikan konsumen mendapatkan beragam pilihan produk. Standar dan sertifikasi kualitas berperan menjaga kemurnian dan keamanan madu, sekaligus membangun kepercayaan konsumen.

Praktik pemeliharaan lebah yang berkelanjutan juga semakin mendapat perhatian, mendorong metode ramah lingkungan di seluruh dunia. Dinamika pasar turut memengaruhi harga dan mata pencaharian peternak lebah di berbagai wilayah. Pertukaran budaya dan inovasi produk madu dari praktik regional turut memberikan manfaat bagi industri global. Peningkatan produksi madu juga dipengaruhi oleh kemajuan teknologi dalam pemeliharaan lebah, pembiakan, nutrisi, pengendalian hama, serta berbagi pengetahuan. Konservasi lingkungan, pengendalian iklim, dan permintaan pasar turut mendorong produktivitas, sehingga ketersediaan madu berkualitas tinggi dapat terpenuhi secara global.

Sementara itu, dedikasi dan keahlian peternak lebah menjadi faktor penting dalam pertumbuhan industri madu. Di India, permintaan madu terus meningkat seiring dengan meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap kesehatan dan preferensi penggunaan pemanis alami. Reputasi madu sebagai alternatif yang lebih sehat dibanding gula rafinasi telah mendorong popularitasnya. Selain sebagai pemanis, madu juga diminati karena khasiat nutrisi dan obatnya. Penggunaan madu yang serbaguna dalam masakan tradisional India, pengobatan Ayurveda, dan berbagai aplikasi kuliner modern semakin meningkatkan permintaan.

Kemudahan akses melalui platform ritel online juga memudahkan konsumen mendapatkan madu, termasuk produk madu organik khusus. Meskipun industri madu di India menghadapi tantangan terkait kualitas dan keaslian, kesadaran konsumen yang meningkat dan inisiatif pemerintah berupaya menjaga kemurnian serta integritas produk madu, sehingga permintaan terus meningkat.

Permintaan madu di berbagai negara bagian di India bervariasi berdasarkan faktor budaya, kebiasaan makan, dan tingkat kesadaran regional. Negara-negara bagian seperti Maharashtra, Punjab, Benggala Barat, Delhi, Bihar, Uttar Pradesh, Rajasthan, dan Tamil Nadu

merupakan produsen madu utama yang memenuhi kebutuhan domestik dan ekspor (Singh, 2021). Secara keseluruhan, permintaan madu di India mencerminkan perpaduan warisan budaya, tradisi kuliner, dan preferensi masyarakat yang semakin sadar kesehatan.

Bab ini membahas berbagai masalah kompleks terkait pemalsuan madu, meliputi motif, teknik, dan konsekuensinya. Selain itu, dibahas pula berbagai langkah teknologi dan regulasi yang diterapkan untuk mengatasi persoalan tersebut, dengan menyoroti isu lebih luas mengenai keamanan dan etika pangan. Penelusuran mengenai pemalsuan madu dan upaya autentikasi mengungkap interaksi antara masyarakat, teknologi, dan alam. Perjuangan melawan pemalsuan madu merupakan upaya mempertahankan keaslian, membangun kepercayaan, dan menjamin masa depan yang berkelanjutan bagi makanan kuno ini.

Instrumen analitik yang dapat digunakan adalah *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS/MS), yaitu teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrometri massa. Keunggulannya terletak pada kemampuannya untuk menganalisis berbagai komponen secara luas, seperti senyawa termal labil, senyawa dengan polaritas tinggi atau massa molekul tinggi, termasuk gula. Metode ini juga dapat digunakan untuk menjelaskan distribusi oligosakarida (gula) dan strukturnya, yang berbeda berat molekul, urutan gula, serta struktur cabang (Kawasaki et al., 1999), serta mengukur secara akurat keberadaan gula bebas (Cocuron et al., 2020).

Metode lain yang cukup berkembang adalah berdasarkan citra digital dan mendapat perhatian besar dari komunitas ilmiah karena biaya rendah, kepraktisan, dan portabilitasnya (Fernandes et al., 2020; Fan et al., 2021). Metode ini didasarkan pada perolehan citra digital secara cepat menggunakan perangkat elektronik seperti smartphone, kamera digital, atau pemindai. Data yang diperoleh kemudian diubah menjadi sistem warna yang sesuai, biasanya merah-hijau-biru (RGB). Nilai RGB tersebut dianalisis menggunakan aplikasi akses terbuka Color Grab (versi 3.6.1, Loomatix ©) (Loomatix, 2017).

Aplikasi ini memungkinkan diperolehnya respons saluran RGB secara real time yang memberikan nama warna secara instan, sehingga memudahkan analisis dalam mengontrol dan menafsirkan respons yang diperoleh selama prosedur. Respons analitis diperoleh

melalui logaritma sederhana dari persamaan yang kemudian ditransfer ke dalam perhitungan transmitansi yang digunakan untuk reaksi kolorimetri sesuai dengan hukum Lambert-Beer.

Madu asli adalah madu yang dihasilkan oleh lebah dari nektar bunga, sedangkan madu campuran adalah madu asli yang ditambahkan dengan zat kimia lain untuk meningkatkan rasa. Selanjutnya, madu sintesis adalah madu buatan tanpa keterlibatan lebah dalam proses pembuatannya, atau disebut madu palsu berupa campuran larutan atau sirup yang menyerupai madu. Dalam pengklasifikasian tersebut, algoritma diperlukan untuk mengelompokkan atau mengidentifikasi data berdasarkan fitur tertentu yang diambil dari seluruh data. Salah satu metode klasifikasi yang telah terbukti efektif dalam berbagai aplikasi adalah algoritma *K-Nearest Neighbor* (Nababan & Jannah, 2023).

Prinsip-prinsip pengukuran dan penerapan dua metode tersebut (LC-MS/MS dan analisis citra menggunakan smartphone) diharapkan dapat membedakan keaslian madu. Hal ini dimungkinkan karena warna madu dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti senyawa fenolik, karotenoid, gula, mineral, serbuk sari, kadar air, jenis bunga dan asal geografis, kondisi suhu serta waktu pemrosesan, penanganan, penyimpanan, usia madu, dan kondisi pengukuran warna. Dengan demikian, setiap warna yang dihasilkan sangat spesifik untuk masing-masing madu, baik madu asli maupun palsu, berdasarkan kandungan gulanya.

Meskipun terdapat keterbatasan akibat kesulitan teknis dan kompleksitas matriks madu, smartphone dan LC-MS/MS akan memainkan peran penting dalam mempopulerkan akses terhadap teknik analisis pangan, khususnya madu. Terutama untuk analisis di lokasi sebagai antarmuka, konektivitas, dan penginderaan jarak jauh yang terintegrasi. Kenyataan ini berfungsi sebagai landasan awal untuk menetapkan metode yang andal dalam mendeteksi keberadaan gula melalui pengukuran warna madu (kolorimetri) yang dapat diulang dan dibandingkan, sekaligus mendorong pengembangan perangkat digital yang lebih praktis. Temuan yang diperoleh juga dapat dimanfaatkan untuk merancang alat atau aplikasi yang sederhana, mudah digunakan, dan berbiaya rendah dalam mendeteksi keaslian madu.

Menurut *Codex Alimentarius*, madu didefinisikan sebagai “zat manis alami yang dihasilkan oleh lebah madu dari nektar tanaman atau dari sekresi bagian tanaman yang masih hidup, atau ekskresi serangga penghisap tanaman pada bagian tanaman yang masih hidup, yang dikumpulkan oleh lebah, diubah dengan menggabungkannya dengan zat-zat tertentu miliknya sendiri, disimpan, dikeringkan, disimpan, dan dibiarkan di sarang madu hingga matang” (*Codex Standar*, 2001). Dengan demikian, madu merupakan produk makanan bernilai tinggi yang banyak dikonsumsi karena rasanya yang unik, nilai gizi tinggi, dan manfaat kesehatan yang bervariasi sesuai dengan komposisi kimianya.

Madu diproduksi dan dipasarkan di seluruh dunia dengan perbedaan mencolok dalam nilai gizi dan kepentingan biologis. Khasiat madu yang fungsional dan meningkatkan kesehatan terutama terkait dengan sifat antioksidan, antibakteri, dan antiperadangan yang telah digunakan untuk tujuan terapeutik (Zhang et al., 2021a; Zhang et al., 2021b). Sifat biologis madu lainnya yang menjanjikan juga telah dilaporkan, termasuk aktivitas antikanker, anti-HIV, dan penyembuhan luka (Geana & Ciucure, 2020; Tsagkaris et al., 2021). Aktivitas biologis tersebut terkait dengan komposisi dan kandungan senyawa madu, seperti flavonoid, asam fenolik, enzim, asam askorbat, karotenoid, pigmen, dan alkaloid.

Madu memiliki rasa unik dan khasiat luar biasa yang meningkatkan kesehatan, sehingga verifikasi keasliannya menjadi fokus industri madu global. Namun, standar kualitas dan metode analisis saat ini masih kurang efektif untuk penentuan dan evaluasi keaslian madu, yang menimbulkan tantangan bagi pasar madu (*China Standard*, 2011; *Council Directive*, 2001; *Codex Standard*, 2001; Tsagkaris et al., 2021; Wu et al., 2017a). Dalam tulisan ini, akan dibahas masalah terkini yang dihadapi oleh industri madu terkait verifikasi keaslian madu, menguraikan kesulitan dalam deteksi dan pengawasan pasar saat ini. Metode pemalsuan madu secara langsung dan tidak langsung akan dijelaskan secara rinci. Selain itu, metode terkini untuk konfirmasi keaslian madu akan ditinjau secara komprehensif. Selanjutnya, kemajuan terkini dalam verifikasi keaslian madu dipaparkan dengan menyoroti keunggulan dan keterbatasannya. Pada bagian akhir, arah inovasi serta solusi baru dibahas dengan tujuan memberikan landasan teoretis bagi

pengendalian mutu madu dan mendorong pengembangan industri madu.

5.2. Isu Global Pemalsuan Madu

Madu merupakan pemanis alami yang diproduksi oleh lebah madu melalui proses pengumpulan nektar, sekresi, dan/atau embun madu dari tanaman. Bahan-bahan tersebut kemudian dicampur dengan sekresi lebah, diubah, dikeringkan, disimpan, dan difermentasi. Oleh karena itu, penambahan bahan lain, baik yang diketahui maupun tidak diketahui, ke dalam madu dilarang (*China Standard*, 2011; *Council Directive*, 2001; *Codex Standard*, 2001; Tsagkaris et al., 2021; Wu et al., 2017a).



Gambar 5.3. Gambaran Skematis Strategi Pemalsuan Madu (Zhang et al., 2023)

Pemalsuan madu merupakan masalah global yang masih berlangsung dan telah memberikan dampak negatif yang signifikan terhadap perkembangan industri madu. Masalah terkait keaslian madu telah banyak dilaporkan dan dapat diklasifikasikan ke dalam dua kategori (Gambar 5.1), yaitu:i) **Metode langsung**, yang meliputi pemalsuan madu dengan penambahan pemanis atau pencampuran madu, serta pemberian label yang menyesatkan sebagai madu berkualitas tinggi yang berasal dari sumber geografis atau botani tertentu, termasuk madu organik;ii) **Metode tidak langsung**, yang mencakup pemberian pakan tambahan pada koloni lebah, pemanenan madu mentah, serta penanganan dan penyimpanan yang tidak sesuai.

BAB VI

WARNA MADU DAN RASA

6.1. Pengantar

Temuan yang dilaporkan oleh Pajak dan Swiglo (2015) membahas perubahan warna pada beberapa jenis madu. Analisis statistik menunjukkan bahwa nektar madu segar yang diuji tidak memperlihatkan perbedaan yang signifikan pada nilai L^* , b^* , dan C^* . Namun, madu dari nektar berwarna terang (seperti rape, akasia, linden, dan multifloral) berbeda dengan madu dari nektar berwarna gelap (seperti heather dan soba) dalam hal kontribusi warna hijau/merah (a^*) dan sudut Hue (h°).

Selain itu, teramati bahwa madu akasia segar, madu multifloral, dan madu heather yang berasal dari berbagai daerah di Polandia menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam tingkat kecerahan, dengan standar deviasi rata-rata nilai L^* yang relatif tinggi. Temuan ini terkait dengan perbedaan konsistensi madu, yang memiliki pengaruh penting terhadap tingkat kecerahannya. Selama masa penyimpanan, madu mengalami kristalisasi, sehingga identifikasi terhadap warna cerah menjadi kurang optimal.

Madu yang berwarna lebih gelap, seperti madu soba, cenderung memiliki rasa yang lebih kuat. Namun, seperti halnya aturan lainnya, terdapat pengecualian. Jenis nektar dan serbuk sari tertentu dapat menghasilkan madu berwarna gelap dengan rasa yang ringan. Lebah jarang menghasilkan madu monofloral, yaitu madu yang berasal dari satu jenis bunga saja. Artinya, lebah biasanya mengumpulkan nektar dan serbuk sari dari berbagai sumber untuk menghasilkan madu. Peternak lebah memberi label pada madu mereka berdasarkan sumber utama nektar dan serbuk sari yang dikumpulkan oleh lebah. Serbuk sari dari tanaman *goldenrod*, misalnya, dapat menggelapkan warna madu semanggi yang sebenarnya berwarna terang. Oleh karena itu, menilai rasa madu hanya dari tampilannya bukanlah ide yang tepat.

Madu organik merupakan salah satu variasi madu yang didasarkan pada sumber bunga tempat lebah mengumpulkan nektarnya. Agar madu dapat dikategorikan sebagai organik, lebah

harus mencari makan hanya dari bunga-bunga yang juga bersertifikat organik. Meskipun hal ini cukup sulit untuk diwujudkan, memahami kategori warna resmi dari USDA yang digunakan oleh produsen madu untuk menilai produknya dapat sangat membantu. Dengan begitu, konsumen dapat memperoleh gambaran yang lebih jelas mengenai rasa madu yang akan dibeli.

Tabel 6.2 Standar pengukuran warna berdasarkan Pfund (Frasco et al., 2018)

No	Tipe Warna	Standar pengukuran Pfund
1	<i>Water White</i>	≤ 8 Pfund
2	<i>Ekstra White</i>	>8 dan ≤17 Pfund
3	<i>White</i>	>17 dan ≤34 Pfund
4	<i>Ekstra Light Aber</i> (Kuning Muda Ekstra)	>34 dan ≤50 Pfund
5	<i>Light Amber</i> (Kuning Muda)	>50 dan ≤85 Pfund
6	<i>Amber</i> (Kuning)	>85 dan ≤114 Pfund
7	<i>Dark Amber</i> (Kuning Gelap)	>114 Pfund.

Kategori warna madu USDA didasarkan pada sistem penilaian berkelanjutan yang dikenal sebagai **skala Pfund**. Untuk menilai warna madu, produsen menuangkannya ke dalam wadah khusus yang digunakan untuk membandingkan warna mulai dari yang paling terang hingga yang paling gelap. Dari sinilah proses penilaian warna menjadi lebih kompleks. Dalam pengembangan peringkat Pfund, produsen mengukur jarak antara salah satu ujung irisan kaca berwarna dengan warna madu yang sesuai. Jarak yang diukur, dalam satuan milimeter, kemudian digunakan sebagai nilai Pfund dari madu tersebut.

Secara tradisional, madu berwarna terang lebih diminati dibandingkan madu berwarna gelap. Meskipun terdapat banyak hal yang perlu dipertimbangkan, pemilihan warna madu pada dasarnya bersifat subjektif. Madu berwarna gelap tidak dapat dianggap sebagai madu yang buruk, sebagaimana madu berwarna kuning muda atau warna lainnya juga tidak serta-merta berarti lebih baik. Penilaian ini mengacu pada tujuh kategori warna madu menurut USDA (Tabel 6.1) Warna madu dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti kandungan senyawa fenolik, karotenoid, gula, mineral, dan serbuk sari, kadar air, jenis bunga dan asal geografis, suhu serta kondisi selama proses pemrosesan, penanganan, penyimpanan, umur madu, hingga kondisi

dan metode pengukuran warna. Untuk dapat membandingkan warna madu secara akurat, diperlukan sistem pengukuran standar internasional. Oleh karena itu, penting untuk menyajikan informasi terperinci mengenai persiapan madu dan kondisi pengukuran yang tepat, termasuk pengaturan suhu, rentang panjang gelombang, dan langkah panjang gelombang yang digunakan.

Metode tertentu dapat dijadikan dasar dalam pengembangan lebih lanjut untuk menetapkan metode yang andal, sehingga pengukuran warna madu dapat dilakukan secara berulang dan dapat dibandingkan, misalnya melalui penerapan analisis Pfund. Oleh karena itu, disarankan untuk menggunakan seluruh rentang spektral (380–780 nm) selama pengukuran dan menjaga kondisi suhu tetap stabil. Berdasarkan hasil tersebut, disarankan pula pembentukan kelompok ahli khusus untuk analisis warna madu dalam kelompok kerja ISO/TC 34/SC 19/WG 1 – *Honey*, di mana validasi dan penerapan metode ini dapat dijabarkan secara lebih rinci (Bodor et al., 2021).

Beberapa jenis madu unifloral dan polifloral dikenal luas di seluruh dunia, di mana asal-usulnya sangat memengaruhi komposisi serta sifat sensorik madu. Di antara berbagai sifat sensorik tersebut, warna merupakan atribut penting yang juga termasuk dalam analisis rutin terhadap madu (Da Silva et al., 2016; Oddo & Piro, 2004). Penentuan warna madu dapat dilakukan dengan beberapa metode. Teknik yang paling umum digunakan biasanya berdasarkan pada perbandingan visual, seperti menggunakan skala Pfund, Lovibond, dan Jack.

Karakterisasi warna madu mencakup penentuan intensitas warna, yang dapat didefinisikan sebagai serapan bersih antara dua panjang gelombang, yaitu selisih antara A450 nm dan A720 nm (dinyatakan dalam satuan mAU). Penentuan intensitas warna ini dapat memberikan informasi mengenai kandungan pigmen dalam madu (Karabagias et al., 2020). Metode ini telah digunakan secara luas selama beberapa dekade terakhir dan tetap populer karena mampu memberikan karakterisasi warna madu secara cepat, murah, dan sederhana (Karabagias et al., 2020).

Teknik spektroskopi dan kolorimetri dapat memberikan evaluasi warna madu yang lebih akurat serta mampu mengidentifikasi perbedaan kecil antar madu. Namun, masih diperlukan metode analisis warna yang lebih universal dan terstandarisasi, sehingga

memungkinkan para peneliti untuk mengkarakterisasi madu secara lebih objektif dan mendeteksi perbedaannya dengan lebih tepat.

Terdapat hubungan positif antara warna madu, yang terutama dipengaruhi oleh keberadaan pigmen berbeda, dengan potensi bioaktivitasnya. Telah dilaporkan bahwa madu berwarna gelap mengandung total fenolik yang lebih tinggi dibandingkan madu berwarna terang, sehingga memberikan kapasitas antioksidan yang lebih tinggi (Bertoncelj et al., 2007).

Warna madu bergantung pada asal tanaman nektarnya, dengan variasi mulai dari kuning muda hingga kuning tua dan bahkan hitam (Khalil et al., 2012). Warna madu dijelaskan melalui tiga komponen utama, yaitu *L* (*lightness*/kecerahan – menunjukkan tingkat kecerahan, apakah mendekati putih atau hitam), *hab* (*hue* – mewakili warna yang tampak pada suatu objek), dan *C*ab* (*chroma* – menggambarkan intensitas, saturasi, atau kemurnian suatu warna; nilai tinggi menunjukkan warna yang kaya, sedangkan nilai rendah menunjukkan warna yang mendekati abu-abu) (Tuberoso et al., 2014).

Sebagaimana dilaporkan oleh Ciursa et al. (2021), parameter *L* pada madu akasia tercatat sebesar 40,08, pada madu bunga matahari 36,41, dan pada madu tilia 39,40. Sementara itu, nilai *hab* pada ketiga jenis madu tersebut relatif sebanding dan menunjukkan karakter warna kekuningan. Sebagai perbandingan, Ahmed et al. (2007) melaporkan bahwa nilai *L** untuk madu di India berkisar antara 40,96 hingga 53,53. Nilai kecerahan dan *chroma* pada madu akasia sesuai dengan temuan Juan-Borrás et al. (2014), yang mencatat bahwa jenis madu ini memiliki nilai *L** tertinggi dan nilai *C*ab* terendah, yang berarti memiliki kemurnian warna paling rendah dibandingkan dengan madu tilia dan madu bunga matahari.

6.2. Parameter warna madu segar

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa madu dari nektar berwarna terang (rape, akasia, linden, dan multifloral) berbeda dengan madu dari nektar berwarna gelap (*heather* dan *soba*) dalam hal kontribusi warna hijau/merah (*a**) dan sudut rona (*h°*). Parameter *a** pada madu segar memiliki nilai negatif maupun positif (Tabel 6.1). Madu dari nektar berwarna terang (rape, akasia, linden, dan multifloral) menunjukkan kontribusi serupa terhadap warna

hijau (nilai a^* negatif menunjukkan kontribusi pigmen hijau, seperti klorofil); nilai rata-rata a^* berkisar antara -3,56 hingga -2,08. Rentang nilai a^* yang luas pada madu akasia dan multifloral menunjukkan adanya perbedaan yang cukup besar dari jenis madu yang sama, meskipun kontribusi warna merah tidak teramati (Tabel 6.1). Pada madu dari nektar berwarna gelap (*heather* dan *soba*), terlihat adanya kontribusi warna merah (nilai a^* positif), yang merupakan ciri khas keberadaan antosianin dan flavonoid lain dalam tanaman penghasil nektar (Piotraszewska-Pajak & Ciszak, 2001; Alvarez-Suarez et al., 2010).

Tabel 6.2. Tingkat kecerahan (L^*), intensitas warna merah atau hijau (a^* , nilai positif dan negatif), intensitas warna kuning (b^* , nilai positif), kroma metrik (C^*) dan sudut Hue (h°) madu nektar segar (Pajak & Swiglo, 2015).

Tipe Madu	Parameter	L^*	a^*	b^*	C^*	h°
Rape n = 3	Rata-rata $\pm$ SD ^{1,2}	70.56 ± 2.70^a	-2.08 ± 0.67^a	18.51 ± 1.35^a	18.64 ± 1.29^a	96.85 ± 2.36^a
	Range	68.56÷73.64	-1.35÷(-2.65)	17.47÷20.04	17.61÷20.03	93.86÷98.37
Acacia n = 3	Rata-rata $\pm$ SD	53.10 ± 16.27^a	-2.71 ± 1.61^a	9.32 ± 4.17^a	9.71 ± 4.43^a	105.13 ± 4.15^a
	Range	34.32÷62.89	-0.87÷(-3.85)	4.55÷12.26	4.63÷2.72	100.82÷109.09
Linden n = 3	Rata-rata $\pm$ SD	64.27 ± 5.21^a	-3.56 ± 0.11^a	19.12 ± 1.75^a	19.45 ± 1.72^a	100.60 ± 1.00^a
	Range	58.43÷68.43	-3.43÷(-3.63)	17.41÷20.91	17.78÷1.22	99.85÷101.74
Multifloral n = 3	Rata-rata $\pm$ SD	60.15 ± 12.54^a	-2.40 ± 2.18^a	22.89 ± 8.69^a	23.11 ± 8.60^a	96.90 ± 5.85^a
	Range	45.75÷68.63	-0.51÷(-4.79)	15.03÷32.22	15.15÷2.22	90.91÷102.61
Heather n = 3	Rata-rata $\pm$ SD ²	49.62 ± 14.79^a	2.38 ± 1.84^b	25.19 ± 12.36^a	25.33 ± 12.43^a	84.70 ± 2.63^b
	Range	33.07÷61.53	0.90÷4.44	11.01÷33.69	11.05÷33.74	81.81÷86.96
Buckwheat n = 3	Rata-rata $\pm$ SD	51.28 ± 6.38^a	6.32 ± 1.86^b	26.62 ± 3.52^a	27.44 ± 3.00^a	76.24 ± 5.44^b
	Range	44.46÷57.11	4.39÷8.10	23.43÷30.39	24.79÷0.71	70.91÷81.78

¹ a, b – rata-rata dalam kolom dengan letter yang sama adalah tidak berbeda secara signifikan pada $\alpha = 0.05$.

² Dari Piotraszewska-Pajak (2012).

Untuk semua jenis madu, parameter b^* bernilai positif, yang menunjukkan dominasi warna kuning dari pigmen seperti karotenoid yang terdapat dalam nektar tanaman. Telah dilaporkan bahwa madu berwarna gelap memiliki kandungan karotenoid yang sangat kaya

(Alvarez-Suarez et al., 2010). Pengamatan serupa juga dilakukan oleh Bertoncelj et al. (2007) pada madu dari Slovenia.

Meskipun madu dari nektar berwarna terang berbeda dengan madu dari nektar berwarna gelap dalam hal nilai a^* , kontribusi nilai a^* terhadap nilai kroma (C^*) tergolong kecil. Oleh karena itu, tidak terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik dalam nilai C^* antara madu berwarna terang dan gelap. Pada madu dari nektar berwarna terang, sudut rona (h°) berada di kuadran kedua ruang warna ($h^\circ > 90^\circ$), sedangkan pada madu dari nektar berwarna gelap berada di kuadran pertama ($h^\circ < 90^\circ$).

Untuk madu akasia dan linden yang dianalisis, nilai L^* dan a^* secara umum sejalan dengan yang dilaporkan oleh Bertoncelj et al. (2011), sedangkan nilai b^* tercatat jauh lebih rendah. Kondisi ini menunjukkan bahwa nilai b^* pada madu asal Slovenia dapat berada pada kisaran 6,26 hingga 31,70 untuk madu akasia, serta antara 19,34 hingga 41,13 untuk madu linden.

Berbeda dengan madu multifloral dari Slovenia (nilai a^* berkisar antara -3,30 hingga 5,77), pada madu yang diteliti dalam studi ini tidak ditemukan kontribusi warna merah (nilai a^* positif) yang signifikan. Selain itu, kontribusi warna kuning pada madu multifloral asal Polandia juga lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Bertoncelj et al. (2011).

Analisis statistik menunjukkan bahwa madu nektar segar yang diuji tidak memiliki perbedaan yang signifikan dalam nilai L^* , b^* , dan C^* . Namun, madu nektar berwarna terang (rape, akasia, linden, dan multifloral) berbeda dari madu nektar berwarna gelap (heather dan buckwheat) dalam kontribusi warna hijau/merah (a^*) dan sudut rona (h°). Selain itu, madu akasia, multifloral, dan heather segar yang berasal dari berbagai wilayah di Polandia juga menunjukkan perbedaan signifikan dalam tingkat kecerahan, yang ditunjukkan oleh simpangan baku nilai rata-rata L^* yang relatif tinggi (Tabel 6.1). Temuan ini berkaitan dengan perbedaan konsistensi yang berpengaruh besar terhadap kecerahan madu. Selama penyimpanan, madu mengalami proses kristalisasi yang menyebabkan tingkat kecerahannya menjadi kurang beragam.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa madu akasia dan madu heather merupakan jenis madu yang paling mudah mengalami perubahan warna pada seluruh kondisi

penyimpanan yang diterapkan dalam pembahasan ini. Sebaliknya, madu lobak dan madu soba secara umum menunjukkan kestabilan warna yang lebih tinggi. Telah diketahui bahwa perubahan kimia pada makanan, termasuk madu, cenderung melambat pada suhu dingin, dan kondisi tersebut umumnya direkomendasikan untuk penyimpanan makanan. Kristalisasi madu, yang terjadi lebih cepat pada suhu dingin dibandingkan suhu ruang, merupakan satu-satunya proses fisik yang secara khusus memengaruhi tingkat kecerahan madu. Kondisi penyimpanan yang dingin dan gelap tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap komposisi kimia maupun sifat biologis makanan, sehingga penyimpanan dalam suhu dingin sebaiknya direkomendasikan untuk semua jenis madu (Pajak & Świątło, 2015).

Tabel 6.3. β -karoten, Likopen dan warna (mm Pfund) pada madu yang berbeda (Smetanska et al., 2021)

Asal Madu	β -karoten (mg/kg)	Likopen (mg/kg)	Warna (mm Pfund)	Warna
Acacia, Germany	18.015	10.227	26.508	<i>White</i>
El-Sider Libya	13,070	7.394	49.905	<i>Extra light Amber</i>
Clover Egypt	26.604	9.702	20.281	<i>White</i>
Sider, Yemen	12.199	6.216	51.019	<i>Light Amber</i>
Pine, Germany	9.104	11.899	94.843	<i>Amber</i>
Sider, Saudi Arabia	11.255	4.752	92.588	<i>Amber</i>

6.3. β -karoten, likopen, dan karakteristik warna

Analisis warna madu serta karakteristik warnanya disajikan pada Tabel 6.3. Kandungan β -karoten dan likopen pada madu yang diuji menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan rentang masing-masing antara 9,10 hingga 26,604 mg/kg dan 4,75 hingga 11,89 mg/kg. Konsentrasi β -karoten tertinggi ditemukan pada madu semanggi asal Mesir, diikuti oleh madu akasia asal Jerman. Sementara itu, madu sider dari Arab Saudi dan madu pinus dari Jerman memiliki kandungan β -karoten terendah di antara seluruh madu yang diuji. Madu pinus dari Jerman juga menunjukkan kandungan likopen tertinggi dibandingkan madu lainnya. Hasil ini sejalan dengan temuan Ferreira et al. (2009) pada madu asal Portugal, dan lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Alvarez-Suarez et al. (2010) untuk madu asal Kuba, yaitu berkisar antara 5,57 hingga 1,17 mg β -karoten ekuivalen per kilogram madu. Warna madu umumnya dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti kandungan pigmen

(karotenoid dan flavonoid), kandungan fenolik total, usia, asal botani, kontak dengan logam, serta metode penanganannya (Moniruzzaman et al., 2013).

Menurut standar warna yang disetujui oleh USDA, madu dengan nilai Pfund antara 8 hingga 16 diklasifikasikan sebagai madu ekstra putih. Seiring meningkatnya nilai Pfund, warna madu menjadi semakin gelap dan tergolong sebagai madu amber jika nilai Pfund berada antara 86 hingga 114.

Madu semanggi dan madu akasia merupakan jenis madu yang paling terang, dengan nilai Pfund terendah masing-masing sebesar 20,281 mm dan 26,508 mm, sehingga keduanya tergolong madu putih. Sementara itu, madu pinus dan madu Sider KSA mencatatkan nilai Pfund tertinggi, masing-masing sebesar 94,843 dan 92,588, dan tergolong sebagai madu amber.

Hasilnya menunjukkan bahwa madu semanggi dan akasia memiliki nilai L^* tertinggi, yaitu masing-masing 64,43 dan 61,83, yang menunjukkan tingkat kecerahan yang tinggi. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua jenis madu ini dengan madu lainnya yang diuji. Madu Sider dan madu pinus KSA yang berasal dari Jerman mencatatkan nilai rata-rata L^* terendah, yaitu 22,03 dan 20,67, tanpa perbedaan signifikan di antara keduanya, dan keduanya diklasifikasikan sebagai madu amber.

Selain itu, ditunjukkan pula adanya korelasi negatif antara nilai L^* dan kandungan senyawa dalam madu yang diuji. Artinya, semakin gelap warna madu, semakin rendah nilai L^* -nya, yang disebabkan oleh tingginya kandungan total flavonoid dan senyawa polifenol. Selain itu, parameter a^* dan b^* bervariasi antar madu, dengan rentang masing-masing antara 0,69 hingga 11,32 dan 3,08 hingga 10,13. Nilai L^* madu berkisar antara 20,57 hingga 63,91, di mana nilai L^* yang lebih rendah menunjukkan warna madu yang lebih gelap.

Temuan ini sejalan dengan hasil yang dilaporkan oleh Can et al. (2015) untuk madu akasia dan semanggi dari Turki, serta oleh Bertonecelj et al. (2007) untuk madu asal Lithuania. Warna gelap pada madu dapat disebabkan oleh tingginya kadar pigmen, serbuk sari, senyawa fenolik, mineral, serta produk reaksi Maillard (Bertonecelj et al., 2007; Pauliuc et al., 2020).

BAB VII

PEMALSUAN MADU DAN GULA

7.1. Pengantar

Madu mengandung jenis gula lain seperti sukrosa, yaitu disakarida yang terdiri atas fruktosa dan glukosa yang terhubung melalui ikatan α -1-4. Struktur kimia fruktosa dan glukosa dapat ditemukan dalam berbagai buku teks Kimia dan Biokimia, sehingga tidak perlu dijelaskan secara rinci dalam bab ini. Biasanya, fruktosa memiliki rasa yang sedikit lebih manis dibandingkan sukrosa, sedangkan glukosa terasa kurang manis. Tingkat kemanisan madu mono-floral—madu yang berasal dari satu jenis bunga sumber—bergantung pada rasio fruktosa terhadap glukosa yang merupakan hasil pengolahan nektar oleh lebah dari bunga mono-spesifik. Sebagian besar madu yang dijual di pasar merupakan perpaduan berbagai varietas untuk menciptakan rasa dan profil kemanisan yang konsisten. Namun, madu umumnya didominasi oleh fruktosa sehingga menghasilkan rasa manis yang khas.

Gula telah dipisahkan melalui metode pertukaran ion dan fase normal serta metode fase terikat (Dyson, 1990). Gula bermuatan, seperti asam uronat dan gula sulfat, dapat dipisahkan menggunakan metode ini. Gula-gula juga dapat dimodifikasi menjadi bentuk bermuatan, misalnya melalui derivatisasi, agar dapat dipisahkan menggunakan kolom pertukaran ion.

Karbohidrat merupakan komponen utama madu (70–80%), diikuti oleh air (15–20%). Komposisi gula dan kadar air menjadi parameter penting dalam menentukan kematangan madu. Gula utama dalam madu adalah fruktosa dan glukosa, yang jika dijumlahkan bersama kandungan sukrosa digunakan sebagai kriteria kualitas madu di Uni Eropa (*OJEC-Official Journal of the European Communities*, 2002). Selain itu, madu juga mengandung campuran kompleks mono-, di-, tri-, oligo-, dan polisakarida lainnya (Val et al., 1998; Bogdanov et al., 2008).

Gula berperan dalam sifat antibakteri madu serta pengawetannya, karena gula memberikan osmolalitas tinggi dan

aktivitas air rendah yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Komposisi gula dalam madu bervariasi, tergantung pada asal botani, serta dipengaruhi secara lebih rendah oleh kondisi iklim dan asal geografis (Anklam, 1998; Khalil et al., 2011). Kandungan gula dan rasio isotop gula juga menjadi parameter penting dalam mendeteksi pemalsuan madu (Cabañero et al., 2006; Ruiz-Matute et al., 2007a; Elflein & Raezke, 2008; Wu et al., 2017a; Cengiz et al., 2018). Komposisi gula madu telah ditentukan melalui berbagai prosedur analitis (Mate et al., 2018).

7.2. Pemalsuan Madu

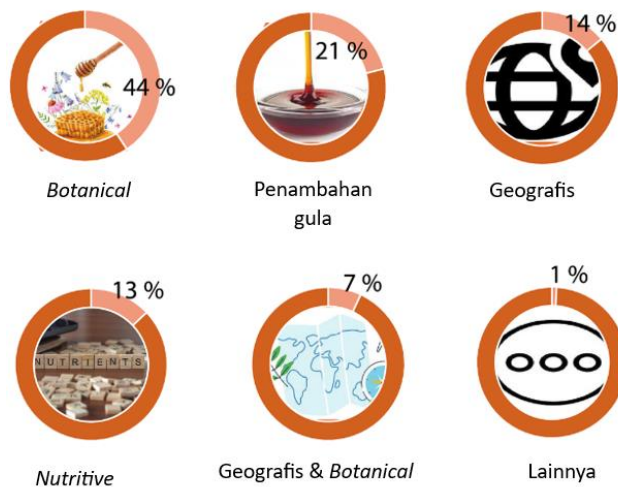
Secara umum, pemalsuan adalah praktik memasukkan zat asing ke dalam makanan dalam berbagai bentuk dengan tujuan meningkatkan kuantitas dan menurunkan kualitas. Menurut *Grand View* (2022), sebuah perusahaan analisis pasar dan konsultasi yang berbasis di Amerika Serikat, nilai pasar madu global menunjukkan pertumbuhan dan diperkirakan mencapai USD 8,58 miliar pada tahun 2021. Bahkan, diperkirakan akan mencapai USD 9,01 miliar pada tahun 2022 dengan pertumbuhan tahunan sebesar 5,2% di berbagai aspek, menurut perkiraan ukuran pasar madu periode 2022–2030 (*Honey Market Size*, 2022).

Pemalsuan makanan merupakan praktik penipuan yang bertujuan untuk mengecoh konsumen. Motif utama di balik pemalsuan makanan adalah keuntungan ekonomi. Pemalsuan dilakukan dengan menambahkan bahan pada produk makanan untuk memperbesar volume atau menggantikan bahan premium dengan bahan yang lebih murah. Masalah ini bukan hal baru dan telah terjadi selama berabad-abad. Bukti hukum pangan pada masa lalu, seperti hukum tentang daging di Roma, hukum Musa dan Mesir, serta hukum makanan di Amerika Serikat sejak tahun 1784, mendukung hal ini (Fairchild et al., 2003).

Pemalsuan makanan dapat secara signifikan menurunkan kualitas gizi makanan dan menimbulkan risiko kesehatan terkait konsumsi makanan (Goyal et al., 2021). Madu, susu, minyak alami, dan anggur merupakan beberapa produk alami yang sering menjadi sasaran pemalsuan di pasar global (Tibola et al., 2018). Pemalsuan produk makanan biasanya terjadi sejak tahap produksi awal hingga produk mencapai tahap akhir. Misalnya, peternak lebah dapat

menambahkan sirup murah ke dalam madu. Selain itu, industri pangan juga berperan penting dalam produksi madu yang tidak etis, mengingat risiko tinggi sepanjang rantai pasokan (Hong et al., 2017).

Meningkatnya permintaan madu yang tidak diimbangi dengan produksi global yang memadai menyebabkan kelebihan produksi madu yang tidak memenuhi standar kualitas, sehingga menimbulkan masalah serius. Proses alami pematangan dan pembentukan madu membutuhkan waktu yang lama. Kondisi ini menyebabkan permintaan yang sangat tinggi sementara pasokan terbatas, sehingga mendorong pelaku pemalsuan menambahkan bahan lain ke dalam madu murni untuk dijual. Hal ini menyebabkan penurunan kualitas dan peningkatan keuntungan ekonomi. Ada berbagai bentuk pemalsuan yang mungkin terjadi, seperti pemalsuan langsung, pemalsuan tidak langsung, pencampuran pemalsuan, serta pemalsuan geografis dan botani yang menyesatkan (Tsagkaris et al., 2021).



Gambar 7.1. Klasifikasi Publikasi ilmiah tentang Autentikasi Madu Berdasarkan Tsagkaris et al. (2021)

Oleh karena itu, upaya berkelanjutan untuk meningkatkan produksi madu yang menyebabkan munculnya masalah pemalsuan madu akhirnya menjadi perhatian utama masyarakat (Fakhlaei et al., 2020). Hal ini disebabkan karena pemalsuan dapat terjadi dalam berbagai bentuk dan berpotensi merusak kualitas serta manfaat madu (Islam et al., 2020; Shrivastava, 2018). Saat ini, praktik pemalsuan

tersebut melibatkan penambahan sirup gula murah untuk meningkatkan volume madu, klaim palsu mengenai asal geografis, serta pasokan bunga palsu guna meningkatkan nilai jual. Praktik ini menimbulkan konsekuensi ekonomi yang sangat merugikan bagi peternak lebah yang memproduksi madu asli, serta menyebabkan penurunan harga madu mentah secara global, sementara biaya produksi meningkat secara signifikan.

Madu merupakan komoditas berkualitas terbaik yang tersedia secara alami (Fakhlaei et al., 2020). Meskipun demikian, pemalsuan madu menempati urutan ketiga dalam database penipuan makanan Farmakope Amerika Serikat, setelah susu dan minyak zaitun. Sebagai salah satu target pemalsuan, madu termasuk dalam sepuluh produk makanan yang paling banyak dipalsukan di Eropa (García, 2018). Untuk menghindari pemalsuan dan penipuan madu, pengetahuan yang lebih analitis mengenai jenis madu sangat penting bagi konsumen dan industri makanan. Oleh karena itu, identifikasi penanda khusus dapat membantu otentikasi dan meningkatkan nilai komersial produk madu.

Asal madu sangat penting karena memberikan rasa yang berbeda dari madu lainnya. Madu dari daerah tertentu memiliki posisi lebih tinggi di pasaran karena kualitasnya yang spesifik, sehingga harganya lebih tinggi (Geana & Ciucure, 2020). Selain itu, madu merupakan matriks makanan yang kompleks dengan komposisi yang bervariasi secara signifikan berdasarkan asal geografis, varietas botani, dan kondisi lingkungan, sehingga sulit untuk menetapkan standar produk yang akurat dan membedakannya dari madu palsu. Asal botani seperti akasia, manuka, kastanye, timi, linden, jeruk, dan bunga matahari dapat diverifikasi dengan mengidentifikasi penanda tertentu (Tafere, 2021).

Selain pemalsuan yang telah disebutkan, beberapa jenis pemalsuan madu lainnya menurut Codex Alimentarius, yang dirangkum lebih lanjut oleh Tsagkaris et al. (2021), mencakup berbagai aspek terkait autentikasi madu seperti botani, geografis, penambahan gula, dan lain-lain (Gambar 7.1).

7.3. Pemalsuan Gula

Pemalsuan madu dengan pemanis merupakan masalah keaslian yang sangat penting. Pemanis berikut telah terdeteksi dipalsukan

dalam madu: sirup gula dari jagung, tebu, dan gula bit, serta sirup yang berasal dari alam. Berbagai metode analisis untuk mendeteksi senyawa tersebut dalam madu telah dilaporkan, antara lain berdasarkan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) (Ouchemoukh et al., 2010), kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS) (Ruiz-Matute, 2007b; Sanz et al., 2004), spektroskopi (Chen et al., 2011; Kelly et al., 2006), kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (HP-TLC) (Puscas et al., 2013), resonansi magnet nuklir resolusi tinggi (HR-NMR) (Bertelli et al., 2010), spektroskopi Raman (Li et al., 2012), dan kromatografi anion kinerja tinggi dengan deteksi amperometri berdenyut (HPAEC-PAD) (Cordella et al., 2005; Morales et al., 2008).

Teknik-teknik tersebut umumnya didasarkan pada penentuan komposisi gula dalam madu. Oleh karena itu, hasilnya mungkin kurang memuaskan dalam membantu pengambilan keputusan yang tegas karena senyawa yang dianalisis memiliki struktur molekul yang serupa. Namun, metode rasio isotop standar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ telah dikembangkan untuk mendeteksi pemalsuan madu dengan sirup gula tebu, jagung, atau beras (Cai et al., 2013; Padovan et al., 2003; Simsek et al., 2012; Tosun, 2013). Metode ini berdasarkan perbedaan rasio isotop karbon yang dihasilkan oleh tanaman dengan siklus fotosintesis berbeda.

Sirup gula dari tebu dan jagung memiliki rasio isotop $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ yang khas karena tanaman tebu dan jagung menggunakan siklus fotosintesis C4, berbeda dengan sebagian besar tanaman asal madu yang menggunakan siklus fotosintesis C3. Terdapat kesepakatan umum bahwa tanaman dengan siklus fotosintesis Calvin-Benson (tanaman C3) memiliki nilai $\delta^{13}\text{C}$ antara -23‰ hingga -28‰, sedangkan tanaman dengan siklus fotosintesis Hatch-Slack (tanaman C4) memiliki nilai antara -9‰ hingga -15‰ (Cabanero et al., 2006; Ruiz-Matute et al., 2010a). Perbedaan rasio isotop ini digunakan untuk mendeteksi madu yang dipalsukan dengan sirup gula yang berasal dari tanaman C4. Namun, karena lebah umumnya menghasilkan madu dari tanaman C3, madu dengan nilai $\delta^{13}\text{C}$ lebih kecil dari -23,5‰ dapat menimbulkan kecurigaan (Simsek et al., 2012). Meski demikian, penentuan nilai $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pada madu saja mungkin tidak cukup untuk mendeteksi pemalsuan madu dengan sirup gula C4. Dalam kasus seperti ini, nilai $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ harus ditentukan pada protein yang diambil dari madu. Nilai $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dalam protein digunakan sebagai standar

internal (Anklam, 1998; White & Winters, 1989), dan nilainya harus sama jika madu dan fraksi proteinnya berasal dari sumber yang sama.

Tulisan ini memaparkan validasi internal metode IR-MS untuk penentuan nilai $\delta^{13}\text{C}$ pada madu. Meskipun telah tersedia berbagai publikasi terdahulu yang membahas validasi metode IR-MS dalam konteks pemalsuan madu, sebagian di antaranya belum mencakup beberapa parameter validasi penting, seperti LOD (*limit of detection*), LOQ (*limit of quantification*), dan nilai pemulihan. Dalam pembahasan ini, validasi teknik dilakukan secara internal dengan memasukkan parameter-parameter tersebut. Hasil validasi menunjukkan bahwa metode yang disempurnakan ini mudah diterapkan dan akurat dalam menentukan status pemalsuan madu yang berasal dari pemanis dengan nilai $\delta^{13}\text{C}$ yang berbeda. Konsep ini dapat diterapkan sebagai metode andal dalam studi akreditasi laboratorium serta sebagai analisis rutin di laboratorium pengendalian mutu (Cengiz et al., 2014).

7.4. Tipe pemalsuan madu

Madu memiliki nilai gizi dan rasa yang unik. Harga madu lebah alami jauh lebih tinggi dibandingkan dengan pemanis lainnya, seperti gula tebu olahan, gula bit, atau sirup jagung. Akibatnya, pemanis yang lebih murah tersebut sering digunakan sebagai bahan pengotor dalam madu (Gambar 7.2). HFCS (*High Fructose Corn Syrup*), sirup glukosa, sirup sakarosa yang diproduksi dari bit atau tebu, serta sirup gula invert merupakan bahan pengotor umum dalam madu (Guler et al., 2014; Tosun, 2013). Fruktosa dan glukosa adalah dua indikator utama dalam analisis kualitatif madu. Bahan pengotor, seperti sirup invert, dapat dimodifikasi untuk meniru profil sukrosa-glukosa-fruktosa alami madu, sehingga pemalsuan menjadi lebih sulit terdeteksi dengan metode umum.

Penambahan sejumlah kecil sirup invert tidak mengubah kadar fruktosa dan glukosa di luar kisaran normal yang ditemukan dalam madu (Paradkar & Irudayaraj, 2002). HFCS jauh lebih murah dibandingkan madu murni, sementara komposisinya mirip dengan madu, sehingga deteksinya menjadi sulit (Li et al., 2012; Abdel-Aal et al., 1993). Sirup inulin fruktosa tinggi (HFIS) terutama mengandung oligofruktosa, yaitu campuran oligosakarida dengan berbagai panjang rantai yang memiliki unit fruktosa yang dihubungkan oleh ikatan β -

(2→1) ke unit glukosa tunggal terakhir (Ruiz-Matute et al., 2010a; Ronkart et al., 2007; Van Laere & Van den Ende, 2002).

Hidrolisis enzimatis parsial inulin secara industri menghasilkan sirup dengan berbagai tingkat polimerisasi yang kini banyak digunakan sebagai pemanis pengotor dalam madu (Low & Hammond, 1996). Gula bit berasal dari tanaman C3, sedangkan gula jagung dan tebu berasal dari tanaman C4. Oleh karena itu, penambahan gula tebu atau sirup jagung ke dalam madu mudah dideteksi, sedangkan deteksi gula bit sulit dilakukan karena tidak banyak mengubah rasio isotop karbon dalam madu (Kropf et al., 2009).

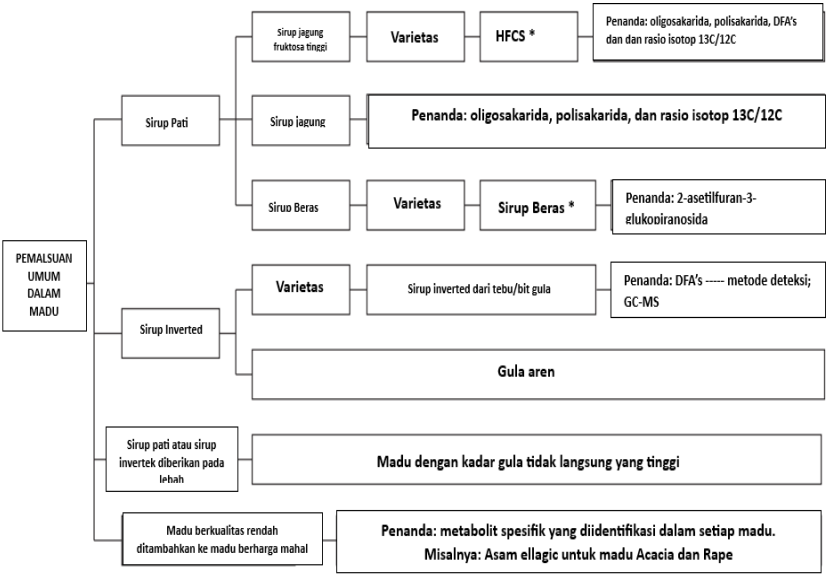
Hidroksi metil furfural (HMF), produk inversi asam, dapat digunakan sebagai indeks untuk mendeteksi keberadaan sirup invert dalam madu (Paradkar & Irudayaraj, 2002). Namun, kadar HMF dapat meningkat akibat pemanasan atau penyimpanan madu, sehingga validitas HMF sebagai indikator bahan pengotor menjadi dipertanyakan (Pérez-Arquillué et al., 1994).

Zat pengotor madu yang baru, yaitu sirup beras, terbukti lebih sulit dideteksi dengan metode yang umum digunakan karena berasal dari tanaman C3, yang menjalani siklus fotosintesis Calvin yang sama dengan tanaman penyedia nektar madu alami. Selain itu, pembuatan sirup beras melibatkan hidrolisis polisakarida dan oligosakarida, yang menyulitkan deteksi keberadaannya dalam madu (Xue et al., 2013). Gula tebu dan gula aren merupakan zat pengotor yang umum digunakan di India.

Komposisi normal gula aren terdiri atas hingga 50% sukrosa, hingga 20% gula invert, dan hingga 20% air, serta mengandung bahan tak larut seperti protein dan serat. Harga gula aren yang relatif murah membuatnya berpotensi digunakan sebagai bahan pengotor oleh produsen madu. Warna cokelat tua alami gula aren menyebabkannya sulit dibedakan dari madu, terutama madu multiflora (Mishra et al., 2010).

Pemalsuan tidak langsung telah sering terjadi dalam beberapa tahun terakhir akibat pemberian makanan tambahan secara berlebihan kepada koloni lebah selama periode aliran nektar utama. Hal ini merupakan ketidakadilan besar bagi konsumen dan produsen madu murni (Guler et al., 2008; 2014; Ruiz-Matute et al., 2010b). Deteksi juga diperlukan terhadap madu yang dipalsukan secara tidak langsung.

Banyak tantangan yang dihadapi, karena hingga kini belum diketahui secara pasti bagaimana lebah madu memanfaatkan sirup gula komersial setelah diberi makan, serta bagaimana gula tersebut diubah—menjadi jenis apa dan berapa kadarnya dalam madu yang dihasilkan. Selandia Baru memiliki beragam jenis madu dari bunga asli, salah satunya adalah madu manuka.



*Wang et al., 2014; White & Winters, 1989; Kelly et al., 2006

Gambar 7.4. Bahan Campuran yang Umum Ditemukan pada Madu di Pasaran

BAB VIII

TEKNIK ANALISIS CAMPURAN GULA

8.1. Pengantar

Permintaan terhadap produk makanan alami meningkat di kalangan masyarakat umum karena manfaat kesehatannya yang luas (Sazvar et al., 2018). Aspek ini mendorong lonjakan penggunaan madu sebagai pengganti gula tebu dan pemanis lainnya. Namun, tingginya permintaan terhadap madu telah membuat industri produksi madu menjadi rentan terhadap praktik pemalsuan (Soares et al., 2017b).

Pemalsuan madu umumnya dilakukan dengan cara menambahkan sirup gula murah atau mencampurkan madu berkualitas rendah dengan madu premium (Brar et al., 2022). Sirup gula yang sering digunakan dalam praktik pemalsuan tersebut antara lain berasal dari tebu, jagung, beras, sirup jagung fruktosa tinggi, dan sirup invert (Stefas et al., 2022).

Autentikasi madu menjadi perhatian penting dalam industri pengolahan madu karena keanekaragaman varietas madu berdasarkan asal geografis dan botanisnya (Moškrič et al., 2021). Deteksi pemalsuan madu menggunakan metode konvensional, seperti spektroskopi Raman, spektroskopi inframerah transformasi Fourier (FTIR), resonansi magnet inti (NMR), kromatografi, dan lain-lain, telah terbukti memiliki tingkat akurasi dan keandalan yang tinggi dalam menjamin mutu. Namun, metode-metode tersebut memiliki sejumlah kelemahan.

Sebagai contoh, deteksi pemalsuan madu menggunakan NMR, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan metode kromatografi merupakan proses yang kompleks dan memerlukan upaya yang besar. Hal ini terjadi karena komposisi madu yang rumit menyerupai sifat kimiawi dari senyawa-senyawa yang digunakan dalam pemalsuan (Yong et al., 2022).

Meskipun para peneliti telah mengembangkan metode yang murah dan akurat untuk penjaminan mutu produk pangan, metode tersebut kini telah mengalami kemajuan, baik dari segi efisiensi biaya maupun daya tahannya. Hal ini dilakukan untuk mengatasi keterbatasan teknologi instrumen konvensional yang canggih.

Dalam lima tahun terakhir, sebagian besar perhatian diarahkan pada pemanfaatan metode spektroskopi dan teknologi berbasis sensor untuk mendeteksi pemalsuan pada produk pangan. Berbagai studi telah berhasil membuktikan adanya pemalsuan madu dengan menggunakan beberapa metode, seperti FTIR, NIR, dan spektroskopi UV, yang dikombinasikan dengan teknik kemometri. Kemajuan teknologi juga telah berhasil menurunkan biaya dan waktu yang dibutuhkan instrumen dalam menganalisis bahan, sehingga meningkatkan permintaan penggunaannya di industri maupun laboratorium pengujian kualitas pangan.

Meski demikian, metode yang ada masih dapat ditingkatkan, terutama dalam hal kekokohan serta penyederhanaan kompleksitasnya. Oleh karena itu, para peneliti saat ini tengah mengembangkan metode analisis yang lebih akurat dan cepat secara real-time dengan memanfaatkan teknologi kecerdasan buatan (*Artificial Intelligence/AI*) untuk menjamin pengendalian mutu makanan di setiap tingkat rantai pasokan pangan (Brar et al., 2022).

Berdasarkan data ekonomi Departemen Pertanian Amerika Serikat (USDA) menunjukkan bahwa produksi madu dalam negeri menurun sekitar 14% pada tahun 2021 dibandingkan tahun 2020. Sementara itu, konsumsi madu meningkat sebesar 8% seiring dengan bertambahnya jumlah penduduk. Namun, peningkatan jumlah konsumen ini menimbulkan kekhawatiran terhadap kualitas makanan yang tersedia di pasar, terutama yang berkaitan dengan makanan organik dan bergizi (Hossain et al., 2020).

Pemalsuan madu, seperti penambahan sirup gula atau pemanis buatan, merupakan praktik penipuan yang dapat membahayakan kesehatan konsumen dan menurunkan kualitas madu (Yan et al., 2022). Karena lebah mengunjungi berbagai jenis bunga, madu murni memiliki profil rasa yang unik. Pemalsuan dapat mengubah atau mengaburkan karakteristik khas tersebut.

Pemalsuan madu juga dapat berdampak pada perekonomian, khususnya bagi peternak lebah dan produsen madu (Wu et al., 2017a). Menentukan apakah madu telah dipalsukan merupakan tantangan tersendiri, karena beberapa jenis pemalsuan sulit dikenali hanya dengan pengamatan visual.

Peternak lebah, produsen madu, dan badan pengatur telah menggunakan berbagai metode konvensional untuk mengevaluasi

keaslian dan kemurnian madu, seperti uji pelarutan air, uji kertas saring, uji nyala, uji kepadatan, dan pola kristalisasi (Naila et al., 2018; Siddiqui et al., 2017; Tsagkaris et al., 2021). Selain itu, sejumlah tes laboratorium standar juga digunakan untuk mendeteksi adanya pemalsuan dalam madu (Bertelli et al., 2010; De Souza et al., 2021; Nespeca et al., 2020; Puscas et al., 2013).

Meskipun metode konvensional dapat menunjukkan tanda-tanda awal kemungkinan pemalsuan, pengujian laboratorium lanjutan tetap diperlukan. Terlebih lagi, jenis kontaminan yang digunakan dalam pemalsuan semakin kompleks, sehingga pendeteksiannya menjadi semakin sulit dan memerlukan keahlian serta peralatan khusus.

8.2. *Liquid Chromatography (LC)* dan Gula Madu

Secara umum, karbohidrat merupakan salah satu komponen terpenting dalam berbagai jenis makanan. Karbohidrat dapat hadir dalam bentuk yang terisolasi maupun terikat dengan makromolekul lainnya. Gula merupakan jenis karbohidrat sederhana yang berperan penting dalam fungsi biologis kehidupan sehari-hari, seperti menyediakan energi untuk menjalankan berbagai fungsi vital tubuh makhluk hidup. Sebagian besar gula alami mengandung enam hingga dua belas atom karbon dalam strukturnya. Gula umumnya berbentuk kristal, larut dalam air, dan memiliki rasa manis. Gula komersial yang paling umum adalah sukrosa, yaitu disakarida yang dikenal sebagai gula putih.

Madu sebagian besar terdiri atas gula sederhana, yaitu glukosa dan fruktosa, yang termasuk dalam kelompok monosakarida, dengan kadar air berkisar antara 17% hingga 20%. Madu juga mengandung jenis gula lain seperti sukrosa, yaitu disakarida yang tersusun dari fruktosa dan glukosa yang terhubung melalui ikatan α -1,4. Struktur kimia fruktosa dan glukosa telah banyak dijelaskan dalam buku-buku teks dasar Kimia dan Biokimia, sehingga pada bab ini tidak akan dibahas kembali secara rinci.

Secara umum, fruktosa memiliki tingkat kemanisan yang sedikit lebih tinggi dibandingkan sukrosa, sedangkan glukosa memiliki rasa manis yang lebih rendah. Tingkat kemanisan madu monofloral—yaitu madu yang berasal dari satu jenis sumber bunga—dipengaruhi oleh rasio fruktosa terhadap glukosa yang diperoleh dari lebah yang

mengumpulkan nektar bunga spesifik. Sebagian besar madu yang beredar di pasaran merupakan campuran dari berbagai jenis bunga untuk menghasilkan rasa dan profil kemanisan yang konsisten. Meskipun demikian, fruktosa dalam madu umumnya lebih dominan, sehingga menghasilkan cita rasa yang manis.

Pemisahan gula dapat dilakukan dengan metode pertukaran ion dan kromatografi fase normal (Dyson, 1990). *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan detektor indeks bias (*Refractive Index Detector*/RID) digunakan secara luas untuk analisis kandungan gula. Beberapa jenis kolom yang digunakan antara lain kolom amino dan kolom karbohidrat timbal, dengan fase gerak yang telah direkomendasikan untuk tujuan tersebut (Folkes & Jordan, 1996; Pushparajah & Nicholas, 2006).

Metode ini dikembangkan oleh Veena et al. (2018) untuk menentukan kandungan fruktosa, glukosa, dan sukrosa dalam berbagai bahan, seperti madu, gula aren, gula tebu, nira aren, dan sirup aren. Hasil validasi metode menunjukkan bahwa bahan dengan kandungan sukrosa yang tinggi menunjukkan pemulihan yang lebih baik ketika digunakan pelarut 65% CH₃CN. Kandungan total gula dalam gula aren diperkirakan sebesar 65% saat menggunakan 85% CH₃CN, dan sebesar 86,02% ketika menggunakan 65% CH₃CN. Hasil tersebut sejalan dengan data studi pemulihan yang menunjukkan bahwa pemulihan sukrosa menurun ketika digunakan pelarut 85% CH₃CN.

Berdasarkan pengamatan kromatogram, diketahui bahwa kedua sistem pelarut yang digunakan pada pekerjaan tersebut tidak memperlihatkan keberadaan gula pereduksi (fruktosa dan glukosa) dalam sirup aren, gula aren, nira aren, maupun gula aren tebu (Veena et al., 2018).

8.3. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS/MS)

Berbagai jenis pemalsuan yang telah dibahas pada bagian sebelumnya bersifat kompleks, sehingga sulit untuk menentukan keaslian madu hanya dengan satu metode. Selain itu, madu komersial umumnya merupakan campuran dari berbagai sumber, yang menyebabkan batasannya menjadi tidak jelas. Komposisi madu dipengaruhi oleh jenis lebah penghasilnya (genus lebah madu), musim

produksi, serta metode pengawetan yang digunakan (Donkersley et al., 2017).

Tabel 8.1. Karya Ilmiah tentang Deteksi Sirup Gula dalam Madu (Lanjewar et al., 2024)

Referensi	Dataset / Metode koleksi data	Klas/ Regresi	ML model dan performan	Cross Validation
Noviyanto & Abdulla. 2021	58 sampel dari 21 tipe madu; VIS-NIR	Klas = 21	SVC: Accuracy = 88.7%	K-kali aplikasi
Shao et al. 2022	60 Sampel; VIS-NIR HIS (400-1000 nm)	Klas = 2; 0, 5, 10, 15, 20, 30 dan 40%	LIBSVM: AA = 92.5% dan RMSE = 5.26%	10- kali
Razavi & Kenari, 2023	40 Sampel; UV-Vis spectroscopy (200 to 800 nm)	Klas = 3; ratios: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, and 1:16	SVR: RMSE = 0.970, R2 = 0.98, and STD = 5.62	X
Machuca et al. 2022	84 Sampel; HSI (420-730 nm)	Klas = 6; 0, 10, 20, 30, and 40%	SVM: AA = 93.0%	10-kali F1 Score = 98.4%
Phillips & Abdulla. 2023	HIS (400–1000 nm)	Klas = 12; 0, 5, 10, 25, and 50%	SVM: TA = 97.6% and AA = 99.9%	5-kali F1 = 94.0%
Minaei et al. 2017	52 sampel madu; VIS/NIR HSI (400–1000 nm)	Klas = 50	RBF Accuracy =90%	5- kali
Noviyanto & Abdulla. 2020	58 Samples; HSI (400–1000 nm)	Klas = 21; 5%, 10%, 25%, 50%.	SVC: BalAcc = 91.0%	6- kali
Shafiee et al. 2014	129 v; CIE L*a*b colourimetric method	Classes = 7	ANN: R2 = 0.990	X
Calle et al. 2023	11 Sampel; Vis-NIR spectroscopy (400 to 2500 nm	Klas = 2; 5 to 50%	SVR: RMSE =1.89 dan R2 = 0.99	5- kali
Al-Mahasneh et al. 2021	28 Sampel; Physiochemical Properties taken by Colorimeter	Klas s = 7; 0% to 100%	RBF-ANN (SSE = 0.073, RE = 0.021, R2 = 0.992)	X
Irudayaraj et al. 2003	56 Sampel; FTIR spectroscopy	Klas = 6; 1% to 25%,	Klas = 6; 1% to 25%,	X
Shafiee et al. 2016	112 Sampel; VIS-NIR HSI (400–1000 nm)	Klas = 6; 10%, 20%, 30%, 50%	ANN: Accuracy = 95.0%	X

Oleh karena itu, diperlukan pendekatan analitis yang canggih untuk mendeteksi praktik pemalsuan madu. Berbagai teknik kromatografi modern yang cepat, tepat, dan akurat, seperti kromatografi cair (LC), kromatografi gas (GC), serta kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) yang dilengkapi dengan detektor elektrokimia, telah dilaporkan mampu mengungkap sifat kimiawi madu guna mendeteksi adanya pemalsuan (Ling & Sowndharajan, 2020). Selain itu, beberapa studi juga telah menggunakan metode spektroskopi, seperti spektroskopi inframerah transformasi Fourier (FT-IR), spektroskopi inframerah dekat (NIR), dan spektroskopi RAMAN transformasi Fourier, untuk tujuan serupa (de Souza et al., 2021).

Meskipun GC sering digunakan untuk kuantifikasi, teknik ini memerlukan proses derivatisasi kimia sebelum analisis, sehingga kurang efisien dibandingkan LC, yang lebih unggul dalam mengidentifikasi dan mengkuantifikasi oligosakarida. Ketika dikombinasikan dengan spektrometri massa (MS), teknik ini memungkinkan analisis lebih mendalam terhadap oligosakarida. Data mentah yang diperoleh dari analisis metabolomik kemudian dapat diolah menjadi informasi yang dapat diinterpretasikan, termasuk mengenai struktur oligosakarida dan bentuk anomernya. Namun demikian, teknologi ini masih memiliki keterbatasan, terutama dalam hal volume data yang dihasilkan dan kompleksitas pemrosesannya. Oleh sebab itu, pengembangan metode baru, perbaikan dalam proses preparasi bahan, serta pembuatan pustaka kimia menjadi sangat penting untuk memberikan pemahaman yang lebih mendalam mengenai studi *spatio-temporal* oligosakarida pada tanaman (Benkeblia, 2023).

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) merupakan teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi dari spektrometri massa. Dalam proses ini, kromatografi cair berfungsi memisahkan komponen-komponen dalam bahan, yang kemudian dianalisis oleh spektrometer massa berdasarkan ion bermuatan yang dihasilkan (Harmita et al., 2019).

Prinsip kerja LC-MS adalah pemisahan analit berdasarkan tingkat kepolarannya. Instrumen ini terdiri atas fase diam (kolom) dan fase gerak (larutan tertentu). Campuran analit akan terpisah sesuai

dengan kepolarannya, sehingga menghasilkan waktu retensi yang berbeda-beda. Perbedaan waktu retensi ini akan terlihat pada spektrum dalam bentuk puncak-puncak yang terpisah (Himawan, 2010). LC-MS dapat memberikan informasi mengenai massa molekul, struktur, identitas, dan konsentrasi komponen tertentu dalam suatu bahan. Keunggulan LC-MS antara lain adalah kemampuannya untuk menganalisis berbagai jenis senyawa, termasuk senyawa yang mudah terdegradasi oleh panas, senyawa dengan polaritas tinggi, molekul dengan massa besar, bahkan protein (Parasuraman et al., 2014).

8.4. *Image Analysis dengan Smartphone*

Metode konvensional yang digunakan untuk mendeteksi D-glukosa meliputi kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) (Sato et al., 2008), spektrofotometri (Chen et al., 2014), elektrokemiluminesensi (Xiao et al., 2017), dan fluorometri (Wu et al., 2010). Meskipun metode-metode tersebut memberikan akurasi dan sensitivitas yang memuaskan, penggunaannya memerlukan instrumen yang mahal, tenaga teknis yang sangat terampil, serta prosedur persiapan yang rumit. Persyaratan ini membatasi penerapan metode deteksi D-glukosa di lapangan (Chaichi & Ehsani, 2015).

Sebagai alternatif metode konvensional, biosensor kolorimetri telah dianggap sebagai platform pendeteksian yang menjanjikan untuk D-glukosa karena keunggulannya dalam hal efektivitas biaya, kemudahan penggunaan, serta kemampuan pembacaan secara visual (Li et al., 2019).

Dalam satu dekade terakhir, penggunaan smartphone semakin populer dalam pengembangan biosensor yang berbiaya rendah dan efisien (Guo et al., 2018). Smartphone dengan kamera beresolusi tinggi, prosesor berkecepatan tinggi, dan aplikasi khusus telah dimanfaatkan untuk pengambilan gambar dan analisis data. Aplikasi-aplikasi ini juga telah digunakan untuk mendeteksi albumin serum manusia (Lai et al., 2017), memantau penuaan serta kualitas makanan (Chen et al., 2017), dan menghitung jumlah bakteri (Zheng et al., 2019). Warna yang ditangkap oleh kamera smartphone dapat direpresentasikan menggunakan berbagai model warna seperti RGB (merah, hijau, biru) (Zhang et al., 2014), HSV (*Hue, Saturation, Value*) (Cantrell et al., 2010; Hong & Chang, 2014; Oncescu et al., 2014), koordinat CIE (Komisi Internasional untuk Penerangan), dan CMYK

(cyan, magenta, kuning, dan hitam) (Guo et al., 2015; Meng et al., 2015). Model warna CMYK yang bersifat subtraktif banyak digunakan dalam pencetakan berwarna (Wei et al., 2019).

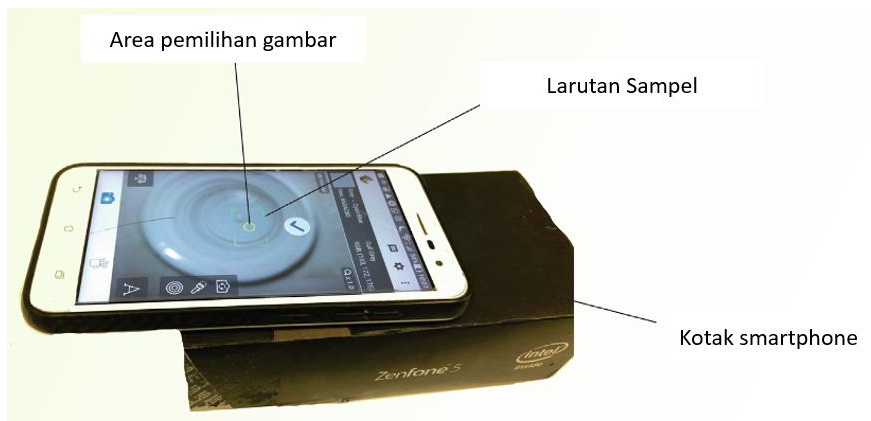
Kombinasi antara kolorimetri dan smartphone saat ini mampu memenuhi kebutuhan analisis pangan yang cepat, akurat, sensitif, dan hemat biaya. Oleh karena itu, metode kolorimetri berbasis smartphone kini menjadi salah satu metode deteksi yang paling mutakhir. Metode ini menunjukkan sensitivitas, selektivitas, dan keandalan yang tinggi dalam deteksi glukosa, sehingga banyak digunakan dalam pengujian pangan (Anconi et al., 2022; Lee et al., 2019; Lin et al., 2018).

Peralatan yang dikembangkan untuk analisis gambar digital (Gambar 8.1) dirancang untuk menyederhanakan konstruksi dan pengoperasiannya. Sebuah kotak berukuran $20 \times 10 \times 6$ cm digunakan sebagai alat pengambilan gambar, dengan bukaan di bagian atas sebagai tempat meletakkan *smartphone*. Umumnya, peralatan analisis gambar digital melibatkan sistem pencahayaan eksternal menggunakan lampu LED dan rangkaian listrik terintegrasi. Namun, dalam pendekatan ini, fungsi LED bawaan dari *smartphone* digunakan sebagai sumber cahaya untuk menerangi reaksi kolorimetri. Tutup botol kaca berdiameter 2 cm digunakan sebagai wadah larutan, dan untuk menempatkannya secara stabil di dalam kotak, busa dipotong membentuk lingkaran agar wadah tidak bergeser.

Setelah peralatan dirakit, dilakukan proses optimasi untuk memperoleh respons saluran RGB yang paling optimal. Seluruh analisis dilakukan dengan memanfaatkan aplikasi sumber terbuka *Color Grab* (versi 3.6.1, Loomatix ©) (Loomatix, 2017). Aplikasi ini memungkinkan pengguna untuk memperoleh respons saluran RGB secara real-time dan menampilkan nama warna yang sesuai secara instan, sehingga mempermudah proses interpretasi dan pengendalian hasil. Respons analitis dihitung menggunakan persamaan logaritmik sederhana, serupa dengan perhitungan transmitansi dalam reaksi kolorimetri berdasarkan hukum Lambert-Beer. Karena sinyal RGB dari reaksi kolorimetri (I) lebih rendah daripada latar belakang analitik (I_0), digunakan persamaan $-\log(I/I_0)$ untuk membentuk kurva analitik (Kohl et al., 2006). Dalam hal ini, hanya satu saluran (channel) yang memberikan sensitivitas analitik terbaik yang digunakan dalam semua percobaan. Terbukti bahwa saluran B (biru)

memberikan sinyal paling sensitif, sesuai dengan ekspektasi, karena warna kompleks yang terbentuk adalah kuning, yang merupakan warna komplementer dari biru (Pessoa et al., 2017).

Untuk mengoptimalkan metode pengambilan gambar digital, area deteksi dianalisis sesuai dengan wilayah yang dipilih oleh aplikasi dalam membaca nilai RGB, menggunakan kamera smartphone beresolusi 16 megapiksel. Area berbentuk lingkaran digunakan untuk memastikan bahwa wadah larutan menerima cahaya secara merata. Selain itu, volume larutan juga dievaluasi untuk mendapatkan respons RGB yang optimal dengan penggunaan reagen seminimal mungkin, sejalan dengan prinsip *Green Chemistry*. Volume larutan yang diuji berkisar antara 200 hingga 1000 μL dalam sembilan tingkat. Seluruh pengujian dilakukan menggunakan konsentrasi glukosa sebesar 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.



Gambar 8.1 Ilustrasi Peralatan untuk penentuan gula pereduksi (Franco et al., 2021).

Deteksi keaslian madu yang cepat, mudah, dapat dilakukan di lokasi, dan berlangsung secara real-time memberikan kepastian kepada konsumen bahwa madu yang dibeli tidak mengalami pemalsuan, seperti penambahan sirup gula. Pada pendekatan ini, dimanfaatkan kamera berbasis smartphone beserta teknik analisis untuk membedakan madu murni dan madu yang telah dipalsukan. Madu murni dikumpulkan dari berbagai wilayah, sementara madu tiruan dibuat dengan mencampurkan sirup gula ke dalam madu asli secara terkontrol. Selain itu, dua algoritme pembelajaran mesin

terawasi diterapkan untuk mendukung proses klasifikasi. Hasil eksperimen menunjukkan bahwa model prediksi berbasis *Random Forest* (RF) memberikan performa yang lebih baik dibandingkan *K-Nearest Neighbour* (KNN). Penilaian hasil yang optimal didasarkan pada tingkat akurasi prediksi, spesifisitas, dan sensitivitas. Model RF menunjukkan kinerja yang sangat baik, dengan akurasi 100%, spesifisitas 100%, dan sensitivitas 100%. Temuan ini berpotensi dimanfaatkan sebagai metode klasifikasi cepat dan andal untuk mendeteksi integritas madu di Ghana dan Afrika Barat secara umum. Hal ini dapat meningkatkan kepercayaan konsumen terhadap perdagangan madu, berkat kemudahan penggunaan dan ketersediaan teknologi ponsel pintar (Teye et al., 2024).

8.5. K-Nearest Neighbor

K-Nearest Neighbor (KNN) adalah sebuah metode yang digunakan untuk mengklasifikasikan data berdasarkan jarak terdekat dari objek data (Cholil et al., 2021). Algoritma ini memiliki keunggulan karena bersifat sederhana dan mudah diterapkan. Namun demikian, algoritma ini juga memiliki kelemahan, yakni membutuhkan biaya komputasi yang cukup tinggi karena perlu melakukan perhitungan jarak secara bersamaan untuk setiap *query instance* (Permana et al., 2021).

Beberapa contoh penerapan algoritma KNN antara lain mencakup klasifikasi seleksi penerima beasiswa (Cholil et al., 2021), pengelompokan jenis kelamin berdasarkan analisis citra wajah (Fansyuri & Yunita, 2023), serta berbagai penerapan lainnya. Pada penerapan ini digunakan beberapa nilai K, yaitu $K = 1$, $K = 3$, $K = 5$, $K = 7$, dan $K = 9$, untuk menentukan nilai K yang paling tepat dalam proses klasifikasi kualitas madu. Penentuan nilai-nilai K tersebut mengacu pada pendekatan yang digunakan oleh Ilhamy dan Sanjaya (2022) dalam pengelompokan jenis buah pisang dengan nilai K yang serupa. Dalam penerapan tersebut, tingkat ketepatan tertinggi dicapai pada $K = 1$ dengan sudut 45 derajat, yaitu sebesar 90%.

Di sisi lain, Muhammad et al. (2021) menerapkan klasifikasi tingkat kematangan buah belimbing dengan menggunakan nilai $K = 1$, 3, 5, 7, dan 9, dan memperoleh tingkat ketepatan tertinggi sebesar 93,33% pada nilai $K = 7$. Temuan ini menunjukkan adanya ketidakkonsistenan antara pemilihan nilai K dan tingkat akurasi

terbaik dalam proses klasifikasi menggunakan KNN. Oleh karena itu, pendekatan ini mencakup pengujian berbagai nilai K untuk memperoleh hasil yang paling optimal.

Selain KNN, metode klasifikasi lain yang dapat dimanfaatkan adalah *Support Vector Machine* (SVM). Namun, berdasarkan temuan yang disampaikan oleh Muchtar dan Muchtar (2024), algoritma KNN menunjukkan tingkat akurasi yang lebih tinggi dibandingkan SVM dalam pengklasifikasian citra digital, yaitu sebesar 98,75% untuk KNN dan 97,5% untuk SVM. Selain itu, Faruk (2020) juga melaporkan bahwa KNN mencapai akurasi 70,61% pada nilai $K = 5$, sedangkan SVM hanya memperoleh 69,85%. Temuan-temuan tersebut memperkuat indikasi bahwa algoritma KNN memiliki kinerja yang lebih unggul dibandingkan SVM dalam pengolahan citra digital.

Dalam pengolahan citra, terdapat istilah yang dikenal sebagai ekstraksi fitur, yaitu proses mengidentifikasi dan mengisolasi fitur-fitur penting dari gambar untuk dianalisis lebih lanjut (Sonka, 2014). Pada penerapan ini, fitur yang diekstraksi mencakup karakteristik warna menggunakan model HSV serta ciri tekstur dengan metode *Gray Level Co-occurrence Matrix* (GLCM).

Ekstraksi fitur HSV kerap dimanfaatkan dalam proses klasifikasi yang melibatkan perbedaan warna dan dikenal mampu memberikan hasil yang optimal. Sebagai contoh, Dzulhijjah et al. (2021) menunjukkan bahwa klasifikasi tingkat kematangan labu siam menggunakan algoritma KNN dengan fitur HSV mencapai tingkat akurasi tertinggi sebesar 95% pada nilai $K = 3$. Sementara itu, penggunaan fitur tekstur melalui metode GLCM mengacu pada pendekatan yang diterapkan oleh Indra Pratama et al. (2023), yang menggabungkan ekstraksi fitur warna (HSV) dan tekstur (GLCM) untuk mengelompokkan tingkat kematangan buah apel menggunakan algoritma KNN, dengan tingkat akurasi yang tinggi, yaitu 91,67%.

Pendekatan pengembangan yang diterapkan dalam pekerjaan ini mengacu pada *Cross-Industry Standard Process for Data Mining* (CRISP-DM). Menurut Wardani (2020), CRISP-DM merupakan suatu konsorsium perusahaan yang didirikan oleh Komisi Eropa pada tahun 1996 dan telah menetapkan CRISP-DM sebagai proses standar dalam data mining yang dapat diterapkan di berbagai sektor industri. Model ini telah divalidasi melalui berbagai proyek besar dan digunakan oleh banyak praktisi di berbagai industri (Chapman et al., 2000). CRISP-

DM dirancang agar fleksibel dan dapat diterapkan dalam berbagai konteks, alat, dan proses data mining (Chapman et al., 2000). Proses CRISP-DM terdiri atas enam fase, yaitu: *business understanding*, *data understanding*, *data preparation*, *modeling*, *evaluation*, dan *deployment* (Wardani, 2020).

BAB IX

DETEKSI SIRUP FRUKTOSA TINGGI PADA MADU MENGUNAKAN *GAS CHROMATOGRAPHY* BERBASIS INULIN

9.1. Pengantar

Sebagai produk pangan alami dengan harga pasar yang relatif tinggi, madu sering mengalami pemalsuan menggunakan pemanis murah seperti sirup jagung (CS), sirup jagung fruktosa tinggi (HFCS), sirup invert (IS), atau sirup inulin fruktosa tinggi (HFIS). Berbagai metodologi telah diusulkan untuk mendeteksi pemalsuan tersebut; namun demikian, baik peneliti maupun otoritas regulasi masih mencari prosedur yang lebih baru, lebih sederhana, lebih sensitif, dan lebih ekonomis.

Penambahan CS dan HFCS ke dalam madu dapat dengan mudah dideteksi melalui kromatografi pertukaran anion kinerja tinggi (HPAEC) pada bahan yang diolah dengan arang aktif untuk menghilangkan mono- dan disakarida (Morales et al., 2008). Metode lain juga telah diusulkan untuk mendeteksi pemalsuan madu dengan IS dan HFCS menggunakan teknik spektroskopi, seperti spektroskopi inframerah (Sivakesava & Irudayaraj, 2001; 2002) atau spektroskopi Raman (Paradkar & Irudayaraj, 2002). Analisis rasio isotop karbon stabil (SCIRA) telah digunakan untuk mengendalikan pemalsuan madu dengan HFCS. Namun, teknik ini terbatas pada pendeteksian sirup yang berasal dari tanaman C4 (jagung, tebu, dan lain-lain) karena sirup dari tanaman C3 tidak dapat dideteksi akibat komposisi isotopnya yang mirip dengan madu. Selain itu, teknik ini bersifat lambat dan mahal.

Sebuah teknik lain menggunakan dianhidrida fruktosa (DFAs) sebagai penanda yang berguna untuk mendeteksi pemalsuan dengan HFCS dan IS (Ruiz-Matute et al., 2007a); senyawa ini tidak terdapat secara alami dalam madu dan dapat dengan mudah dideteksi dalam bahan yang dipalsukan menggunakan GC-MS dengan langkah pengayaan sebelumnya.

HFIS sebagian besar terdiri dari oligofruktosa, yaitu campuran oligosakarida dengan berbagai panjang rantai yang tersusun dari unit fruktosa yang dihubungkan oleh ikatan β -(2-1) dengan unit glukosa tunggal terakhir (Ronkart et al., 2007; Van Laere & Van den Ende, 2002). Sirup dengan tingkat polimerisasi yang berbeda diproduksi secara industri melalui hidrolisis enzimatis parsial inulin (Low & Hammond, 1996).

Low & Hammond (1996) dan Stöber et al. (1998) melaporkan penggunaan GC untuk mendeteksi keberadaan sirup ini dalam jus buah. Tiga puncak dengan identitas yang belum diketahui diajukan sebagai penanda pemalsuan. Namun demikian, ekstrapolasi metode sidik jari ini ke madu tidak memungkinkan karena variasi alami karbohidrat madu dan banyaknya oligosakarida yang terdapat dalam makanan tersebut. Oleh karena itu, diperlukan penanda yang tepat.

Dalam sebuah pekerjaan yang melibatkan seratus tujuh madu bunga (heather, rosemary, eucalyptus, dan jeruk) yang diperoleh dari peternak lebah dan pasar khusus, madu-madu tersebut telah dianalisis sebelumnya di laboratorium (Tabel 9.1).

Tabel 9.1. Spesifikasi Sirup Inulin Fruktosa Tinggi (HFIS) Menurut Produsen (Ruiz-Matute et al., 2010a)

Sirup	Kandungan Inulin + Oligofruktosa	Glc + Fru + Suk	DP rata- rata	Wujud Bahan
Beneo™ HSI (HFIS1)	86%	14%	< 10	Cair
Beneo™ L85 (HFIS2)	85%	15%	NP ^a	Cair
Beneo™ L60 (HFIS3)	60%	40%	NP	Cair
Beneo™ P95 (HFIS4)	95%	5%	NP	Bubuk

Keterangan: Glc: Glukosa, Fru: Fruktosa, Suk: Sukrosa.

Empat produk representatif, yaitu Beneo Waktu Standar HSI (HFIS1), Beneo Waktu Standar L85 (HFIS2), Beneo Waktu Standar L60 (HFIS3), dan Beneo Waktu Standar P95 (HFIS4), diproduksi secara industri oleh Orafiti (Tienen, Belgia) melalui hidrolisis enzimatis parsial inulin chicory. Tabel 9.1 merangkum spesifikasi komposisi yang diberikan oleh Orafiti. Karena HFIS4 disajikan dalam bentuk bubuk, 20% air Milli-Q (Milli Ro Milli Q Plus 185, Millipore,

Waters, Milford, AS) ditambahkan untuk memperoleh sirup. Sirup HFIS4 kemudian ditambahkan ke dalam madu nektar dengan proporsi berbeda (5%, 10%, dan 20% b/b) untuk mensimulasikan pemalsuan madu secara sengaja.

9.2. Derivat karbohidrat

Larutan 0,02 g/mL (80% etanol/air) disiapkan untuk madu, sirup, dan bahan yang dipalsukan. Sebanyak 1 mL dari masing-masing bahan dicampur dengan 0,5 mL larutan etanol 70% fenil- β -D-glukosa (1 mg/mL) yang digunakan sebagai standar internal. Bahan-bahan tersebut kemudian dikeringkan dalam vakum dan menjalani prosedur derivatisasi dua tahap.

Tahap pertama, oksim dibentuk dengan penambahan 0,35 mL hidroksilamin klorida dalam piridina, kemudian dipanaskan pada suhu 75 °C selama 30 menit. Tahap berikutnya adalah sililasi dengan menambahkan 0,35 mL heksametildisilazana dan 0,035 mL asam trifluoroasetat, kemudian dipanaskan pada suhu 45 °C selama 30 menit (Brobst & Lott, 1966). Setelah reaksi selesai, lalu disentrifugasi (Li & Schumann, 1981), dan 1 mL supernatan diambil untuk injeksi.

Bahan disiapkan dalam rangkap dua. Prosedur derivatisasi yang digunakan menghasilkan satu puncak kromatografi untuk gula non-pereduksi, yang sesuai dengan eter trimetilsililnya, sedangkan dua puncak terdeteksi untuk gula pereduksi, yang sesuai dengan isomer sin-(E) dan anti-oksिम.

9.3. Analisis hasil deteksi GC-MS

Analisis GC-MS digunakan untuk keperluan kualitatif. Sistem kromatografi gas *Hewlett-Packard* 6890 yang dikombinasikan dengan detektor massa *quadrupole* 5973 (keduanya dari Agilent, Palo Alto, CA, AS) dimanfaatkan dalam pekerjaan ini. Helium dengan kecepatan linier rata-rata 20 cm/s dipilih sebagai gas pembawa. Kolom silika lebur berukuran 25 m $\times$ 0,25 mm id dengan ketebalan lapisan film 0,25 μ m yang dilapisi dengan SPB-1 (metil silikon ikatan silang) dari Supelco (Bellefonte, PA, AS) digunakan sebagai media pemisah.

Suhu oven diprogram sebagai berikut: suhu dipertahankan pada 200 °C selama 20 menit, kemudian dinaikkan menjadi 270 °C dengan laju pemanasan 15 °C/menit; selanjutnya dinaikkan menjadi

290 °C dengan laju 18 °C/menit, dan akhirnya hingga 300 °C dengan laju 15 °C/menit, kemudian dipertahankan selama 40 menit. Suhu injektor dijaga pada 300 °C, dan injeksi dilakukan dengan mode split dengan rasio split 1:40. Spektrometer massa dioperasikan dalam mode dampak elektron (EI) pada energi 70 eV. Suhu antarmuka dan sumber adalah masing-masing 280 °C dan 230 °C. Akuisisi data dilakukan menggunakan perangkat lunak HPChem Station (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, AS).

Oksim TMS dari karbohidrat dalam bahan diidentifikasi dengan dua cara, yaitu (i) membandingkan waktu retensinya dengan senyawa standar, dan (ii) menggunakan data spektrum massa untuk mengonfirmasi penetapan puncak serta mengidentifikasi puncak yang tidak tersedia sebagai standar komersial. Meskipun GC-MS tidak dapat memberikan massa molekul untuk oligosakarida berukuran tinggi, studi terhadap fragmen m/z yang berbeda yang dihasilkan oleh ionisasi dampak elektron (EI) dalam analisis MS memberikan informasi penting mengenai struktur kimianya. Hal ini tetap dapat dilakukan bahkan menggunakan spektrometer massa meja, karena teknik ini menghasilkan pola fragmentasi karakteristik yang dapat dimanfaatkan untuk tujuan identifikasi (Fuzfai et al., 2008; Brokl et al., 2009).

9.4. Analisis hasil deteksi GC

Kuantifikasi karbohidrat dilakukan dengan menganalisis bahan yang telah diderivatisasi menjadi oksim TMS menggunakan kromatografi gas (GC) dengan detektor FID (HP 5890, Palo Alto, CA, AS). Kondisi eksperimen, kecuali gas pembawa (nitrogen dengan kecepatan linier rata-rata 12 cm/s) dan suhu detektor (300 °C), mengikuti prosedur yang telah dijelaskan sebelumnya untuk analisis GC-MS. Puncak kromatografi diukur menggunakan sistem akuisisi Chrom-Card 1.20 (CE Instruments, Milan, Italia). Larutan standar karbohidrat disiapkan dalam rentang konsentrasi yang diharapkan terdapat dalam madu dan sirup untuk menghitung faktor respons (RF) relatif terhadap fenil- β -D-glukosa sebagai standar internal. Karena keterbatasan standar, konsentrasi difruktosa anhidrida (DFA) diperkirakan dengan asumsi bahwa faktor responsnya sama dengan 1. Simpangan baku dihitung sebagai ukuran penyebaran data.

9.5. Interpretasi Data Analisis

Tabel 9.2 menunjukkan komposisi karbohidrat berat molekul rendah dari sirup yang dianalisis. Fruktosa, sukrosa, kestosa, inulobiosa, dan inulotriosa terdeteksi dalam semua bahan uji. Selain itu, senyawa lain yang keluar antara standar internal dan disakarida juga ditemukan dalam semua bahan uji, diidentifikasi sebagai DFA dan diberi nomor sesuai dengan Ratsimba et al. (1999). DFA10 dielusi bersama sukrosa dalam kondisi kromatografi ini, sehingga keduanya dikuantifikasi secara bersama-sama.

Tabel 9.2. Komposisi Karbohidrat Berat Molekul Rendah (mg g^{-1}) pada Sirup Inulin Fruktosa Tinggi (HFIS) (Ruiz-Matute et al., 2010a)

Sirup	Fruktosa	Glukosa	Myo-inositol	DFA ^a	Sukrosa	Inulobiosa	Kestosa	Inulotriosa	Total karbohidrat terkuantifikasi
HFIS 1	25,7 (2,3) ^b	3,4 (0,5)	1,7 (0,4)	1,9 (0,4)	80,9 ^c (7,1)	14,9 (1,2)	70,4 (6,2)	107,5 (9,0)	306,4 (27,2)
HFIS 2	45,9 (3,0)	9,3 (0,6)	2,2 (0,1)	2,5 (0,2)	47,2 ^c (1,6)	33,8 (0,9)	53,9 (1,7)	289,7 (10,5)	484,5 (15,1)
HFIS 3	26,5 (1,1)	11,1 (0,4)	1,7 (0,2)	2,4 (0,5)	223,8 ^c (4,0)	27,2 (0,8)	35,8 (3,1)	180,7 (14,0)	509,1 (20,1)
HFIS 4	32,6 (4,9)	tr ^d	0,0	5,5 (0,1)	1,5 (0,0)	24,1 (2,6)	4,0 (0,1)	155,8 (11,4)	223,5 (19,1)

Keterangan:

^A Difruktosa anhidrida (DFA).

^B Simpangan baku dalam tanda kurung (n=2)

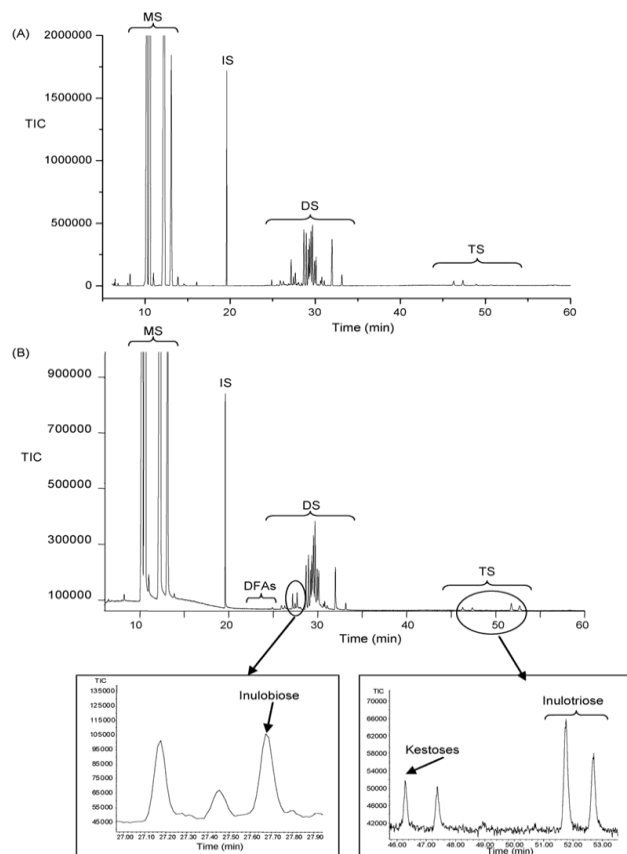
^C Dalam kasus ini, sukrosa dan DFA10 tidak terpecahkan dan tidak dapat diukur secara individual. tr: jejak

^D (nilai >LOD (0,03 mg g⁻¹madu) dan <LOQ (0,1 mg g⁻¹dari madu).

Puncak kromatografi dapat terpecahkan dengan baik dan diukur secara terpisah hanya pada bahan dengan kandungan sukrosa rendah, yaitu HFSI4. Sirup HFIS2 mengandung fruktosa, inulobiosa, dan inulotriosa dalam kadar tertinggi, sedangkan sirup HFIS3 mengandung sukrosa dan DFA10 dalam kadar tertinggi. Nilai kestosa tertinggi ditemukan pada sirup HFIS1, yang juga memiliki nilai inulobiosa dan inulotriosa terendah. Sirup HFIS4 menunjukkan nilai terendah dari total karbohidrat yang dikuantifikasi, yang menegaskan rendahnya tingkat hidrolisis pada Sirup HFIS4, sebagaimana dijelaskan oleh produsen (Tabel 9.2). Glukosa dan myo-inositol juga terukur pada sirup HFIS1, HFIS2, dan HFIS3.

Diketahui bahwa karbohidrat pada madu sebagian besar terdiri dari glukosa dan fruktosa, meskipun disakarida dan trisakarida juga terdapat dalam jumlah yang bervariasi. Dari disakarida, perlu

diperhatikan variabilitas konsentrasi sukrosa yang tinggi di semua madu (bervariasi antara 4,9 hingga 57,6 mg g⁻¹), sedangkan inulobiosa, yang baru-baru ini dilaporkan terdapat dalam madu (Ruiz-Matute et al., 2007b), menunjukkan konsentrasi relatif rendah di semua bahan (antara 0,4 hingga 6,0 mg g⁻¹). Baik DFA maupun inulotriosa tidak terdeteksi dalam bahan uji manapun. Berbeda dengan kestosa, yang telah dilaporkan keberadaannya dalam madu oleh berbagai penulis (Siddiqui, 1970; Swallow & Low, 1990; Sanz et al., 2004), tidak ditemukan referensi mengenai keberadaan inulotriosa dalam madu.



Gambar 9.1. Profil karbohidrat dari: (A) madu (H1) dan (B) madu (H1) yang dipalsukan dengan 5% HFIS4. MS: monosakarida; IS: standar internal, DS: disakarida dan TS: trisakarida (Ruiz-Matute et al., 2010a)

Gambar 9.1B menunjukkan profil kromatografi madu H1 yang dipalsukan dengan 5% HFIS4. Seperti terlihat pada gambar, perubahan utama dalam profil kromatografi madu yang dipalsukan terjadi pada zona trisakarida.

Tabel 9.3 memperlihatkan konsentrasi DFA, inulobiosa, kestosa, dan inulotriosa dalam madu H1, HFIS4, serta pemalsuan dengan kadar 5%, 10%, dan 20% HFIS4. Seperti yang ditunjukkan pada tabel, kestosa yang hadir dalam jumlah rendah pada sirup praktis tidak menunjukkan perbedaan antara madu H1 dan madu yang dipalsukan. Perubahan yang lebih jelas terlihat pada peningkatan kadar inulobiosa, yang bervariasi dari 3,7 mg/g pada madu asli hingga 9,2 mg/g pada madu yang dipalsukan dengan 20% HFIS4. Namun, karena kestosa dan inulobiosa merupakan komponen alami madu (dengan rentang konsentrasi masing-masing 0,2 hingga 8,1 mg/g madu dan 0,4 hingga 6,0 mg/g madu pada 107 bahan yang dianalisis di laboratorium), keduanya tidak dianggap sebagai indikator yang baik untuk mendeteksi pemalsuan HFIS.

Di sisi lain, DFA yang tidak terdeteksi dalam madu yang dianalisis dipilih sebagai penanda pemalsuan. Namun, karena HFIS mengandung konsentrasi DFA yang rendah, senyawa ini tidak dapat diukur pada persentase pemalsuan yang rendah, dan jejaknya hanya terdeteksi pada madu dengan pemalsuan 5% (Tabel 9.3). Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, perlakuan ragi diperlukan untuk mengkonsentrasikan DFA sehingga dapat digunakan sebagai penanda (Ruiz-Matute et al., 2007a).

Inulotriosa, yang tidak terdeteksi dalam madu yang dianalisis dan memiliki konsentrasi tinggi di semua HFIS, tampaknya menjadi penanda terbaik untuk mendeteksi pemalsuan. Seperti terlihat pada Gambar 9.1, inulotriosa dielusi di daerah “bersih” kromatogram sehingga mudah dideteksi. Batas deteksi (LOD) sebesar 0,03 mg/g madu menunjukkan bahwa penambahan sirup kurang dari 1% dapat terdeteksi. Inulotriosa memenuhi syarat sebagai penanda pemalsuan yang baik karena tidak terdapat dalam madu, mudah dideteksi dengan GC, dan spesifik terhadap HFIS. Keberadaan senyawa ini dalam madu merupakan indikasi jelas adanya penambahan HFIS.

Tabel 9.3. Konsentrasi DFA, Inulobiosa, Kestosa, dan Inulotriosa (mg g^{-1}) pada Madu H1, HFIS4, dan Madu H1 yang Dipalsukan dengan HFIS4 (5%, 10%, 20%) (Ruiz-Matute et al., 2010a)

Kode Madu	DFA ^a	Inulobiosa	Kestosa	Inulotriosa
HFIS4	5,5 (1,2) ^b	24,1 (0,9)	4,0 (0,2)	155,8 (10,3)
H1	0,0	3,7 (0,3)	2,1 (0,1)	0,0
H1 + 5%HFIS4	tr	5,2 (0,3)	2,3 (0,0)	9,7 (0,7)
H1 + 10%HFIS4	0,9 (0,0)	6,5 (0,1)	2,3 (0,1)	19,3 (1,5)
H1 + 20%HFIS4	1,4 (0,0)	9,2 (0,2)	2,3 (0,0)	37,4 (2,1)

Keterangan:

^A Difruktosa anhidrida (DFA).

^B Simpangan baku dalam tanda kurung (n=2)

BAB X

DETEKSI ZAT KONTAMINAN DALAM MADU: INOVASI, TANTANGAN, DAN ARAH MASA DEPAN

10.1. Pengantar

Madu merupakan zat yang populer, manis, dan sangat bergizi, yang dihasilkan dari aktivitas lebah madu yang secara aktif mengumpulkan nektar dari berbagai tanaman berbunga. Lebah mengeluarkan zat tertentu yang mengubah nektar menjadi madu sebelum disimpan di sarang hingga matang (*Codex standar*, 1981). Komposisi madu ditentukan oleh jenis tanaman tempat lebah mengumpulkan nektarnya, kondisi iklim, faktor lingkungan, serta praktik budidaya lebah (Meo et al., 2017; Anklam, 1998).

Secara umum, madu dibedakan menjadi dua jenis, yaitu madu bunga dan madu embun (Pita-Calvo & Vázquez, 2017). Madu bunga berasal dari nektar bunga, sedangkan madu embun berasal dari sekresi bagian tanaman hidup yang tertinggal akibat aktivitas serangga penghisap tanaman (*Codex standar*, 1981; *Official Journal of the European Communities*, 2001). Madu unifloral merupakan jenis madu yang dihasilkan dari sumber botani tertentu dan memiliki sifat organoleptik yang khas, sehingga lebih bernilai dibandingkan madu multifloral (Kasprzyk et al., 2018; Bianchi et al., 2005).

Warna yang lebih gelap pada sebagian besar madu menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat (Sipahi et al., 2017; Beretta et al., 2005), yang disebabkan oleh kandungan senyawa fenolik dalam jumlah lebih banyak (Nayik et al., 2018; Aljadi & Kamaruddin, 2004)

Komponen utama madu adalah karbohidrat (gula), yang menyumbang hampir 95% (b/b) dari berat keringnya (Pita-Calvo et al., 2017b). Karbohidrat ini terdiri atas 75% (b/b) monosakarida (fruktosa dan glukosa), sejumlah kecil disakarida (sukrosa), serta 10–15% (b/b) jenis gula lainnya (oligosakarida dan tetrasakarida). Gula dalam madu berfungsi sebagai penyedia energi dan berkontribusi terhadap karakteristik fisik madu, seperti viskositas, higroskopisitas, dan granulasi (Kamal & Klein, 2011).

Identifikasi kualitatif kandungan gula dalam madu umumnya dilakukan melalui kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS). Teknik ini dilaporkan sebagai salah satu metode paling efektif untuk mengidentifikasi konsentrasi rendah tri- dan tetrasakarida dalam madu Spanyol (Ruiz-Matute et al., 2010a). Hingga saat ini, sebanyak 16 jenis oligosakarida yang berbeda telah ditemukan dalam madu menggunakan teknik GC-MS, meliputi 11 disakarida (turanosa, sukrosa, maltosa, isomaltosa, kojibiosa, selobiosa, palatinosa, gentiobiosa, laminaribiosa, neotrehalosa, dan nigerosa) serta lima trisakarida (erlose, panosa, isopanosa, maltotriosa, dan theanderosa). Tetrasakarida yang teridentifikasi antara lain isomaltotetraosa, maltotetraosa, stakiosa, nistosa, difruktosil-isomelezitosa, α -4'-glukosil-erlose, dan α -6'-glukosil-erlose (Ruiz-Matute et al., 2010a).

Selain gula, madu juga mengandung sejumlah kecil asam organik, protein, dan komponen mineral. Karena kandungan asam organik (0,57%) dan asam amino bebas (0,05–0,1%) yang cukup banyak, madu cenderung memiliki sifat sedikit asam dengan total keasaman antara 8,68–59,49 meq/kg (Karabagias et al., 2014). Meskipun asam-asam tersebut hanya merupakan bagian kecil dari komponen madu, mereka memberikan kontribusi besar terhadap sifat organoleptik, kimia, dan fisik madu (Mato et al., 2003).

Asam organik yang umum ditemukan dalam madu meliputi asam asetat, butirat, format, sitrat, malat, piroglutamat, dan suksinat, dengan asam glukonat sebagai komponen utama (Alvarez-Suarez et al., 2018; da Silva et al., 2016; Mato et al., 2003). Meskipun asal-usul asam organik dalam madu belum sepenuhnya jelas, diduga bahwa asam tersebut merupakan zat antara dalam siklus Krebs atau jalur enzimatik tertentu dari flora mikroba dalam madu. Selain itu, asam organik juga dapat berasal langsung dari nektar atau embun madu, maupun disintesis secara alami dari gula nektar seperti fruktosa, glukosa, dan sukrosa melalui kerja enzim lebah pekerja (Yaacob et al., 2018; Mato et al., 2003).

Kehadiran asam glukonat yang signifikan dalam madu disebabkan oleh glukosa oksidase yang disekresikan oleh lebah madu saat memetabolisme glukosa dalam nektar (Mato et al., 2003; White et al., 1962; Stinson et al., 1960). Konsentrasi asam glukonat meningkat ketika flora bakteri dominan, *Glucanobacter* spp., secara aktif memetabolisme glukosa dalam kondisi aerobik dan glukosa tinggi,

terutama selama proses pematangan madu (Siddiqui et al., 2017; Stinson et al., 1960). Selain itu, komponen lain seperti protein dan asam amino berasal dari serbuk sari dan kelenjar ludah lebah (Escuredo et al., 2013; da Silva et al., 2016)

Tabel 10.1. Standar komposisi madu (Aturan UE 110/2001) (Se et al., 2019)

Parameter Komposisi	Konsentrasi
Kandungan fruktosa dan glukosa (jumlah keduanya)	—
Madu bunga	$\geq 60\%$ (b/b)
Madu madu	$\geq 45\%$ (b/b)
Campuran madu dan madu bunga	—
Sukrosa (secara umum tetapi dengan pengecualian)	$\leq 5\%$ (b/b)
Kelembaban (secara umum tetapi dengan pengecualian)	$\leq 20\%$ (b/b)
Konduktivitas listrik	—
Madu bunga (dengan pengecualian)	≤ 0.8 mS/cm
Madu dan madu kastanye	≥ 0.8 mS/cm
Asam bebas (secara umum)	≤ 50 mekuiv/kg
Aktivitas diastase	—
Secara umum	≥ 8 (unit Schale)
Madu dengan kandungan enzim rendah (mis. madu jeruk) dan kandungan HMF ≤ 15 mg/kg	≥ 3 (unit Schale)
Hidroksimetilfurfural (HMF)	—
Secara umum (kecuali madu tukang roti)	≤ 40 mg/kg
Madu yang dinyatakan berasal dari daerah dengan iklim tropis dan campuran madu ini	≤ 80 mg/kg
Madu dengan tingkat enzimatik rendah (mis. madu jeruk)	≤ 15 mg/kg

Menurut data White et al. (1962), terdapat 18 jenis asam amino bebas yang berbeda dalam madu, dengan jumlah yang sedikit dan tanpa signifikansi nutrisi. Fenilalanin dan prolin ditemukan dalam jumlah yang cukup, masing-masing berkisar antara 12,1–762 mg/kg (Afrin et al., 2017; Meda et al., 2005) dan 5,20–1231 mg/kg (Biluca et al., 2019). Sementara itu, asam amino bebas seperti asam aspartat, glutamat, asparagin, glutamin, serin, arginin, treonin, alanin, tirosin, valin, leusin, isoleusin, fenilalanin, dan triptofan terdeteksi dalam konsentrasi antara 8–233 mg/kg (Biluca et al., 2019). Faktanya, kandungan prolin yang lebih rendah dari biasanya merupakan

penanda utama untuk mendeteksi madu yang dipalsukan (Can et al., 2015). Undang-undang Eropa menetapkan bahwa madu harus mengandung kandungan prolin minimal lebih dari 180 mg/kg (Bogdanov et al., 1999), dan penyimpangan dari standar ini disebabkan oleh ketidakmatangan atau pemalsuan madu.

Tabel 10.1 menyediakan standar komposisi madu berdasarkan rekomendasi dari *Official Journal of the European Communities* (2001). Beberapa parameter digunakan untuk memantau pemalsuan madu, termasuk kandungan sukrosa, profil fruktosa-glukosa-sukrosa, prolin, dan hidroksimetilfurfural (Pita-Calvo et al., 2017). Kandungan hidroksimetilfurfural (HMF) merupakan indikator yang baik untuk madu yang dipalsukan karena dapat menunjukkan adanya penambahan gula inversi (ISS) (Pasias et al., 2017; Paradkar & Irudayaraj, 2002). Pendekatan ini memberikan hasil yang baik, namun terdapat masalah yang dapat secara signifikan mengurangi cakupan efektivitas dan keandalan analisis HMF, yaitu pemanasan dan penyimpanan yang lama dapat meningkatkan kandungan HMF dalam madu sehingga menyebabkan hasil positif palsu saat uji otentikasi (Blidi et al., 2017). Oleh karena itu, validitas HMF sebagai indikator madu yang dipalsukan masih dipertanyakan.

Hal ini membawa pada tujuan utama penjelasan ini, yaitu memberikan tinjauan menyeluruh tentang tren terkini dan tantangan berbagai metode yang sebelumnya digunakan untuk mendeteksi zat pengotor gula dalam madu. Wu et al. (2017a) baru-baru ini meninjau beberapa metode analisis tradisional untuk mendeteksi madu yang dipalsukan, termasuk teknik kromatografi dan spektroskopi, tetapi tidak membahas teknik baru seperti biosensor (e-nose dan e-tongue), serta sensor serat. Tulisan ini mencakup perkembangan terbaru dari teknik-teknik yang belum dibahas oleh Wu et al. (2017a). Dibandingkan dengan artikel ulasan sebelumnya oleh Pita-Calvo et al. (2017), bab ini juga merangkum secara komprehensif semua bahan pengotor tradisional dan baru yang ditemukan dan digunakan dalam madu dari berbagai negara di seluruh dunia.

10.2. Jenis-Jenis Kontaminan yang Sering Ditemukan pada Madu

Penting untuk ditekankan bahwa madu merupakan satu-satunya pemanis organik yang diproduksi secara alami dan dapat

dikonsumsi langsung tanpa melalui pemrosesan yang ekstensif (Iglesias et al., 2004). Akibatnya, komoditas pangan yang bernilai tinggi ini menjadi incaran orang-orang dan produsen tidak jujur yang memanfaatkan bisnis menguntungkan ini dengan mencampurkan pemanis yang lebih murah ke dalam madu alami (Soares et al., 2017b; Gallardo-Velazquez et al., 2009). Gambar 10.1 memperlihatkan tiga metode pemalsuan madu beserta bahan pemalsuan yang biasanya ditemukan dalam madu. Sumber bahan pemalsuan dalam madu dapat berbeda-beda antar daerah, tergantung pada harga dan ketersediaan berbagai jenis gula atau pemanis.

Tabel 10.2 merangkum secara komprehensif zat pengotor yang dilaporkan dalam madu, yang disusun berdasarkan asal geografisnya. Terlihat jelas bahwa zat pengotor yang paling umum ditemukan dalam madu adalah gula dari sirup jagung fruktosa tinggi (HFCS), sirup gula jagung (COSS), sirup gula terbalik (ISS), dan sirup gula tebu (CASS).

Tabel 10.2. Jenis-Jenis Bahan Pengotor yang Ditemukan dalam Produk Madu (Se et al., 2019)

Bahan Pemalsu	Asal Regional	Referensi
Sirup jagung fruktosa tinggi	Spanyol	Morales et al. 2008
—	Turki	Cabanero et al., 2006
—	Turki (pemberian makan lebah)	Ruiz-Mature et al. 2007b
—	Brazil	Kelly et al. 2006
—	Cina	Tosun, 2013
—	Prancis	Guler et al. 2014
—	Meksiko	Padovan et al. 2003
—	—	Li et al. 2012
—	—	Li et al. 2017
—	—	Spiteri et al. 2015
—	—	Gallardo-Velazquez et al. 2009
Sirup jagung	Prancis	Megherbi et al. 2009
—	Spanyol	Morales et al. 2008
—	Meksiko	Gallardo-Velazquez et al. 2009

—	Cina	Rios-Corripio et al. 2012
—	—	Gan et al. 2016
Sirup gula tebu	Malaysia	Zakaria et al. 2011
—	Brazil	Padovan et al. 2003
—	Spanyol	Cabanero et al. 2006
—	Meksiko	Rios-Corripio et al. 2012
Sirup gula tebu invert	Amerika Serikat	Paradkar & Irudayaraj, 2002
—	Spanyol	Ruiz-Matute et al. 2007a
—	Meksiko	Kelly et al. 2006;
—	—	Gallardo-Velazquez et al. 2009
Sirup bit invert	Amerika Serikat	Paradkar & Irudayaraj, 2002
—	Spanyol	Kelly et al. 2006
Sirup gula invert	Iran	Amiry et al. 2017
—	Meksiko	Rios-Corripio et al. 2012
—	Turki	Tosun, 2013
Sirup glukosa	Turki	Guler et al. 2014
Gula glukosa monohidrat	Prancis	Spiteri et al. 2015
Sirup glukosa dari gandum dan beras	—	—
Sirup sakarosa (dari bit gula)	Turki	Tosun, 2013
Gula bit	Spanyol	Cabanero et al. 2006; Kelly et al. 2006
Sirup inulin fruktosa tinggi	Spanyol, Prancis	Ruiz-Matute et al., 2010b; Spiteri et al. 2015
Sirup beras	Cina	Xue et al. 2013; Gan et al. 2016
Sirup pakan lebah (sirup GFM)	Prancis	Cordella et al. 2005;
Sirup pakan lebah	Turki (pakan lebah)	Guler et al. 2014
Sirup sukrosa	Turki (pakan lebah)	Guler et al. 2014
Sirup maltosa	Cina	Li et al. 2012; Li et al. 2017
Gula cair Erstein (sirup gula C3)	Prancis	Cotte et al. 2003
Erstein siroline (campuran sirup gula	Prancis	Cotte et al. 2003

invert dan sirup glukosa)		
Cerestar FT 1702 (sirup gula C3)	Prancis	Cotte et al. 2003
HFS dari pati jagung, pati beras, dan pati singkong	Cina	Wang et al., 2015
Sirup kurma	Iran	Amiry et al. 2017
Sirup jaggery	India	Mishra et al., 2010
Pemalsuan tidak langsung	Prancis, Turki	Cordella et al. 2005; Guler et al. 2014
Pencampuran madu	Cina	Wang et al. 2014

*Sirup GFM: sirup glukosa-fruktosa-maltosa.

Sirup jagung fruktosa tinggi (dalam bahasa Inggris: *High Fructose Corn Syrup* atau disingkat HFCS) adalah pemanis buatan yang dibuat dari tepung jagung dan mengandung fruktosa (gula buah) dalam kadar yang tinggi. HFCS dibuat dengan mengubah sebagian glukosa dari sirup jagung menjadi fruktosa melalui proses enzimatik. Terdapat beberapa jenis HFCS berdasarkan kadar fruktosanya, misalnya: HFCS-42: Mengandung sekitar 42% fruktosa, sisanya glukosa, HFCS-55: Mengandung sekitar 55% fruktosa, umumnya digunakan dalam minuman ringan (*soft drink*) dan HFCS-90: Mengandung sekitar 90% fruktosa, digunakan dalam jumlah kecil sebagai campuran untuk membuat varian HFCS lain.

Sirup Gula Jagung (COSS - *Corn Syrup Solids*), Asal: Dibuat dari pati jagung melalui proses hidrolisis. Komposisi: Mengandung glukosa dalam bentuk utama, serta maltosa dan oligosakarida, Karakteristik: Berbentuk padatan kering (*solids*), tidak terlalu manis, dan memiliki kemampuan mempertahankan kelembaban serta mencegah kristalisasi gula. Penggunaan: Banyak digunakan dalam industri makanan, seperti permen, es krim, dan produk roti.

Sirup Gula **Invert** (ISS - *Inverted Sugar Syrup*), Asal: Diperoleh dengan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, biasanya menggunakan asam atau enzim invertase. Komposisi: Campuran glukosa dan fruktosa dalam jumlah hampir seimbang. Karakteristik: Lebih manis dari sukrosa biasa, higroskopis (menyerap air), dan tidak mudah mengkristal. Penggunaan: Umum dalam industri

minuman, kue, dan permen untuk memberikan rasa manis yang kuat dan menjaga kelembaban.

Sirup Gula Tebu (CASS - *Cane Sugar Syrup*), Asal: Dibuat dari sari tebu yang dimurnikan dan dipekatkan. Komposisi: Mayoritas terdiri dari sukrosa, dengan sedikit glukosa dan fruktosa. Karakteristik: Rasa manis alami khas tebu, viskositas tinggi, dan warna agak kecoklatan tergantung pada tingkat pemurnian. Penggunaan: Digunakan dalam minuman, produk olahan makanan, dan pemanis alami.



Gambar 10.1. Klasifikasi Pemalsuan Madu dan Bahan Tambahan yang Terdeteksi (Se et al., 2019)

Preferensi tinggi terhadap HFCS disebabkan karena HFCS merupakan produk isomerisasi sederhana dari COSS (Ruiz-Matute et al., 2007b), di mana tingkat isomerisasi HFCS yang dikomersialkan bervariasi, misalnya 20% (20HFCS), 40% (40HFCS), dan 80% (80HFCS) (Morales et al., 2008). Varietas HFCS lainnya, yaitu HFCS42, HFCS55, HFCS85, dan HFCS90, diproduksi secara industri dengan mengubah persentase fruktosa secara sederhana (Guler et al., 2014). Sebaliknya, COSS merupakan campuran kompleks dari berbagai gula, seperti glukosa (45%), maltosa (30%), maltotriosa (13%), fruktosa (10%), dan 2% oligosakarida yang lebih tinggi (Megherbi et al., 2009).

ISS berasal dari hidrolisis asam terutama disakarida (Amiry et al., 2017) untuk menghasilkan monosakarida seperti fruktosa dan glukosa, yang merupakan komponen utama gula alami dalam berbagai jenis madu di seluruh dunia. ISS yang bersumber dari tanaman bit dan tebu banyak digunakan sebagai bahan pengotor dalam madu (Tabel 10.2) karena kandungan gulanya menyerupai profil gula alami madu, sehingga membuat deteksinya menjadi sangat sulit (Paradkar & Irudayaraj, 2002). Tebu merupakan salah satu jenis rumput abadi dan menjadi bahan pengotor madu yang ideal karena kandungan sukrosanya yang tinggi (Kim & Day, 2011).

Gula jagung dan gula tebu berasal dari tanaman tipe C4 (tanaman dengan siklus fotosintesis Hatch-Slack), sedangkan gula bit merupakan bahan pengotor yang lebih baik karena berasal dari tanaman C3 (tanaman dengan siklus fotosintesis Calvin-Benson) yang nektarnya lebih disukai oleh lebah madu dibandingkan nektar dari tanaman C4 (Cabanero et al., 2006). Namun, pengotor gula dari tanaman C4 lebih mudah dideteksi karena rasio isotop karbon positif yang lebih kuat ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) dibandingkan gula alami yang terdapat dalam madu murni. Sebaliknya, deteksi zat pengotor gula dari tanaman C3 lebih menantang karena profil $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -nya cukup mirip dengan gula dalam madu alami (Kropf et al., 2010).

Dalam beberapa wilayah geografis tertentu, efektivitas biaya dan ketersediaan gula atau pemanis menjadi faktor penentu pemilihan bahan pengotor dalam madu. Misalnya, sirup yang diekstrak dari gandum dan beras banyak digunakan sebagai bahan pengotor madu yang diproduksi di Turki dan Prancis (Tosun, 2013; Guler et al., 2014; Spiteri et al., 2015). Sirup tanaman yang dibuat dari sari sayuran atau getah tanaman yang dipanaskan juga menjadi kandidat baik untuk bahan pemalsuan madu.

Inulin, yang diekstrak dari akar sawi putih, mengandung rantai fruktosa dengan derajat polimerisasi (DP) yang bervariasi, biasanya antara 3 hingga 80 (Corradini et al., 2012), sedangkan fruktosa yang diproduksi secara industri dari sirup inulin (HFIS) berasal dari hidrolisis enzimatis parsial inulin (Low & Hammond, 1996). Madu dari negara-negara Eropa biasanya dicampur dengan HFIS (Ruiz-Matute et al., 2010b; Spiteri et al., 2015), yang merupakan komponen gula utama, yaitu fruktosa dengan rantai monomer yang dihubungkan

oleh ikatan β -(2→1) dan unit glukosa tunggal penutup, yang juga ditemukan dalam madu asli (Ronkart et al., 2007).

Sirup beras (RS), yang berasal dari tanaman C3, merupakan zat pengotor yang muncul dari hidrolisis oligosakarida dan polisakarida dalam beras (Xue et al., 2013). Sirup maltosa (MSS) juga merupakan bahan pengotor yang sangat populer dalam madu dari Tiongkok karena lebih sulit dideteksi dengan metode analisis umum (Li et al., 2017). Menariknya, bahan pengotor madu di Iran sebagian besar terdiri dari gula yang diekstrak dari kurma, karena wilayah tersebut memiliki perkebunan kurma yang luas (Amiry et al., 2017). Profil sirup kurma yang kaya fruktosa dan glukosa (Al-Eid, 2006) mirip dengan madu alami yang diproduksi di wilayah ini.

Di sisi lain, sirup gula aren yang murah (gula merah tua kasar yang dibuat dari penguapan nira pohon palem) menjadi bahan pengotor madu yang populer di India (Mishra et al., 2010). Penampakan sirup gula aren yang berwarna coklat tua menjadi ciri khasnya dan membuatnya sangat sulit dibedakan dari madu alami, terutama jika dibandingkan dengan madu multiflora (Mishra et al., 2010).

Perlu disebutkan bahwa pendeteksian madu palsu tidak hanya terbatas pada penambahan gula secara langsung ke dalam madu alami, tetapi juga mencakup pemberian pakan tidak langsung ke koloni lebah madu dengan larutan gula pekat selama musim aliran nektar utama (Guler et al., 2014). Tindakan tidak bertanggung jawab yang meluas ini tidak hanya membahayakan kesejahteraan konsumen (Bogdanov et al., 1999; Oddo et al., 2004; Guler et al., 2007), tetapi juga berpotensi menimbulkan masalah kesehatan, terutama pada anak-anak dan orang tua. Hal ini disebabkan oleh ambiguitas proses yang terjadi setelah lebah madu mengonsumsi sirup gula serta sifat produk yang dihasilkan setelah konversi gula (Bansal et al., 2017).

Lebah madu dilaporkan diberi makan gula seperti HFCS, sirup sukrosa, dan sirup pakan lebah dengan komposisi yang tidak diketahui (Cordella et al., 2005; Guler et al., 2014). Yang mengejutkan, tingkat kematian lebah madu yang diberi makan HFCS sangat tinggi, kemungkinan karena tingginya kadar hidroksimetilfurfural dalam HFCS (LeBlanc et al., 2009), yang bersifat racun bagi lebah.

Perpaduan madu mahal (murni dan langka) dengan madu yang lebih murah (murni dan berlimpah) merupakan bentuk lain dari

pemalsuan madu. Penipuan semacam ini telah dilaporkan terjadi pada madu akasia yang harganya lebih mahal, sering dicampur dengan madu lobak yang lebih murah untuk mendapatkan keuntungan lebih besar (Wang et al., 2014). Madu akasia memiliki rasa lembut, berwarna kuning muda, dan tidak mengkristal (Kenjeric et al., 2007), sedangkan madu lobak manis berwarna kuning muda dan mudah mengkristal (Wang et al., 2014). Warna kuning muda madu lobak yang sangat mirip dengan madu akasia menjadikannya lebih disukai sebagai campuran madu yang dipasarkan di Venezuela. Di wilayah ini, madu alami yang lebih mahal diproduksi oleh *Melipona favosa*, kemudian dicampur dengan madu yang lebih murah dari *Apis mellifera* (Vit, 2013).

10.3. Metode Analisis untuk Identifikasi Kontaminan pada Madu

10.3.1. Kromatografi lapisan tipis

Kromatografi lapis tipis (TLC) merupakan teknik sederhana untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa kimia yang tidak diketahui dalam madu alami. Secara resmi, TLC dikembangkan pada akhir tahun 1970-an untuk mendeteksi madu yang dipalsukan dengan HFCS (Kushnir, 1979). Komposisi monosakarida dalam HFCS yang lebih murah hampir sama dengan madu alami, kecuali bahwa TLC madu murni menunjukkan satu atau dua bercak biru/abu-abu dengan nilai R_f lebih dari 0,35, sedangkan madu yang dipalsukan dengan HFCS menunjukkan bercak tambahan atau garis-garis biru yang terlihat (Kushnir, 1979).

Teknik yang lebih baik untuk mendeteksi zat pengotor dalam madu adalah kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (HPTLC). Teknik ini digunakan untuk memeriksa keaslian 15 madu komersial (berlabel madu jeruk nipis, madu polifloral, dan madu akasia) yang berasal dari Rumania berdasarkan rasio fruktosa terhadap glukosa (F/G) (Puscas et al., 2013). Pemisahan TLC dilakukan pada gel silika yang dilapisi pada lembaran aluminium HPTLC dengan fase gerak berupa campuran etil asetat, piridina, air, dan asam asetat dalam proporsi 6:3:1:0,5 (v/v/v/v). Hasilnya mengungkapkan bahwa sukrosa merupakan bahan pengotor umum dalam madu Rumania, baik melalui pemalsuan langsung maupun tidak langsung dengan memberikan larutan sukrosa kepada lebah madu. Hal ini disebabkan

oleh pemalsuan madu dengan memasukkan fruktosa atau glukosa yang dapat menyebabkan perubahan rasio F/G intrinsik dalam madu. Menurut standar madu murni, kadar sukrosa harus kurang dari 1% dari massa kering, sedangkan rasio F/G harus berada dalam kisaran 1 hingga 1,2 (Puscas et al., 2013). Analisis HPTLC menunjukkan bahwa dari 15 madu yang diteliti, tujuh madu (dua madu jeruk nipis, satu madu polifloral, dan empat madu akasia) tercemar fruktosa ($F/G > 1,2$), satu madu (madu polifloral) tercemar glukosa ($F/G < 1,0$), sedangkan sisanya adalah madu murni.

Meskipun TLC bersifat sederhana dan cepat dalam mendeteksi penambahan sirup gula industri yang tidak sah ke dalam madu, masih diperlukan banyak upaya lanjutan untuk menilai tingkat keandalannya. Selain itu, diperlukan sistem yang lebih canggih untuk mendeteksi madu yang dipalsukan, mengingat varietas madu baru yang beredar di pasaran sering dipalsukan dengan berbagai jenis bahan pengotor gula, seperti gula bit, gula invert, dan sirup beras (RS)

10.3.2. Analisis rasio isotop karbon stabil

Analisis rasio isotop karbon stabil (*Stable Carbon Isotope Ratio Analysis* atau SCIRA) merupakan salah satu metode standar yang diterima untuk mengotentikasi dan mendeteksi zat pengotor dalam madu (Padovan et al., 2003). Metode ini juga berguna untuk membedakan madu berdasarkan asal botani yang berbeda (Bontempo et al., 2017). Validasi madu asli menggunakan SCIRA didasarkan pada fakta bahwa kelompok tanaman monokotil (seperti tebu dan jagung) dan dikotil (tanaman berbunga yang nektarnya dikumpulkan oleh lebah) memiliki rasio isotop $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ yang berbeda. Perbedaan ini merupakan hasil dari siklus fotosintesis yang dijalani oleh tanaman. Rasio tersebut dilambangkan dengan simbol $\delta^{13}\text{C}$ dan dinyatakan dalam satuan ‰ (per mil) untuk menunjukkan penyimpangan dari standar internasional *Vienna Pee Dee Belemnite* (VPDB) (Kerkvliet & Meijer, 2000).

Tanaman C3, yang memfiksasi CO_2 menjadi senyawa karbon berjumlah tiga atom, menjalani fotosintesis melalui siklus *Calvin-Benson*, dengan nilai $\delta^{13}\text{C}$ berkisar antara -21‰ hingga -32‰. Sebaliknya, tanaman C4 mengikuti jalur fotosintesis Hatch-Slack dan memfiksasi CO_2 menjadi senyawa karbon yang mengandung empat atom, dengan nilai $\delta^{13}\text{C}$ antara -8‰ hingga -19‰ (Padovan et al.,

2003). Umumnya, tanaman C3 memiliki nilai $\delta^{13}\text{C}$ yang lebih rendah dibandingkan dengan tanaman C4 (Cinar et al., 2014). Oleh karena itu, perbedaan ini dapat digunakan sebagai metode untuk mendeteksi madu yang dipalsukan dengan penambahan sirup tebu atau jagung, yang merupakan tanaman C4.

Menurut standar yang ditetapkan dalam Metode Resmi AOAC 978.17 oleh White & Winter (1989), madu dengan nilai $\delta^{13}\text{C}$ lebih tinggi dari -23,5‰ dapat dikategorikan sebagai madu yang tercemar, mengingat lebah madu biasanya mengumpulkan nektar dari tanaman C3 (Simsek et al., 2012), meskipun kadang-kadang juga dari tanaman C4. Padovan et al. (2003) melaporkan bahwa madu yang mengandung jejak gula jagung dan tebu memiliki nilai $\delta^{13}\text{C}$ masing-masing dalam rentang -11,3‰ hingga -11,8‰ dan -9,72‰ hingga -9,78‰, yang melebihi batas nilai $\delta^{13}\text{C}$ yang direkomendasikan untuk madu asli.

SCIRA juga efektif untuk memverifikasi pemalsuan madu, namun batas deteksi terendahnya yang mencapai 20% tergolong cukup tinggi (White & Doner, 1978), sehingga diperlukan pengembangan lanjutan guna meningkatkan sensitivitas metode tersebut. Penyertaan isotop $\delta^{13}\text{C}$ dari protein madu yang diekstraksi sebagai standar internal merupakan cara yang lebih fleksibel untuk mendeteksi madu yang dicampur dengan gula komersial, karena madu asli memiliki nilai $\delta^{13}\text{C}$ yang relatif sama pada fraksi madu dan protein. Nilai $\delta^{13}\text{C}$ pada fraksi protein bersifat konstan, sementara fraksi madu dapat berubah seiring penambahan gula, sehingga meningkatkan perbedaan rasio isotop karbon antara kedua fraksi tersebut. Dengan menghitung perbedaan nilai $\delta^{13}\text{C}$ antara madu dan fraksi proteinnya, dapat diperkirakan tingkat pemalsuan madu. Hubungan ini juga dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah gula C4 yang ditambahkan ke dalam madu (Cabanero et al., 2006; Dong et al., 2016).

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \{(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}})-1\} \times 10^3 \text{ where } R = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \quad (1)$$

$$\text{C4 sugar adulteration (\%)} = \left[\frac{(\delta^{13}\text{C}_{\text{protein}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{honey}})}{(\delta^{13}\text{C}_{\text{protein}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{sugar syrup}})} \right] \times 100\% \quad (2)$$

Secara resmi, SCIRA dan evaluasi fraksi protein pada madu dilakukan secara rutin untuk mendeteksi pemalsuan yang melibatkan penambahan HFCS (White & Winters, 1989). Perbedaan nilai $\delta^{13}\text{C}$ antara fraksi madu dan fraksi protein ($\Delta\delta^{13}\text{C}$) harus kurang dari 1‰, sesuai dengan keberadaan gula C4 sebesar 7% (White & Winters, 1989). Madu yang memiliki perkiraan kandungan gula C4 di bawah 7% dianggap murni menurut Metode Resmi Asosiasi Ahli Kimia Analisis Resmi (AOAC) 998.12. Variasi nilai $\Delta\delta^{13}\text{C}$ yang dapat diterima untuk madu murni berada pada rentang +1,1‰ hingga -0,9‰ (Anklam, 1998).

Tosun (2013) menilai kemampuan SCIRA dalam mendeteksi zat pengotor jenis C3 dan C4 serta tingkat pemalsuan pada madu dengan menggunakan berbagai konsentrasi HFCS (10%, 20%, 40%, 50% b/b) yang berasal dari pati jagung (gula C4), serta glukosa (GS) dan sirup sakarosa (SS) yang berasal dari gula bit (gula C3). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa seluruh madu murni dan protein terkait memiliki nilai rata-rata $\delta^{13}\text{C}$ yang relatif serupa, masing-masing sebesar $-25,73 \pm 0,29\text{‰}$ dan $-25,52 \pm 0,27\text{‰}$. Sementara itu, nilai $\delta^{13}\text{C}$ untuk bahan pengotor SS, GS, dan HFCS masing-masing tercatat sebesar $-24,8\text{‰}$, $-11,2\text{‰}$, dan $-11,4\text{‰}$. Namun, lima madu yang dipalsukan dengan SS secara keliru diklasifikasikan sebagai madu murni karena perbedaan nilai $\delta^{13}\text{C}$ antara fraksi madu dan protein sangat kecil ($\Delta\delta^{13}\text{C} < 1\text{‰}$). Secara khusus, nilai $\delta^{13}\text{C}$ pada fraksi madu mengalami penurunan yang signifikan (bergerak ke arah lebih negatif) seiring dengan peningkatan jumlah bahan pengotor berupa HFCS dan GS, sementara nilai $\delta^{13}\text{C}$ pada fraksi protein tetap relatif konstan. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa metode SCIRA efektif untuk mendeteksi pengotor gula C4 (HFCS dan GS), tetapi kurang optimal dalam mengidentifikasi pengotor gula C3.

Pemberian pakan koloni lebah madu dengan sukrosa dan sirup komersial dalam jumlah berlebihan (sejenis pemalsuan tidak langsung) harus dilarang demi melindungi kesejahteraan konsumen. Guler et al. (2014) menggunakan SCIRA untuk mendeteksi madu yang dipalsukan secara tidak langsung dengan memberi makan lebah pada berbagai konsentrasi bahan pengotor (HFCS85, HFCS55, sirup pakan lebah (BFS), gula glukosa monohidrat (GMS), dan sirup sukrosa) sebanyak 5, 20, dan 100 liter per koloni. Nilai $\delta^{13}\text{C}$ untuk fraksi madu dan protein dari 130 koloni (10 koloni kontrol murni, 8 koloni untuk

tiap konsentrasi 5 bahan pengotor, total 120 koloni) diukur menggunakan penganalisis unsur dengan spektrometri massa rasio isotop (EA-IRMS), serta persentase gula C4 dalam madu dihitung berdasarkan persamaan (2). Menariknya, lebah memakan semua sirup kecuali GMS. Nilai rata-rata $\delta^{13}\text{C}$ untuk fraksi madu murni sebesar $-26,07 \pm 0,03\text{‰}$, sesuai harapan karena berada di bawah $-23,5\text{‰}$, sehingga diklasifikasikan sebagai madu murni menurut Metode Resmi AOAC 978.17. Sebaliknya, madu dari koloni lebah yang diberi makan HFCS85 (20 L/koloni), serta HFCS85 dan HFCS55 (masing-masing 100 L/koloni) diklasifikasikan dengan benar sebagai madu palsu, ditandai dengan nilai $\delta^{13}\text{C}$ yang kurang negatif, yakni $-21,70 \pm 0,10\text{‰}$, $-15,87 \pm 0,11\text{‰}$, dan $-17,2 \pm 0,07\text{‰}$ dibandingkan standar $-23,5\text{‰}$. Data juga membuktikan bahwa lebah dapat memetabolisme gula HFCS85 (5 L/koloni) dan HFCS55 (5 dan 20 L/koloni) (Guler et al., 2014). Dengan demikian, lebah yang diberi pakan HFCS85 (20 dan 100 L/koloni) dan HFCS55 (100 L/koloni) diklasifikasikan sebagai lebah tercemar, dengan nilai rata-rata $\Delta\delta^{13}\text{C}$ masing-masing $-3,12 \pm 0,08\text{‰}$, $-7,52 \pm 0,09\text{‰}$, dan $-6,18 \pm 0,09\text{‰}$ (Metode Resmi AOAC 991.41 menetapkan $\Delta\delta^{13}\text{C}$ harus berada dalam rentang -1 hingga 1‰ untuk madu murni) (Guler et al., 2014).

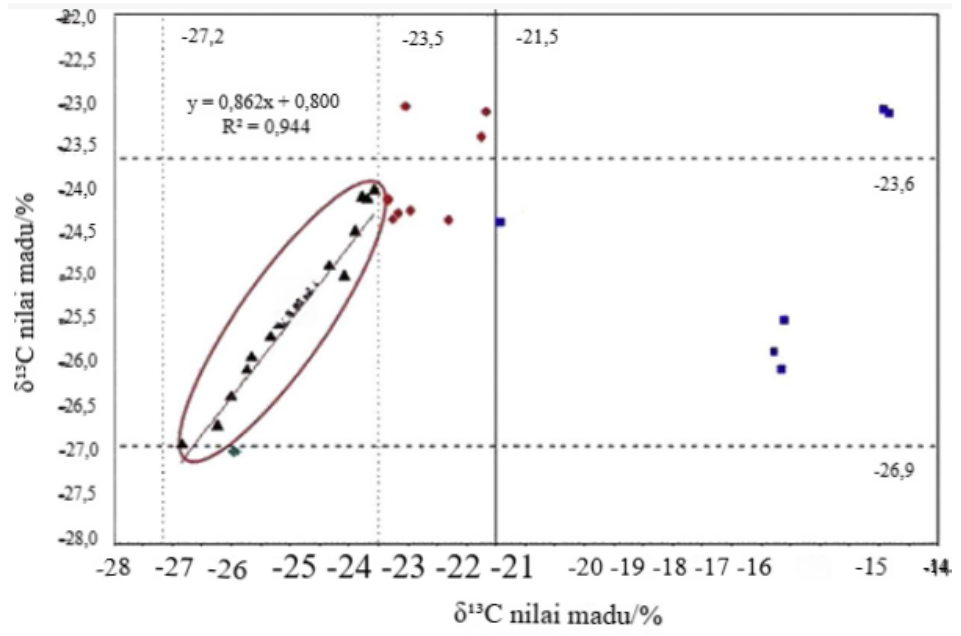
Oleh karena itu, teknik kromatografi cair kinerja tinggi yang dipadukan dengan spektrometri massa rasio isotop (HPLC-IRMS) dikembangkan untuk mendeteksi bahan pengotor dalam madu secara efektif (Cabanero et al., 2006). HPLC merupakan alat yang ampuh untuk memisahkan berbagai jenis gula sebelum dilakukan karakterisasi isotop menggunakan IRMS. Cabanero et al. (2006) sengaja mencampur lima madu murni dengan gula C3 (berasal dari gula bit) dan C4 (berasal dari gula tebu, sirup gula tebu, sirup isoglukosa, dan HFCS), kemudian menggunakan EA-IRMS yang dipadukan dengan SCIRA (Metode Resmi AOAC 978.17 dan 991.41) untuk mengautentikasi madu. Nilai rata-rata $\delta^{13}\text{C}$ madu murni dan fraksi protein pada bahan tersebut berada dalam rentang $-23,3\text{‰}$ hingga $-27,2\text{‰}$ dan $-23,6\text{‰}$ hingga $-26,9\text{‰}$, sedangkan nilai $\delta^{13}\text{C}$ yang kurang negatif diamati pada madu palsu, yaitu antara $-14,2\text{‰}$ hingga $-24,6\text{‰}$ dan $-24,4\text{‰}$ hingga $-26,6\text{‰}$. Setelah pemisahan fruktosa, glukosa, dan sukrosa melalui HPLC, nilai $\Delta\delta^{13}\text{C}$ yang sesuai untuk [fruktosa – glukosa], [fruktosa – sukrosa], dan [glukosa – sukrosa] pada madu murni diperkirakan sebesar $0,0 \pm 0,3\text{‰}$, $1,2 \pm$

0,4‰, dan $1,3 \pm 0,4\%$. Metode resmi AOAC menetapkan bahwa bahan yang dicurigai tercemar harus diuji lebih lanjut menggunakan HPLC-IRMS, dan nilai $\Delta\delta^{13}\text{C}$ [fruktosa – sukrosa] serta $\Delta\delta^{13}\text{C}$ [glukosa – sukrosa] harus melebihi rentang yang diizinkan untuk madu murni. Dengan demikian, temuan ini menunjukkan bahwa HPLC-IRMS berguna untuk memvalidasi ulang hasil uji yang diperoleh menggunakan metode resmi AOAC.

Tingkat pemalsuan pada madu juga dinilai menggunakan Metode Resmi AOAC 991.41, yang mengungkapkan bahwa penambahan 5% dan 10% sirup tebu tidak mengubah nilai rata-rata $\Delta\delta^{13}\text{C}$ untuk madu dan fraksi protein, sehingga membuktikan bahwa Metode Resmi AOAC 991.41 kurang efektif untuk memperkirakan tingkat pemalsuan dalam madu. Data dari HPLC-IRMS untuk [fruktosa – sukrosa] dan [glukosa – sukrosa] menunjukkan penurunan signifikan seiring meningkatnya jumlah sirup tebu dalam madu, serta menunjukkan batas deteksi yang mengesankan terhadap kandungan bahan pengotor sirup tebu hingga serendah 2%. Dengan meningkatnya konsentrasi bahan pengotor gula C3 (gula bit), nilai rata-rata $\Delta\delta^{13}\text{C}$ [fruktosa – sukrosa] dan $\Delta\delta^{13}\text{C}$ [glukosa – sukrosa] menunjukkan perbedaan signifikan dibandingkan dengan madu murni. Singkatnya, teknik isotop pertama yang diusulkan untuk mendeteksi pengotor jenis C3 berhasil dikembangkan menggunakan HPLC-IRMS.

Baru-baru ini, Dong et al. (2017) menggunakan teknik EA-IRMS dan LC-IRMS untuk mengidentifikasi zat pengotor (gula, fruktosa, glukosa, dan sukrosa) dalam madu komersial dari wilayah Cina, berdasarkan $\Delta\delta^{13}\text{C}$ dari madu dan fraksi protein yang dideteksi menggunakan detektor indeks bias (LC-RID). Madu murni tanpa penambahan gula C4 diharapkan menunjukkan nilai $\delta^{13}\text{C}$ lebih rendah dari -23,5‰. Sebaliknya, rentang nilai antara -25‰ hingga -21,5‰ tercatat sebagai madu murni, sehingga kualitasnya dipertanyakan. Nilai $\delta^{13}\text{C}$ untuk madu yang dipalsukan sesuai dengan yang diharapkan, yaitu lebih tinggi atau kurang negatif (-16,77 sampai -14,82‰) dibandingkan dengan batas -21,5‰ (Dong et al., 2017). Kemurnian bahan tidak mungkin dipengaruhi oleh kekurangan dalam protokol ekstraksi protein. Namun, perbedaan yang jelas antara madu murni, madu yang tercemar, dan madu yang dipertanyakan dapat dibuat dengan menggunakan plot dua dimensi (nilai $\delta^{13}\text{C}$ untuk madu

yang diuji dibandingkan dengan nilai $\delta^{13}\text{C}$ masing-masing untuk fraksi protein) (Dong et al., 2017). Nilai $\delta^{13}\text{C}$ untuk madu yang diuji dan fraksi protein yang sesuai berkorelasi kuat ($R^2 = 0,944$) sehingga menghasilkan persamaan linier $\delta^{13}\text{C} (\text{protein}) = 0,862 \delta^{13}\text{C} (\text{madu}) + 0,800$ (Gambar 10.2), yang mengakibatkan penurunan signifikan pada batas deteksi SCIRA konvensional untuk mengidentifikasi madu yang dipalsukan.



Gambar 10.2. Distribusi $\delta^{13}\text{C}$ Madu dan $\delta^{13}\text{C}$ Berprotein untuk Madu Murni (segitiga), Madu Campuran(kotak), dan Madu Diragukan (berlian) (Dong et al., 2016).

Meskipun SCIRA merupakan metode yang sudah mapan untuk membedakan madu yang dipalsukan secara langsung dan tidak langsung oleh gula C4, hasil positif palsu sering terjadi ketika lebah madu mengumpulkan nektar dari tanaman C4, atau karena fraksi protein yang rendah dalam madu akasia dan lavender (Elflein dan Raezke, 2008). Kekurangan ini telah diatasi dengan integrasi IRMS dengan HPLC atau LC, sehingga memungkinkan pemisahan gula individual yang ada dalam madu sebelum memperkirakan nilai $\delta^{13}\text{C}$. Cabanero et al. (2006) telah menguji pendekatan canggih ini untuk

mendeteksi pengotor gula C3 dalam madu dengan hasil yang baik. Namun, biaya yang tinggi, persiapan bahan yang memakan waktu, serta prosedur ekstraksi protein yang rumit membuat teknik ini kurang cocok untuk pemantauan cepat dan rutin terhadap sejumlah besar madu (Cotte et al., 2007).

10.4. Teknik kromatografi

10.4.1. Kromatografi gas

Kromatografi gas (GC) merupakan teknik yang sangat serbaguna untuk mendeteksi zat pengotor gula dalam madu, karena memungkinkan analisis langsung senyawa volatil dan semi-volatil (seperti aroma madu). Keandalan GC dalam mendeteksi keberadaan monosakarida, disakarida, trisakarida, dan zat pengotor (seperti HFCS, HFIS, dan ISS) dalam madu telah diuji dengan resolusi yang relatif lebih tinggi dibandingkan metode lain (Ruiz-Matute et al., 2007; 2010; Ruiz-Matute et al., 2010b).

Ruiz-Matute et al. (2007b) mengembangkan metode baru menggunakan GC yang dilengkapi dengan deteksi ionisasi nyala (FID) dan sistem MS. Dalam metode tersebut, difruktosa anhidrida (DFA) pada 80HFCS dan ISS pada konsentrasi 5%, 10%, dan 20% digunakan sebagai penanda pemalsuan. Teramati sedikit perbedaan waktu retensi antara menit ke-23 hingga 28 yang kemungkinan disebabkan oleh keberadaan disakarida dalam madu yang dipalsukan. Namun, perbedaan ini baru terlihat setelah madu yang dipalsukan diolah terlebih dahulu dengan ragi (*Saccharomyces cerevisiae*). Hal ini terjadi karena ragi memetabolisme dan menghilangkan monosakarida pengganggu utama dalam madu murni, sehingga puncak spektrum disakarida dan trisakarida yang sebelumnya tidak mencolok menjadi lebih intens. Spektrum massa direkam menggunakan teknik GC-MS, dan puncak yang muncul antara menit ke-23 hingga 28 ditetapkan sebagai DFA.

Gambar 10.3 menggambarkan profil GC-FID madu murni dan madu yang dipalsukan dengan 80HFCS (20%) serta ISS (20%), di mana puncak DFA terdeteksi pada madu yang dipalsukan dengan HFCS dan ISS. Tidak ditemukan puncak DFA yang signifikan pada delapan belas madu asli yang diolah secara termal (dipanaskan hingga 80°C dan 120°C) serta yang mengalami penyimpanan jangka panjang selama tiga tahun. Hal ini membuktikan bahwa DFA merupakan

indikator yang dapat diandalkan untuk mendeteksi madu yang dipalsukan dengan HFCS dan ISS, dengan batas deteksi yang mampu mengidentifikasi tingkat pemalsuan serendah 5%.

Selanjutnya, Ruiz-Matute et al. (2010b) menggunakan GC-MS untuk mengidentifikasi madu yang dipalsukan dengan HFIS dan berhasil mendeteksi keberadaan beberapa jenis sakarida (fruktosa, sukrosa, dianhidrida fruktosa, inulobiosa, kestosa, inulotriosa) dalam bahan uji. Profil karbohidrat madu murni dan madu yang dipalsukan dengan 5% HFIS ditunjukkan pada Gambar 10.4. Meskipun konsentrasi inulobiosa meningkat seiring dengan penambahan HFIS, inulobiosa bukanlah penanda yang baik untuk mendeteksi zat pengotor dalam madu karena konsentrasinya yang sangat rendah. Sebaliknya, inulotriosa sama sekali tidak ditemukan dalam madu murni, tetapi terdapat dalam konsentrasi signifikan pada madu yang dipalsukan, sehingga menjadi penanda eksogen yang sangat baik untuk mendeteksi HFIS.

Perlu disebutkan bahwa sensitivitas GC yang tinggi menjadikannya alat yang efektif untuk mengidentifikasi berbagai macam pengotor karbohidrat dalam madu, seperti HFCS, ISS, dan HFIS. Teknik GC merupakan metode pertama yang berhasil mendeteksi HFIS menggunakan inulotriosa sebagai penanda, sementara DFA digunakan secara efektif untuk mengidentifikasi HFCS dan ISS dalam madu murni. Namun, persiapan yang melelahkan dari gula volatil yang diderivatisasi melalui perlakuan ragi (untuk mengonsentrasikan DFA) dapat secara tidak sengaja memasukkan zat asing ke dalam bahan uji, sehingga hal ini tetap menjadi keterbatasan utama dari teknik ini.

10.4.2. Kromatografi cair

Kromatografi cair (LC) merupakan salah satu teknik yang telah mapan untuk mengidentifikasi gula C3 dan C4 dalam madu. Awalnya, LC yang dilengkapi dengan deteksi amperometrik berdenyut (PAD) digunakan untuk menganalisis fruktosa dan glukosa, kemudian diperluas dengan menggunakan kromatografi gas (GC) yang digabungkan dengan detektor ionisasi nyala (FID) untuk membuat profil disakarida dan trisakarida. Kedua teknik tersebut dikombinasikan dengan analisis statistik dan analisis komponen

utama (PCA) untuk mengukur zat pengotor dalam madu akasia, lavender, dan kastanye (Cotte et al., 2003).

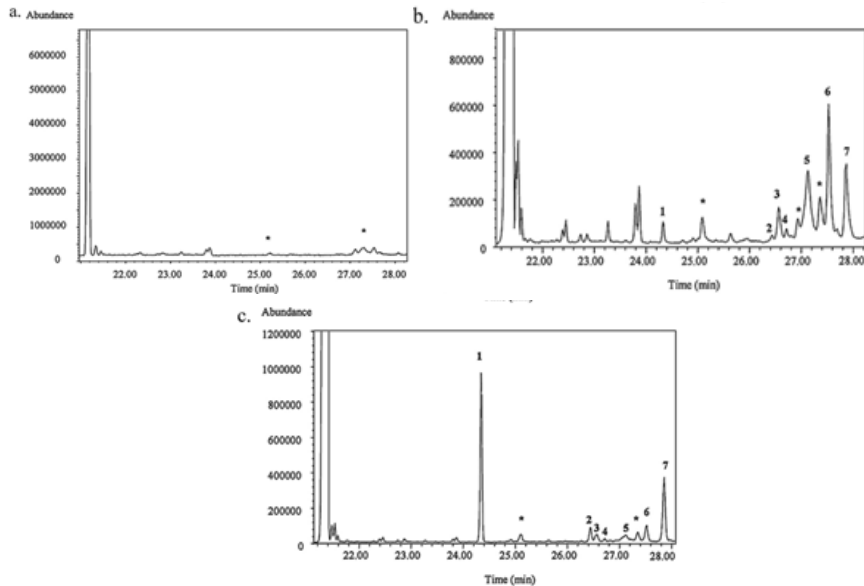
Penggabungan penilaian instrumental dengan PCA multivariat secara signifikan dapat mereduksi data berdimensi tinggi menjadi beberapa komponen utama ortogonal (PC) yang menyumbang sebagian besar variabilitas data (Amiry et al., 2017). Bahan-bahan tersebut kemudian dapat divisualisasikan dalam ruang baru, sehingga memudahkan untuk melihat keterkaitan, persamaan, dan perbedaan antar madu (Etzold & Lichtenberg-Kraag, 2008).

Analisis ini dilakukan terhadap beberapa madu Prancis. Sebanyak 141 madu dari Prancis (50 madu akasia, 38 madu kastanye, dan 53 madu lavender) diperiksa oleh Cotte et al. (2003) dan secara sistematis dicampur dengan dua jenis sirup gula C3 (sirup gula cair Erstein, A dan Cerestar FT 1702, C), serta campuran gula C3 dan C4.

Analisis LC-PAD dan GC-FID berhasil mendeteksi maltosa dan maltotriosa sebagai penanda potensial untuk sirup gula B dan C, sehingga selanjutnya data tersebut digunakan sebagai parameter input untuk PCA. PCA dengan efektif membedakan sirup gula (A, B, dan C sebagai bahan pengotor) dalam madu akasia, kastanye, dan lavender, dengan batas deteksi antara 5–10%. Baru-baru ini, RS muncul sebagai bahan pengotor madu yang populer di pasar Tiongkok (Xue et al., 2013), karena keberadaannya dalam madu murni tidak terdeteksi oleh SCIRA. Hal ini disebabkan gula dalam RS juga berasal dari tanaman C3 dengan nilai δ^{13} yang mirip dengan nektar yang dikumpulkan oleh lebah madu.

Masalah tersebut diatasi dengan pengembangan sistem HPLC yang digabungkan dengan deteksi susunan dioda (HPLC-DAD) oleh beberapa peneliti. Misalnya, Xue et al. (2013) menilai 160 madu dari berbagai provinsi di Cina, di mana 32 madu RS yang representatif dibeli dan ditambahkan sebagai bahan pengotor dalam madu murni dengan konsentrasi 10, 20, atau 50% (b/b). Teridentifikasi adanya puncak yang tidak diketahui pada sekitar 12,5 menit pada semua kromatogram HPLC-DAD dari semua RS, namun tidak ditemukan pada kromatogram madu alami (murni) (Gambar 10.5). Analisis komposisi RS lebih lanjut menggunakan kromatografi cair spektrometri massa waktu terbang kuadrupol (LC-Q-TOF-MS) dan spektroskopi NMR mengonfirmasi bahwa puncak yang tidak diketahui tersebut adalah 2-asetilfuran-3-glukopiranosida (AFGP). Teknik yang sama berhasil

mendeteksi jejak AFGP dalam madu yang dipalsukan dengan kadar RS yang rendah, bahkan serendah 10% (b/b), sementara studi lain secara efektif mengidentifikasi 16 dari 186 madu komersial yang mengandung RS sebagai bahan pengotor.



Gambar 10.3. Profil GC-FID dari daerah difruktosa anhidrida (DFAs): (a) madu murni, (b) dipalsukan dengan 20% gula invert dan (c) dipalsukan dengan 20% 80HFCS setelah perlakuan dengan ragi. Label 1–7 sesuai dengan tujuh puncak DFA (GC-FID: kromatografi gas yang digabungkan dengan detektor ionisasi nyala; HFCS: sirup jagung fruktosa tinggi) (Ruiz-Matute et al., 2007a)

Wang et al. (2015) membuktikan kepraktisan HPLC-RID untuk membedakan dan memisahkan puncak-puncak utama dalam profil madu palsu dari sirup pati dan madu murni, di mana madu murni dicirikan oleh kandungan monosakarida yang tinggi (70%), diikuti oleh disakarida (10%) dan sejumlah kecil trisakarida serta tetrasakarida. Oleh karena itu, sangat tidak mungkin terdapat sejumlah besar oligosakarida dengan derajat polimerisasi (DP) lebih dari 5 ($DP > 5$) dalam madu murni. Selain itu, HPLC-RID dapat digunakan untuk membedakan puncak utama dalam madu murni dan madu palsu dari sirup pati (Wang et al., 2015), mengingat pati kaya akan oligosakarida akibat hidrolisis enzimatis pati yang tidak sempurna (Reeve, 1992). Wang et al. (2015) mendeteksi puncak karakteristik serupa dalam kromatogram sirup pati, namun tidak

ditemukan dalam kromatogram madu murni. Temuan ini menegaskan bahwa produk madu campuran sirup pati dengan oligosakarida DP > 5 dapat dideteksi oleh HPLC-RID. Deteksi tingkat pemalsuan sirup pati dalam madu dapat dilakukan hingga level serendah 2,5%, yang lebih sensitif dibandingkan SCIRA (7%) menurut AOAC 998.12.

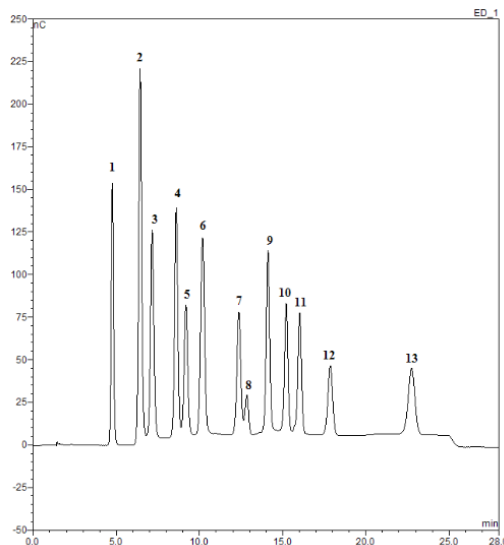
Harga madu biasanya ditentukan oleh tingkat produksi dan ketersediaannya di suatu daerah geografis. Produksi yang lambat dan berbagai manfaat nutrisi madu telah meningkatkan harganya selama bertahun-tahun, sehingga memberi insentif bagi petani dan produsen lebah untuk memalsukan madu dengan gula atau pemanis yang lebih murah demi keuntungan lebih besar. Contohnya, madu akasia yang lebih mahal sering dipalsukan dengan madu lobak yang lebih murah (Wang et al., 2014), yang sulit dibedakan hanya dengan pengamatan mata telanjang. Oleh karena itu, LC yang digabungkan dengan deteksi elektrokimia (LC-ECD) dikembangkan sebagai sistem yang cukup sensitif untuk membedakan madu akasia yang dipalsukan dengan sirup komersial atau yang mengandung asam klorogenat dalam jumlah lebih tinggi (1,738 mg/kg) dari madu lobak yang ditambahkan (0,272 mg/kg). Profil LC-ECD madu lobak menunjukkan kandungan asam ellagik yang signifikan (27,163 mg/kg) dibandingkan madu akasia (0,274 mg/kg), mirip dengan kromatogram madu akasia yang dicampur yang menunjukkan kandungan asam ellagik tinggi. Dengan demikian, data tersebut menunjukkan bahwa asam klorogenat dan asam ellagik merupakan penanda yang baik untuk mengidentifikasi pemalsuan madu akasia menggunakan madu lobak. Selain itu, penggabungan PCA dan analisis kluster pada LC-ECD meningkatkan sensitivitas, memungkinkan diferensiasi yang lebih akurat antara campuran (madu akasia dan lobak), madu akasia murni, dan madu lobak murni, dengan deteksi tingkat pemalsuan serendah 5%.

Literatur menunjukkan bahwa LC dapat secara efektif mengidentifikasi pengotor gula C3 dan C4, termasuk pengotor gula C3/C4 (RS) yang baru diperkenalkan dalam madu. Sementara itu, profil nutrisi dari berbagai jenis madu hanya dapat dibedakan menggunakan HPLC. Namun, kepraktisan HPLC untuk memantau sejumlah besar bahan terbatas oleh proses persiapan yang rumit dan membutuhkan ahli untuk melakukan analisis (Roussel et al., 2003).

10.4.3. Penerapan kromatografi pertukaran anion HPLC disertai deteksi amperometrik berdenyut.

Sebanyak tujuh puluh empat madu dengan asal botani yang berbeda, berasal dari Calabria, Eropa, dan Tiongkok, dianalisis menggunakan metode HPAEC–PAD. Sebanyak tiga belas jenis gula yang berbeda berhasil dikuantifikasi, yang meliputi dua monosakarida (glukosa dan fruktosa), tujuh disakarida (trehalosa, sukrosa, isomaltosa, palatinosa, nigerosa, maltosa, dan kojibiosa), serta empat trisakarida (melezitosa, erosa, isomaltotriosa, dan panosa).

Pada Gambar 10.4, kromatogram menunjukkan elusi kromatografi dan waktu retensi. Ke-13 gula dipisahkan dalam waktu 25 menit dengan resolusi yang baik, kecuali melezitosa/palatinosa, yang tidak terurai dengan baik dalam kondisi ini.



Gambar 10.4. Kromatogram yang diperoleh dengan analisis kromatografi pertukaran anion kinerja tinggi dengan deteksi amperometrik berdenyut (HPAEC–PAD) dari campuran standar tiga belas gula (1) trehalosa, (2) glukosa, (3) fruktosa, (4) sukrosa, (5) isomaltosa, (6) kojibiosa, (7) melezitosa, (8) palatinosa, (9) isomaltotriosa, (10) nigerosa, (11) maltosa, (12) erosa, dan (13) panosa (Carabetta et al., 2020)

Metode yang digunakan mampu mengidentifikasi gula mayor maupun gula minor tanpa memerlukan tahap praperlakuan pada bahan, sehingga potensi kehilangan gula minor dapat dihindari. Hal ini menjadi penting mengingat peran gula minor dalam diskriminasi

dan penentuan asal madu. Informasi mengenai kelimpahan relatif monosakarida, disakarida, dan trisakarida dalam madu dapat dilihat pada Tabel 10.3.

Total kandungan monosakarida dalam madu berada pada kisaran 87,8–92,2% (Tabel 10.3). Berdasarkan literatur, komposisi karbohidrat dalam madu sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti asal botani dan geografis, kondisi lingkungan dan musim, serta perlakuan selama penyimpanan dan pemrosesan (Da Costa Leite et al., 2000). Fruktosa dan glukosa merupakan karbohidrat utama dalam madu. Konsentrasi serta rasio kedua gula ini sering digunakan sebagai indikator untuk menentukan asal-usul madu (Da Costa Leite et al., 2000; Ouchemoukh et al., 2010).

Pada seluruh madu yang diuji, gula pereduksi yaitu fruktosa dan glukosa, teridentifikasi sebagai konstituen utama. Jumlahnya berada dalam kisaran yang ditetapkan oleh *Codex Alimentarius Committee on Sugars* (2001) dan selaras dengan temuan-temuan sebelumnya (Da Costa Leite et al., 2000; De La Fuente et al., 2011; Nozal et al., 2005; Ouchemoukh et al., 2010; Andric et al., 2012; Dobre et al., 2012). Fruktosa secara khusus merupakan gula yang paling dominan dalam semua madu, diikuti oleh glukosa.

Rata-rata kandungan fruktosa tertinggi ditemukan pada madu akasia (445,46 mg/g), diikuti oleh madu kastanye (437,29 mg/g), jeruk (424,61 mg/g), eukaliptus (421,14 mg/g), dan sulla (398,28 mg/g). Data ini sejalan dengan temuan dalam literatur, terutama yang diperoleh dari madu Aljazair (Ouchemoukh et al., 2010), madu akasia dari Kroasia (Primorac et al., 2011), madu black locust dari wilayah Atlantik Eropa (Escuredo et al., 2013; 2014), serta madu akasia dari Serbia (Baloš et al., 2020).

Glukosa merupakan monosakarida utama kedua. Kandungannya dalam semua madu yang dianalisis berada dalam kisaran 237,92–323,93 mg/g, dan hasil ini sejalan dengan data pada madu asal Eropa (Oddo et al., 2004). Madu jeruk (323,93 mg/g) dan sulla (315,46 mg/g) menunjukkan kandungan glukosa tertinggi dibandingkan jenis madu lainnya. Sebaliknya, kandungan glukosa lebih rendah teramati pada madu akasia (274,74 mg/g), kastanye (237,92 mg/g), dan eukaliptus (300,15 mg/g).

Tren serupa juga dilaporkan pada madu dari Serbia, di mana madu multibunga dan madu padang rumput mengandung glukosa

dalam jumlah yang relatif tinggi dibandingkan madu jenis lain. Sementara itu, rata-rata kandungan glukosa terendah tercatat pada madu akasia, yaitu berkisar antara 22,96 hingga 37,29 g/100 g (Baloš et al., 2020).

Selain itu, analisis terhadap madu yang berasal dari Sisilia menunjukkan bahwa madu kastanye memiliki kandungan gula total paling rendah, dengan kombinasi fruktosa dan glukosa sebesar 62,31 g/100 g. Hal ini berkorelasi dengan cita rasa pahit khas dari madu jenis ini. Sebaliknya, madu jeruk dan kayu putih memiliki kandungan fruktosa tertinggi, masing-masing sebesar 38,08 g/100 g dan 38,04 g/100 g (Di Rosa et al., 2018).

Secara umum, konsentrasi disakarida yang meliputi trehalosa, sukrosa, isomaltosa, palatinosa, nigerosa, maltosa, dan kojibiosa—pada madu yang diproduksi di wilayah Calabria berkisar antara 7,1% hingga 11,76%. Data ini selaras dengan temuan terdahulu pada madu asal Aljazair (Ouchemoukh et al., 2010) dan madu dari Sisilia (Mannina et al., 2015).

Tabel 10.3. Kelimpahan relatif (%) monosakarida (MS), disakarida (DS), dan trisakarida (TS) pada madu dari Calabria (Carabetta et al., 2020)

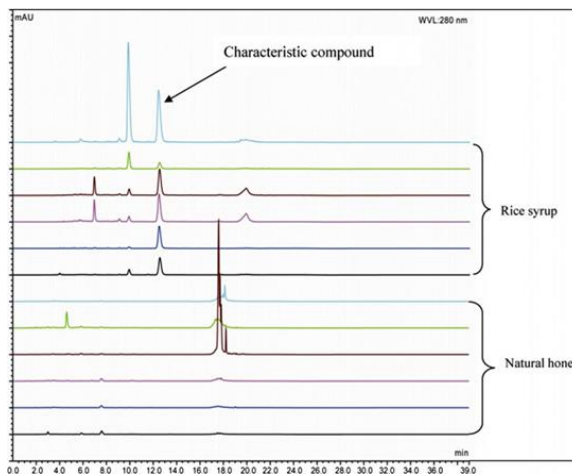
	Gula (%)		Tipe Madu (Jumlah Sample)		
	Sitrus (n = 12)	Eucalyptus (n = 10)	Sulla (n = 12)	Chestnut (n = 16)	Akasia (n = 10)
Total MS					
Rata-rata ± sd	91 ^{b,c} ± 1,4	92.2 ^c ± 1.15	89.0 ^{a,b} ± 3.8	87.77 ^a ± 2.67	89.2 ^{a,b} ± 0.94
Interval	88.3–92.6	90.1–93.3	77.7 ± 92.6	84.1–91.1	88.4–90.7
Total DS					
Rata-rata ± sd	8.0 ^a ± 1.3	7.1 ^a ± 0.98	9.7 ^{a,b} ± 4.0	11.76 ^c ± 2.67	8.3 ^a ± 0.64
Interval	6.9–10.8	6.1–8.5	6.2–21.6	8.8–15.7	7.8–9.7
Total TS					
Rata-rata ± sd	1.1 ^b ± 0.5	0.8 ^{a,b} ± 0.26	1.2 ^b ± 0.4	0.46 ^a ± 0.41	2.4 ^c ± 0.55
Interval	0.5–2	0.6–1.4	0.8–1.2	0.2–1.2	1.4–3.3

Hasilnya dinyatakan sebagai nilai rata-rata ± simpangan baku. Huruf a, b dan c menunjukkan perbedaan signifikan antar jenis madu—uji Tukey, tingkat p ≤ 0,05.

Megherbi et al. (2009) meneliti penggunaan ekstraksi fase padat (*solid-phase extraction/SPE*) dengan fase terbalik yang dikombinasikan dengan kromatografi *anion exchange* berperforma tinggi dan deteksi amperometrik berdenyut (*High-Performance Anion*

Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection/HPAEC-PAD) untuk memprofilkan polisakarida serta mendeteksi pemalsuan madu.

Teknik SPE fase terbalik tidak hanya berfungsi untuk mengonsentrasikan dan meningkatkan ketertelusuran polisakarida dalam madu, tetapi juga efektif dalam menghilangkan monosakarida yang mengganggu serta sejumlah kecil oligosakarida. Untuk keperluan analisis tersebut, profil (sidik jari) madu murni terlebih dahulu harus diperoleh sebagai acuan, sebelum dibandingkan dengan madu yang telah dipalsukan menggunakan sirup jagung kaya oligosakarida (*corn syrup solids/COSS*).



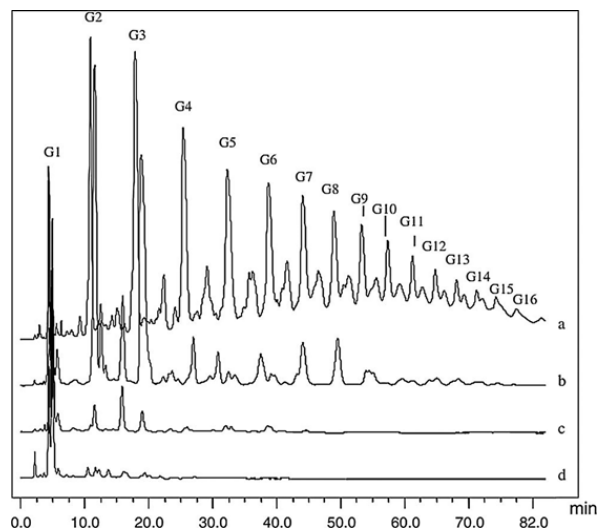
Gambar 10.5. Kromatogram HPLC-DAD dari sirup beras dan madu alami. Tanda panah yang menunjukkan senyawa karakteristik dalam sirup beras diidentifikasi sebagai 2-asetilfuran-3-glukopiranosida (AFGP) (Xue et al., 2013). (HPLC-DAD: kromatografi kinerja tinggi yang dilengkapi dengan deteksi susunan dioda; mAU: unit absorbansi mili; WVL: panjang gelombang)

Kombinasi metode SPE dan HPAEC-PAD telah berhasil digunakan untuk membentuk profil polisakarida, yang selanjutnya dimanfaatkan dalam proses autentikasi beberapa jenis madu, termasuk madu akasia asal Prancis, madu polifloral pegunungan, dan madu polifloral lainnya. Polisakarida dengan derajat polimerisasi (*degree of polymerization/DP*) dalam rentang 12 hingga 17 terdeteksi dalam madu yang dipalsukan dengan COSS, bahkan pada tingkat

pemalsuan serendah 1%. Temuan ini menunjukkan bahwa polisakarida tersebut dapat digunakan sebagai penanda yang sesuai dalam SPE fase terbalik untuk mendeteksi keberadaan COSS dalam madu. Selain itu, batas deteksi yang dicapai melalui metode SPE fase terbalik ini lebih baik dibandingkan dengan metode yang dilaporkan oleh Cordella et al. (2005), yang menggunakan HPAEC-PAD yang diintegrasikan dengan pendekatan kemometrika

Teknik *High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection* (HPAEC-PAD) (Gambar 10.6) merupakan metode yang paling sensitif untuk mendeteksi konsentrasi sangat rendah dari zat pengotor dalam madu (Megherbi et al., 2009).

Meskipun demikian, diperlukan upaya perbaikan yang ekstensif untuk menyederhanakan tahap praperlakuan bahan yang kompleks sebelum teknik ini dapat diadaptasi secara efektif dalam aplikasi penyingkapan rutin.



Gambar 10.6 Profil oligosakarida HPAEC-PAD dari (a) sirup jagung, (b) 20HFCS, (c) 40HFCS, dan (d) 80HFCS.

Label G1 hingga G7 mewakili komponen glukosa dan berbagai derajat polimerisasi maltodekstrin, masing-masing terdiri atas glukosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltoheksaosa, dan maltoheptaosa. Sementara itu, label G8 hingga G16 menunjukkan unit maltodekstrin yang terdiri atas 8 hingga 16 unit glukosa. Identifikasi dan penetapan komponen ini mengacu pada temuan yang dilakukan oleh Morales et al. (2008).

10.4.4. Kromatografi Cair dan Spektrometri Massa Kuadrupol Waktu Terbang untuk Analisis Tingkat Lanjut

Spektrometri massa waktu penerbangan kuadrupol (Q-TOF-MS) memiliki sensitivitas dan keandalan yang tinggi dalam mengidentifikasi senyawa, baik yang telah dikenal maupun yang belum diketahui. Keunggulan ini berasal dari kemampuan pemisahan massa yang sangat akurat serta pengukuran ion produk secara menyeluruh (Kim et al., 2017). Q-TOF-MS yang dioperasikan dalam mode pemindaian penuh (full scan) maupun pemindaian ion produk (product ion scan) mampu secara simultan mengidentifikasi dan mengukur keberadaan kontaminan, metabolit, serta produk degradasi yang belum diketahui sebelumnya.

Dalam beberapa tahun terakhir, teknologi kromatografi cair kinerja ultra-tinggi yang dikombinasikan dengan Q-TOF-MS (UHPLC-Q-TOF-MS) telah banyak digunakan untuk mendeteksi berbagai jenis pengotor karbohidrat dalam madu. Beberapa contoh senyawa yang teridentifikasi adalah difruktosa anhidrida (DFA), 2-asetilfuran-3-glukopiranosida (AFGP), dan polisakarida dengan derajat polimerisasi (DP) antara 12 hingga 19 (Du et al., 2015).

Kromatogram hasil analisis menunjukkan keberadaan DFA dalam gula yang berasal dari tebu dan bit (ISS), serta dalam berbagai jenis sirup jagung fruktosa tinggi (HFCS), termasuk HFCS42, HFCS55, dan HFCS90. Sementara itu, AFGP ditemukan dalam sirup beras (RS42, RS55, dan RS90). Selain itu, polisakarida dengan DP antara 12 hingga 19 juga terdeteksi pada COSS (sirup karbohidrat oligosakarida kompleks) dan HFCS, kecuali pada HFCS90, yang diketahui memiliki tingkat hidrolisis yang tinggi.

Sebanyak 120 madu murni telah dianalisis menggunakan metode ini, dan hasilnya menunjukkan bahwa madu murni tidak mengandung AFGP, DFA, maupun polisakarida dalam rentang DP yang diuji. Sebaliknya, pada madu yang dipalsukan dengan penambahan sirup seperti CS (sirup jagung), RS (sirup beras), HFCS, dan ISS dari tebu dan bit, UHPLC-Q-TOF-MS berhasil mendeteksi seluruh pengotor gula secara simultan, dengan batas deteksi lebih dari 10%.

Metode ini kemudian diterapkan untuk menganalisis 200 madu komersial yang diperoleh dari pasar. Hasilnya, semua madu yang teridentifikasi sebagai dipalsukan mengandung lebih dari satu jenis sirup gula (Du et al., 2015). Temuan tersebut diperkuat melalui

pengujian lanjutan menggunakan metode analisis konvensional, seperti SCIRA, HPAEC-PAD, GC-MS (untuk DFA), dan HPLC-DAD (untuk AFGP), yang semuanya memberikan hasil sejalan. Dengan demikian, UHPLC-Q-TOF-MS terbukti memiliki keunggulan dibandingkan metode konvensional dalam mendeteksi berbagai pengotor gula secara serempak.

10.5. Teknik spektroskopi

10.5.1 Spektroskopi resonansi magnetik nuklir

Spektroskopi resonansi magnetik nuklir proton ($^1\text{H-NMR}$), yang dikombinasikan dengan model statistik, telah digunakan untuk mengevaluasi keaslian madu monofloral dan multifloral yang berasal dari berbagai negara (sebanyak 37 negara), baik dari segi asal botani maupun geografis (Spiteri et al., 2015). Keandalan 61 jenis asal botani dari 816 sampel madu murni dikonfirmasi melalui pemeriksaan serbuk sari secara mikroskopis. Selain itu, sebanyak 205 sampel madu komersial tambahan dibeli guna memvalidasi basis data yang digunakan untuk menunjang validitas data tersebut.

Analisis komponen independen (*Independent Component Analysis/ICA*) diterapkan pada seluruh sampel madu, baik murni maupun yang telah dipalsukan. Dalam proses ini, algoritma *Joint Approximate Diagonalization of Eigenmatrices* (JADE) digunakan untuk mengekstraksi informasi relevan dari sinyal NMR. Namun, deteksi keberadaan zat pengotor masih menemui kendala. Pendekatan berbasis (1) penanda bahan pengotor dan (2) efek pengenceran terhadap komponen minor belum cukup sensitif untuk mengidentifikasi keberadaan sirup ilegal seperti invert sugar sirup (ISS) yang berasal dari bit dan tebu, sirup glukosa gandum, sirup glukosa beras, serta sirup jagung fruktosa tinggi (HFCS dan HFIS). Teknik ini hanya mampu mendeteksi pada batas sensitivitas yang rendah, yaitu berkisar antara 10–20%, yang masih berada di bawah tingkat akurasi metode lainnya.

Dalam aktivitas terpisah yang dilakukan oleh Ribeiro et al. (2014), digunakan NMR medan rendah (*low-field* $^1\text{H-NMR}$) untuk membedakan madu murni dengan madu yang telah dipalsukan menggunakan HFCS pada berbagai tingkat konsentrasi (10, 25, 50, 75, hingga 100% b/b). Hasilnya, menunjukkan adanya perbedaan

signifikan antara kedua jenis madu berdasarkan waktu relaksasi transversal (T2). Analisis biexponensial terhadap data T2 menunjukkan adanya dua populasi aktivitas air: populasi pertama menunjukkan waktu relaksasi cepat (T21) dalam kisaran 1,26–1,60 ms, sedangkan populasi kedua memiliki waktu relaksasi lambat (T22) antara 3,33–7,37 ms. Aktivitas air pada madu murni tercatat lebih rendah dibandingkan dengan madu yang dipalsukan menggunakan HFCS. Hal ini sebagian besar disebabkan oleh pemendekan nilai T21 seiring dengan meningkatnya tingkat pemalsuan (Ribeiro et al., 2014).

Bertelli et al. (2010) juga memanfaatkan NMR resolusi tinggi satu dimensi (1-D) dan dua dimensi (2-D), yang dikombinasikan dengan model statistik multivariat (*Multivariate Statistical Modeling/MSM*), untuk mendeteksi keberadaan zat pengotor berupa sugar syrups (SS) dalam madu. Model diskriminatif yang dibangun dari spektrum 1-D menggunakan MSM melalui analisis faktor dan diskriminan umum, menghasilkan tingkat akurasi prediksi sebesar 95,2% terhadap 21 madu robinia, eucalyptus, jeruk, kastanye, dan multifloral yang telah dicampur dengan tujuh jenis SS.

Secara keseluruhan, spektroskopi NMR merupakan teknik yang mampu mendeteksi keberadaan zat pengotor dalam madu dengan cepat, kurang dari lima menit untuk memperoleh satu spektrum NMR serta memungkinkan kuantifikasi simultan berbagai senyawa kimia dalam satu pengukuran. Namun demikian, seperti halnya berbagai teknik analisis canggih lainnya, penerapan NMR secara luas masih terhambat oleh biaya operasional yang tinggi dan kebutuhan akan tenaga ahli yang berpengalaman di lokasi.

10.5.2. Spektroskopi Raman

Spektroskopi Raman didasarkan pada prinsip pertukaran energi berupa variasi polarisasi yang terjadi ketika cahaya monokromatik (laser) berinteraksi dengan awan elektron suatu molekul (Yang & Ying, 2011). Efek Raman muncul ketika cahaya yang datang dihamburkan secara tidak elastis, sehingga menghasilkan pergeseran panjang gelombang yang ditentukan oleh mode getaran ikatan molekul (Ferraro & Nakamoto, 2012). Pergeseran ini menciptakan spektrum unik yang merepresentasikan struktur molekul secara khas, membentuk sidik jari molekul yang spesifik (Pandey et al., 2017).

Spektrum Raman secara umum bersifat komplementer terhadap spektrum inframerah, dan penggunaannya dalam kombinasi dengan teknik kemometrika memungkinkan evaluasi kuantitatif yang sangat akurat terhadap berbagai kontaminan gula dalam madu (Ozbalci et al., 2013; Sugar & Bour, 2016). Mignani et al. (2016) mengembangkan sistem spektroskopi Raman dispersif yang ringkas dan inovatif, menggunakan eksitasi pada panjang gelombang 1064 nm, yang terintegrasi dengan pemrosesan data multivariat untuk menilai kualitas tiga jenis madu unifloral Italia, yaitu madu kastanye, jeruk, dan akasia. Penilaian dilakukan berdasarkan sejumlah indikator nutraseutikal, seperti profil gula dan kandungan kalium.

Hasilnya menunjukkan bahwa pengukuran gula yang ditambahkan dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan metode HPAEC-PAD konvensional, kemudian dikorelasikan dengan data spektrum Raman. Sementara itu, deteksi dan kuantifikasi kandungan kalium divalidasi menggunakan spektroskopi emisi optik plasma dengan penggabungan induktif. Hasil analisis Partial Least Squares (PLS) terhadap spektrum Raman menunjukkan tingkat akurasi prediktif yang tinggi terhadap gula utama ($R^2 > 0,83$) dan kalium ($R^2 = 0,97$). Keakuratan ini dibuktikan dengan nilai galat akar kuadrat rerata (*Root Mean Square Error*/RMSE) kalibrasi yang rendah (RMSEC < 7,3 mg/g) serta RMSE validasi silang (RMSECV < 11,0 mg/g) (Mignani et al., 2016).

10.5.3. Spektroskopi inframerah

Spektroskopi inframerah (IR) merupakan salah satu teknik yang semakin populer digunakan untuk mendeteksi keberadaan zat pengotor dalam madu. Teknik ini banyak diminati karena memiliki sejumlah keunggulan, antara lain proses analisis yang cepat, protokol persiapan bahan yang sederhana, biaya operasional yang rendah, bersifat non-destruktif (tidak merusak bahan), mudah dioperasikan, serta sesuai untuk aplikasi pemantauan di lapangan (Gallardo-Velazquez et al., 2009; Anguebes et al., 2016).

Spektrum IR umumnya diukur dalam dua wilayah, yaitu inframerah dekat (near-infrared/NIR) pada rentang 10.000–4.000 cm^{-1} dan inframerah tengah (mid-infrared/MIR) pada rentang 4.000–450 cm^{-1} . Spektrum MIR berguna untuk memantau getaran fundamental molekul, sedangkan spektrum NIR memberikan

informasi mengenai overtone (nada kompleks frekuensi tinggi) serta tumpang tindih puncak getaran. Secara umum, puncak spektrum MIR cenderung lebih sempit dan lebih terdefinisi dibandingkan dengan yang muncul pada wilayah NIR (Kelly et al., 2006).

Spektrum IR sering kali mengandung informasi tersembunyi yang berkaitan dengan komposisi kimia bahan uji. Namun demikian, permasalahan seperti tumpang tindih spektrum dan efek matriks menjadikan spektroskopi IR kurang optimal jika digunakan secara mandiri dalam mendeteksi pemalsuan madu. Oleh karena itu, teknik ini umumnya dikombinasikan dengan analisis statistik berbasis kemometrika untuk meningkatkan akurasi dan sensitivitasnya (Gallardo-Velazquez et al., 2009; Anjos et al., 2015; Se et al., 2018a).

Berbagai upaya yang telah dilakukan tersebut menunjukkan bahwa spektroskopi IR, terutama ketika dipadukan dengan kemometrika, mampu secara akurat mengidentifikasi berbagai jenis zat pengotor yang berasal dari tanaman berfotosintesis jalur C3 maupun C4. Selain kecepatan analisis dan kemudahan penggunaan, kebutuhan volume bahan uji yang kecil serta kemudahan dalam proses penyiapan, sehingga menjadikan teknik ini sangat potensial untuk diterapkan dalam pemantauan madu secara massal di lokasi produksi maupun distribusi.

10.6. Analisis Terintegrasi Kemometrik untuk Deteksi Zat Kontaminan

10.6.1. Pendekatan Kemometrika Terintegrasi pada Kromatografi Anion dengan Deteksi Amperometrik Berdenyut

Cordella et al. (2005) merupakan peneliti pertama yang melaporkan penggunaan analisis kemometrik terpadu dengan kromatografi HPAEC-PAD (High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection) untuk mendeteksi bahan pengotor dalam madu, baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Dalam studi ini, madu murni dan madu yang telah dipalsukan dibedakan menggunakan metode analisis diskriminan linier (Linear Discriminant Analysis/LDA). Sementara itu, teknik regresi kuadrat terkecil parsial (Partial Least Squares/PLS) diterapkan pada data kromatografi HPAEC-PAD untuk mengukur konsentrasi bahan pengotor secara kuantitatif.

Dalam rangka mensimulasikan pemalsuan, madu murni sengaja dicampur dengan berbagai jenis sirup pakan lebah industri pada tingkat kontaminasi antara 10–40% (g/100 g). Selain itu, juga dilakukan skenario pemalsuan tidak langsung, yaitu dengan memberi makan lebah menggunakan sirup gula, yang merupakan praktik umum dalam budidaya lebah. Pemalsuan langsung dilakukan melalui pencampuran madu murni dengan sirup dalam proporsi 10%, 20%, dan 40% (g/100 g). Untuk menggambarkan pemalsuan langsung maupun tidak langsung secara eksperimental, tiga koloni lebah diberi makan berbagai jenis sirup gula, sementara satu koloni digunakan sebagai kontrol positif.

Penting untuk dicatat bahwa kromatogram HPAEC-PAD terlebih dahulu dikalibrasi secara otomatis sebelum pergeseran waktu retensi dihilangkan. Hal ini dilakukan karena pergeseran waktu retensi dapat mempersulit proses klasifikasi kemometrik di masa mendatang. Setelah koreksi, waktu retensi diposisikan ulang secara otomatis, sehingga memungkinkan klasifikasi dan kuantifikasi bahan pengotor dilakukan secara akurat dengan menggunakan luas puncak pada profil kromatografi HPAEC-PAD.

Hasil dari upaya Cordella et al. (2005) berhasil mengidentifikasi 13 jenis gula yang berbeda, antara lain: trehalosa, glukosa, fruktosa, melibiosa, iso-maltosa, sukrosa, turanosa, palatinosa, melezitosa, rafinosa, nigerosa, maltosa, dan erosa. Setiap puncak pada kromatogram dikaitkan dengan variabel (kolom), sementara setiap kromatogram bahan uji diperlakukan sebagai baris dalam matriks data sebelum dilakukan proses klasifikasi. Pemalsuan langsung menggunakan sirup glukosa-fruktosa-maltosa (GFM) diketahui dapat menyebabkan peningkatan signifikan pada luas puncak maltosa, disertai penurunan puncak-puncak gula lainnya dalam kromatografi.

Selain itu, ditunjukkan pula bahwa metode klasifikasi terbimbing, khususnya LDA, sangat efektif dalam membedakan antara madu murni dan madu yang telah dipalsukan, serta dalam mengklasifikasikan berbagai jenis madu ke dalam kelompok yang telah ditentukan. Sebelumnya, metode LDA telah berhasil digunakan untuk mengklasifikasikan beberapa jenis madu, seperti madu cemara, madu dada, madu timi + rosemary, serta madu yang dipalsukan, dengan tingkat akurasi klasifikasi mencapai 96,5%. Persentase pemalsuan dihitung menggunakan persamaan regresi linier:

$A = 1,027Y - 0,0022$, di mana A merupakan persentase pemalsuan aktual dan Y adalah nilai pemalsuan yang diprediksi oleh algoritma regresi PLS.

Selain itu, studi ini juga mengungkapkan bahwa efek yang dihasilkan dari pemberian sirup gula secara langsung ke dalam madu serupa dengan efek yang muncul ketika lebah diberi makan sirup gula dalam konsentrasi tinggi. Hal ini memperkuat temuan bahwa pemalsuan dapat terjadi baik secara langsung maupun tidak langsung melalui pakan lebah (Cordella et al., 2005).

10.6.2. Spektroskopi Raman terintegrasi dengan kemometrika

Terdapat korelasi yang kuat antara berbagai profil gula yang dihasilkan melalui spektrum Raman, yang dapat memungkinkan proses deteksi dan kuantifikasi pemalsuan madu secara andal. Penerapan spektroskopi Raman yang dikombinasikan dengan kemometrika telah dieksplorasi oleh Li et al. (2012) untuk membedakan antara madu murni dan madu yang dipalsukan menggunakan sirup jagung fruktosa tinggi (HFCS) maupun sirup gula invert (MSS). Madu yang digunakan melibatkan 74 madu murni yang dikumpulkan dari 10 jenis bunga yang berbeda di Tiongkok.

Dari total bahan tersebut, 44 bahan dipalsukan dengan HFCS dan 50 bahan lainnya dengan MSS, masing-masing pada tingkat pemalsuan sebesar 10%, 20%, dan 40%. Sebelum dianalisis, spektrum Raman dari bahan uji diukur pada suhu ruang dalam rentang 270 hingga 1820 cm^{-1} .

Berbagai tahapan praproses data dilakukan terhadap spektrum Raman untuk mengoptimalkan model klasifikasi, termasuk penskalaan otomatis, pemusatan data (mean centering), turunan pertama dan kedua, koreksi hamburan multiplikatif (multiplicative scatter correction), serta metode *adaptive iteratively reweighted penalized least squares* (airPLS). Beragam kombinasi dari teknik-teknik praproses ini digunakan sebelum data dianalisis menggunakan metode *Partial Least Squares-Linear Discriminant Analysis* (PLS-LDA).

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kombinasi airPLS dan penskalaan otomatis memberikan performa terbaik pada model PLS-LDA. Dengan pendekatan ini, akurasi klasifikasi mencapai 91,1% untuk madu yang dicampur dengan HFCS dan 97,8% untuk madu yang dipalsukan dengan MSS. Hal ini menunjukkan bahwa spektroskopi

Raman yang dikombinasikan dengan analisis PLS-LDA dapat menjadi metode yang efektif dalam mendeteksi pemalsuan madu.

10.6.3. Spektroskopi inframerah terintegrasi kemometrika

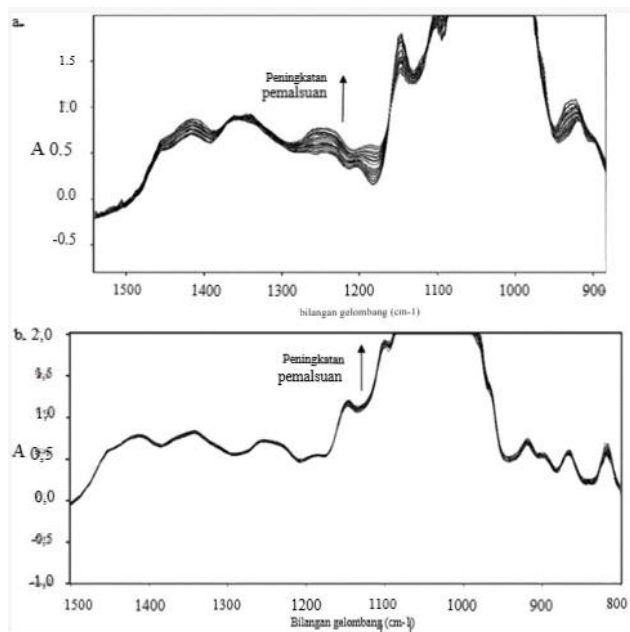
Dalam satu dekade terakhir, spektroskopi inframerah (IR) telah menjadi metode yang paling umum diintegrasikan dengan analisis kemometrik. Metode ini telah muncul sebagai alat yang sangat efektif dalam mendeteksi pemalsuan pada madu. Skema kemometrik berbasis empiris telah berhasil diterapkan untuk melakukan klasifikasi secara kualitatif maupun kuantitatif terhadap madu yang berasal dari berbagai sumber botani (Gok et al., 2015), serta untuk mengukur konsentrasi berbagai jenis gula yang terkandung dalam madu (Pataca et al., 2007; Wang et al., 2010; Anjos et al., 2015; Se et al., 2018a).

Li et al. (2017) mengombinasikan spektroskopi inframerah dekat (NIR) dengan metode Partial Least Squares-Linear Discriminant Analysis (PLS-LDA) untuk menilai kualitas madu yang dipalsukan menggunakan sirup jagung fruktosa tinggi (High Fructose Corn Syrup/HFCS) dan sirup maltosa (MSS). Hasil ini menunjukkan bahwa penerapan metode *Competitive Adaptive Reweighted Sampling* (CARS) secara bertahap mampu meningkatkan akurasi klasifikasi secara signifikan. Tingkat akurasi yang dicapai adalah 86,3% untuk membedakan madu murni dari madu yang dipalsukan dengan HFCS, serta 96,1% untuk membedakan madu murni dari madu yang dipalsukan dengan MSS. Pendekatan CARS-PLS-LDA terbukti efektif dalam mengelompokkan sampel madu ke dalam kelas yang sesuai.

Meskipun sistem analisis terpadu tersebut belum mampu memprediksi tingkat pemalsuan dengan HFCS secara kuantitatif, teknik ini cukup akurat untuk memperkirakan kandungan pemalsuan MSS. Hal ini dibuktikan oleh nilai koefisien determinasi (R^2) dan root mean square error of prediction (RMSEP) masing-masing sebesar 0,901 dan 4,041 untuk madu dari berbagai sumber botani, serta 0,981 dan 1,786 untuk madu yang berasal dari sumber botani yang sama.

Zhu et al. (2010) menggunakan metode spektroskopi NIR transflektansi untuk mengklasifikasikan madu murni dan madu yang dipalsukan dengan akurat. Berbagai model klasifikasi diterapkan, antara lain *Support Vector Machine* (SVM), *Least Squares-SVM*, *Backpropagation-Artificial Neural Network* (BP-ANN), *K-Nearest*

Neighbor (KNN), dan Linear Discriminant Analysis (LDA). Validasi terhadap akurasi model dilakukan melalui penerapan teknik praproses spektral, seperti *Wavelet Transformation* (WT) dan *Principal Component Analysis* (PCA). Pendekatan WT-LS-It menunjukkan bahwa model SVM memberikan hasil klasifikasi paling akurat, dengan akurasi keseluruhan mencapai 95,1% dan area di bawah kurva ROC sebesar 0,952.



Gambar 10.7. Spektrum FTIR-ATR madu yang dipalsukan dengan (a) COSS dan (b) HFCS (FTIR-ATR: Transformasi Fourier inframerah dengan spektroskopi reflektansi total yang dilemahkan; COSS: sirup jagung; HFCS: sirup jagung fruktosa tinggi) (Gallardo-Velázquez et al., 2009)

Gallardo-Velazquez et al. (2009) mengintegrasikan spektroskopi inframerah transformasi Fourier dengan reflektansi total teredam (FTIR-ATR) serta analisis kemometrik untuk mengklasifikasikan dan mengukur keberadaan berbagai zat pengotor seperti COSS, HFCS, dan ISS dari tebu dalam madu asal Meksiko yang dikumpulkan dari berbagai distrik (Chiapas, Oaxaca, Meksiko, dan Morelos). Model kemometrik dibangun berdasarkan spektrum dalam rentang $1500\text{--}800\text{ cm}^{-1}$, yang digunakan untuk memprofilkan konfigurasi utama gula, sebagaimana ditampilkan dalam Gambar 10.7.

Pengelompokan madu ke dalam kelas yang telah ditentukan dilakukan dengan menggunakan metode *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA), dan seluruh madu berhasil diklasifikasikan dengan tingkat pengenalan 100% pada data validasi. Sementara itu, model Partial Least Squares (PLS) yang digunakan untuk mengukur konsentrasi zat pengotor menunjukkan nilai *Standard Error of Prediction* (SEP) yang memuaskan, yakni masing-masing dalam kisaran 1,5–2,1 untuk COSS, 2,1–3,0 untuk HFCS, dan 1,4–2,5 untuk ISS. Hasil ini menunjukkan kemampuan prediktif yang baik dari model untuk mengestimasi konsentrasi berbagai zat kontaminan dalam madu.

Teknik FTIR-ATR yang terintegrasi dengan kemometrika telah diterapkan oleh Rios-Corripio et al. (2012) untuk membedakan antara madu murni dan madu yang dipalsukan, yang dikumpulkan dari Provinsi Tlaxcala dan Puebla di Meksiko. Dalam pekerjaan tersebut, madu sengaja dipalsukan dengan menggunakan gula standar (fruktosa, glukosa, dan sukrosa) serta gula komersial yang lebih murah, seperti COSS, CASS, dan ISS. Analisis PCA terhadap spektrum FTIR-ATR menunjukkan bahwa madu murni tergolong dalam satu gugus (cluster) yang jelas, sedangkan madu yang dipalsukan dengan gula standar memperlihatkan penyimpangan linier yang signifikan dari gugus madu murni seiring dengan meningkatnya kadar pemalsuan. Nilai SEP dari model PLS yang telah dioptimalkan berkisar antara 1,550 hingga 3,150, yang menunjukkan bahwa teknik ini memiliki akurasi tinggi dalam mendeteksi berbagai zat pengotor dalam madu Meksiko.

Dalam studi lainnya, Se et al. (2018b) melaporkan bahwa batas deteksi dari teknik serupa berada di atas 8% (b/b) untuk madu yang dipalsukan dengan COSS, dan di atas 2% (b/b) untuk madu yang dicampur dengan CASS.

Analisis spektroskopi FTIR-ATR yang dikombinasikan dengan kemometrika juga digunakan oleh Kelly et al. (2006) untuk mengevaluasi madu artisanal yang dipalsukan dengan berbagai jenis sirup, termasuk sirup bit terbalik penuh, COSS fruktosa tinggi, CASS terbalik sebagian, sirup dekstrosa, dan sukrosa bit. Madu murni serta madu yang dipalsukan dengan sukrosa bit, sirup dekstrosa, dan sirup jagung terbalik sebagian berhasil diklasifikasikan menggunakan metode SIMCA, dengan tingkat keberhasilan identifikasi masing-

masing sebesar 96,2%, 97,5%, 95,8%, dan 91,7%. Teknik ini terbukti cukup andal dalam mengklasifikasikan bahan pengotor gula tipe C3 dan C4 dalam madu, dengan persentase klasifikasi yang tinggi.

Sementara itu, penggunaan spektroskopi Raman transformasi Fourier (FT-RS) yang dikombinasikan dengan metode MSM (*Modeling Soft Modeling*) untuk mendeteksi pengotor seperti gula tebu dan bit invert dalam madu semanggi, jeruk, dan soba, sebagaimana diteliti oleh Paradkar & Irudayaraj (2002), menunjukkan kemampuan diskriminatif yang tinggi pada rentang bilangan gelombang 200–1600 cm^{-1} . Pita karakteristik dari karbohidrat dan fraksi asam amino yang teramati kemudian digunakan untuk membangun model diskriminasi multivariat dan kuantitatif, sementara metode LDA dan CVA dimanfaatkan untuk membedakan jenis bahan pengotor yang dianalisis. Hasil klasifikasi menunjukkan tingkat akurasi sebesar 96% menggunakan model diskriminan, yang mengonfirmasi efektivitas pendekatan kuantitatif berbasis spektrum FT-Raman. Tingkat pemalsuan dalam madu juga dapat diprediksi dengan baik, sebagaimana ditunjukkan oleh nilai $R^2 > 0,91$, dengan kesalahan standar kalibrasi (SEC) kurang dari 2,765 dan kesalahan standar prediksi (SEP) kurang dari 2,195.

Temuan-temuan terbaru ini menunjukkan bahwa spektroskopi inframerah yang terintegrasi dengan kemometrika merupakan metode yang efisien dan akurat untuk membangun sistem penyaringan berdaya tinggi serta pemantauan rutin terhadap sejumlah besar madu.

10.7. Biosensor

Dalam beberapa kondisi, berbagai teknik analisis konvensional sering kali gagal mendeteksi dan mengaitkan aspek fisik seperti bau, rasa, suhu (hangat atau dingin), opasitas, transparansi, serta warna dengan analit yang diinginkan (Stephan et al., 2000). Sebagai contoh, meskipun kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS) mampu mendeteksi senyawa volatil, teknik ini tidak dapat membedakan senyawa-senyawa tersebut secara efektif sebagaimana kemampuan indra penciuman manusia (Zakaria et al., 2011). Keterbatasan ini sebagian dapat diatasi melalui pengembangan teknologi biosensor.

Salah satu inovasi yang muncul adalah hidung elektronik (*electronic nose/e-nose*), yaitu perangkat yang terdiri atas serangkaian

sensor potensiometri berbasis polimer dengan selektivitas diferensial terhadap senyawa kimia tertentu. Teknologi ini mampu mendeteksi aroma yang dihasilkan oleh berbagai senyawa volatil. *E-nose* yang dikombinasikan dengan model pengenalan pola telah berhasil diterapkan dalam berbagai bidang, termasuk industri pangan (Upadhyay et al., 2017), sektor biomedis (Wilson & Baietto, 2011), serta deteksi penyakit tanaman (Markom et al., 2009).

Sejalan dengan itu, lidah elektronik (*electronic tongue/e-tongue*) juga dikembangkan sebagai alat analitis untuk mendeteksi rasa. Sensor pada *e-tongue* dirancang untuk meniru fungsi kuncup pengecap pada lidah manusia, di mana terjadi interaksi antara sensor dan molekul dalam makanan atau minuman yang kemudian menghasilkan perubahan potensial listrik (Latha & Lakshmi, 2012). Teknologi ini telah berhasil digunakan, antara lain, untuk mengevaluasi keaslian produk pangan (Peris & Escuder-Gilabert, 2016).

Analisis menggunakan *e-nose* dan *e-tongue*, yang didukung oleh teknik kemometrika, telah diaplikasikan secara luas dan menunjukkan keberhasilan dalam membedakan madu berdasarkan asal botani dan geografis yang berbeda (Tiwari et al., 2013; Ulloa et al., 2013; Huang et al., 2015; Bougrini et al., 2016). Gan et al. (2016) membangun dan membandingkan berbagai model klasifikasi, baik yang diawasi (*supervised*) maupun tidak diawasi (*unsupervised*), berdasarkan sidik jari dari sensor *e-nose* dan *e-tongue*, serta spektrum NIR (*Near-Infrared*) dan MIR (*Mid-Infrared*) pada madu murni dan madu yang dipalsukan.

Gan et al. (2016) mengevaluasi empat model *Principal Component Analysis* (PCA) sebagai metode klasifikasi tanpa pengawasan, yang menggunakan karakteristik dari *e-nose* dan *e-tongue*, serta spektrum NIR dan MIR, untuk mengelompokkan madu murni dan madu palsu, termasuk yang dicampur dengan RS dan COSS pada konsentrasi 5%, 10%, 20%, dan 40%. Hasil analisis menunjukkan bahwa plot skor PCA berbasis karakteristik *e-tongue* memberikan performa klasifikasi yang lebih baik dibandingkan dengan plot skor dari kombinasi karakteristik *e-nose*, serta spektrum NIR dan MIR.

Selain itu, empat model klasifikasi *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) sebagai metode klasifikasi dengan

pengawasan juga dibangun menggunakan keluaran dari *e-nose* dan *e-tongue*. Hasilnya, model yang menggunakan data dari *e-tongue* menunjukkan tingkat akurasi klasifikasi yang lebih tinggi, yaitu mencapai 100%, dibandingkan dengan hanya 81% pada model berbasis data *e-nose*.

Tabel 10.4. Analisis komparatif berbagai teknik yang digunakan untuk mendeteksi pemalsuan madu (Se et al., 2019)

Metode	Referensi	Adulteran	Penanda	Angka Keunggulan (LOD, SEP, R ²)	Keuntungan	Kerugian
TLC	Pascas et al., 2013	Fruktosa dan glukosa	-	Sederhana dan cepat	-	Tidak dapat diandalkan karena berbagai jenis pemalsuan gula telah berdegradasi selain fruktosa dan glukosa
SCIRA	Tosun, 2013	Sirup glukosa HFCS, sirup sukrosa	-	LOD > 7%	Dapat diandalkan untuk adulteran yang berasal dari tanaman C4	Membutuhkan waktu persiapan sampel yang lama. Analisis waktu yang lama.
HPLC-IRMS	Cabanaro et al. 2006	HFCS, COSS, isoglukosa dan gula bit	-	LOD > 2%	Hasil lebih lanjut diverifikasi dari metode SCIRA dan mampu mendeteksi adulteran C3	Waktu persiapan sampel yang memakan waktu, biaya tinggi, dan analisis waktu yang lama.
GC-MS	Ruiz-Matute et al. 2007a; Ruiz-Matute et al. 2010b	HFCS dan ISS	Dihidrasi anhidrida (DFA)	LOD > 5%	Resolusi dan sensitivitas tinggi	Membutuhkan perlakuan pagi untuk memperkaya di- dan trisakarida.

GC-MS	(Tidak ada referensi di screenshot)	HFIS	Inulotrios a	LOD > 5%	-	Membutuhk an sampel laboratoriu m.
HPLC-DAD	Xue et al. 2013	Sirup beras	2-asetilfuran-3-glukopiranosida (AFGP)	LOD > 10%	Mampu mendeteksi adulteran C3	Waktu analisis yang lama, menggunakan standar analisis, memerlukan operator yang terampil dan tidak cocok untuk penyaringan rutin dengan throughput tinggi.
HPLC-RID	Wang et al. 2015	Sirup pati	Oligosakarida dengan DP > 5	LOD > 2,5%	Mampu mendeteksi oligosakarida dengan tingkat deteksi yang tinggi	-
LC-ECD	Wang et al. 2014	Pencampuran madu akasia dan rape honey	Asam klorogenat dalam madu akasia dan asam elagik dalam madu lobak	LOD > 2%	Pemisahan yang jelas antara asam klorogenat dan asam elagik	-
HPAEC-PAD	Morales et al. 2008	COSS, 2SFHCS, 4HFCS, dan 8HFCS	Oligosakarida (maltope ntaosa menjadi maltoheptaosa)	LOD > 5% (sirup jagung) LOD > 20% (2SFHCS) LOD > 20% (4HFCS)	Berguna untuk mendeteksi keberadaan mono, di, dan polisakarida dalam madu dengan akurasi tinggi	Sampel perlu dirawat dengan arang aktif untuk menghilangkan mono- dan disakarida.

Reverse d-phase SPE-HPAEC-PAD	Megherbi et al. 2009	COSS	Polisakari da	LOD > 1%	-	Penanda adulteran madu yang ditambahkan dengan 8HFCS tidak diamati.
UHPLC-Q-TOF-MS	Du et al. 2015	Gula terbalik (dari tebu dan bit), HFCS dan sirup beras	Polisakari da dengan DP 12-19, difruktosa anhidrida (DFA), dan 2-asetilfuran-3-glukopiranosida (AFGP)	LOD > 10% untuk deteksi berbagai jenis adulteran dalam madu	Memungkinkan identifikasi senyawa yang tidak diketahui secara sensitif dan akurat.	Peralatan yang mahal dan memerlukan operator terampil untuk melakukan percobaan.
NMR	Spiteri et al., 2015	Gula bit dan tebu penuh ISS, HFCS, HPIS dan beras	-	LOD > 10%	Cepat (< 5 menit untuk mendapatkan spektrum NMR).	Implementasi instrumen NMR membutuhkan biaya tinggi dan keterampilan teknis operator yang tinggi.
FT-Raman spectroscopy integrated chemometrics	Paradkar & Irudayaraj, 2002	Sirup tebu dan bit terbalik	-	Akurasi klasifikasi yang benar diperoleh sebesar 96%.	Efektif untuk analisis skala besar.	Efek Raman lemah dan memerlukan algoritma statistik untuk mengekstrak informasi yang relevan.
NIR combined with chemometrics	Li et al. 2017	HFCS dan sirup maltosa	-	Angka Keunggulan (PLS): $R_p > 0,9$, $SEP < 2,765\%$ (w/w) dan $R > 0,9$, 2195% (w/w). Akurasi klasifikasi yang benar	Kuantifikasi akurat tingkat pemalsuan sirup maltosa.	Spektral overlapping dan efek matriks.

				adalah 96,3 dan 96,1% untuk pemalsuan HFCS dan MS.		
FTIR- ATR combined with chemometrics	Gallardo- Velázquez et al. 2016	COSS, HFCS dan ISS	-	Angka Keunggulan (PLS): R = 0,976, SEP < 3,0	Mampu mendeteksi adulteran C3 dan C4.	Membutuhk an metode referensi atau pengetahuan yang diketahui mengenai analit yang dimurnikan.
E- tongue coupled with chemometrics	Se et al., 2018b	COSS dan CASS	-	LOD > 8% untuk COSS
L OD > 2% untuk CASS	-	-
E- tongue coupled with chemometrics	Bougrini et al., 2016	Sukrosa dan sirup sakarosa	-	LOD > 2%	Ketangguha n dan kesederhan aan	Sampel validasi independen harus digunakan untuk menguji kelayakan sensor yang dikembangkan. an.
Refracti ve index sensors	Irawati et al. 2017	Larutan glukosa	-	-	Sensitivitas tinggi, stabilitas, dan pengulangan	Sampel validasi independen harus digunakan untuk menguji kelayakan sensor yang dikembangkan. an.

Keterangan:

(TLC: Kromatografi lapis tipis; SCIRA: analisis rasio isotop karbon stabil; HPLC: kromatografi cair kinerja tinggi; IRMS: spektrometri massa rasio isotop; GC-MS: kromatografi gas dengan spektrometri massa; DAD: deteksi susunan dioda; RID: detektor indeks bias; LC-ECD: kromatografi cair dengan deteksi elektrokimia; HPAEC-PAD: kromatografi pertukaran anion kinerja tinggi dengan deteksi amperometrik berdenyut; SPE: ekstraksi fase padat; UHPLC: kromatografi cair kinerja sangat tinggi; Q-TOF-MS: spektrometri massa waktu terbang kuadropol; NMR: resonansi magnetik nuklir; FT: transformasi Fourier; NIR: inframerah dekat; FTIR-ATR: inframerah transformasi Fourier dengan spektroskopi reflektansi total yang dilemahkan; HFCS: sirup jagung fruktosa tinggi; HFIS: sirup inulin fruktosa tinggi; CASS: sirup gula tebu; COSS: sirup gula jagung; ISS: gula terbalik sirup; LOD: batas deteksi; SEP: kesalahan standar prediksi; R: koefisien determinasi; PLS: regresi kuadrat terkecil parsial; SEC: kesalahan standar kalibrasi; RMSEP: kesalahan akar-rata-rata kuadrat kalibrasi).

Modifikasi dari *electronic tongue* (*e-tongue*) telah digunakan oleh Bougrini et al. (2016) untuk membedakan antara madu murni dan madu yang dipalsukan. Sistem *e-tongue* berbasis voltametri yang terintegrasi dengan kemometrik ini menunjukkan kinerja yang baik dalam mendeteksi keberadaan sirup sukrosa dan sakarosa dalam madu, dengan batas deteksi serendah 2%. Kategorisasi madu menggunakan fungsi kernel polinomial orde kedua yang digabungkan dengan skema klasifikasi *Support Vector Machine* (SVM) menghasilkan tingkat klasifikasi yang sangat tinggi, yaitu mencapai akurasi 100% dalam membedakan madu murni dari yang dipalsukan.

Studi menarik lainnya dilakukan oleh Zakaria et al. (2011), yang secara bersamaan memanfaatkan sinyal dari *electronic nose* (*e-nose*) dan *e-tongue*. Keduanya dikombinasikan melalui algoritma fusi data untuk meniru sistem sensorik manusia dalam mengklasifikasikan madu secara akurat. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa integrasi respons *e-nose* dengan analisis diskriminan linear (*Linear Discriminant Analysis*, LDA) mampu menghasilkan kluster data yang andal dan terpisah dengan jelas, sehingga efektif dalam membedakan madu murni dari madu yang dipalsukan. Sebaliknya, penggunaan *e-tongue* yang terintegrasi dengan LDA tidak memberikan hasil pengelompokan data yang optimal. Namun demikian, klasifikasi berdasarkan pendekatan fusi sensor yang meniru sistem sensorik manusia (gabungan respons *e-nose* dan *e-tongue*) menghasilkan akurasi klasifikasi sebesar 100%, membuktikan keunggulan pendekatan multimodal dibandingkan dengan modalitas tunggal. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa penggunaan satu jenis sensor saja (baik *e-nose* maupun *e-tongue*) tidak cukup untuk membedakan madu secara akurat, terutama jika hanya mengandalkan metode PCA (*Principal Component Analysis*) atau LDA (Zakaria et al., 2011).

Subari et al. (2012) menggabungkan sinyal *e-nose* dengan data spektral dari *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) untuk mengevaluasi pemalsuan madu, khususnya madu Tualang asal Malaysia yang dihasilkan oleh *Apis dorsata*. Melalui Subari et al. (2012) dibandingkan efektivitas metode fusi data individual dan simultan dalam membedakan madu murni dan yang dipalsukan. Hasil klasifikasi menggunakan LDA terhadap data gabungan dari *e-nose* dan

FTIR menunjukkan kinerja yang lebih baik dibandingkan PCA, dengan tingkat akurasi masing-masing sebesar 76,5% dan 88,0%. Bahkan, akurasi klasifikasi meningkat hingga 91,7% ketika data fusi dari kedua sensor digunakan secara bersamaan, menunjukkan keunggulan pendekatan fusi data dalam mendeteksi pemalsuan madu (Subari et al., 2012).

Irawati et al. (2017) mengeksplorasi penggunaan sensor indeks bias berbasis serat mikro yang terbuat dari silika dan polimetil metakrilat (PMMA), yang dirancang secara mandiri, untuk mengukur respons terhadap madu akasia murni dan yang telah dicampur dengan larutan glukosa (1–6%). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa indeks bias madu meningkat seiring dengan bertambahnya tingkat pemalsuan, sementara daya keluaran dari serat mikro yang direndam dalam madu campuran menurun secara proporsional terhadap jumlah glukosa yang ditambahkan.



Gambar 10.8. Jenis-Jenis Metode Analisis dalam Identifikasi Kontaminan Madu (Se et al., 2019)

Bidin et al. (2016) juga memanfaatkan sumber cahaya dari laser dioda biru (435 nm) yang dikombinasikan dengan sensor perpindahan serat optik (*Fiber Optic Displacement Sensor*, FODS) yang terdiri atas sepasang probe serat optik silika (sebagai pemancar dan

penerima). Pendekatan ini memungkinkan deteksi kemurnian madu secara efisien berdasarkan perubahan respons optik.

Serat penerima yang dapat digerakkan secara aksial digabungkan dengan fotodetektor untuk mengumpulkan cahaya yang tersebar dan dibiaskan. Intensitas cahaya insiden yang ditransmisikan melalui kuvet berisi madu direpresentasikan sebagai fungsi dari perpindahan aksial serat penerima. Keluaran dari sistem *Fiber-Optic Displacement Sensor* (FODS) diukur dalam satuan volt, berdasarkan posisi relatif serat penerima terhadap kuvet, mulai dari posisi terdekat hingga posisi terjauh dengan langkah pengukuran sebesar 1 mm.

Data yang diperoleh dibandingkan dengan referensi hasil kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), dan hasilnya menunjukkan bahwa tegangan yang terukur meningkat sebanding dengan tingkat pemalsuan dalam madu. Tegangan keluaran (V) memiliki hubungan linear dengan konsentrasi fruktosa dan glukosa (C) yang diukur melalui HPLC, sebagaimana ditunjukkan oleh persamaan:

- Untuk glukosa: $C = 0,0143V + 28,43$
- Untuk fruktosa: $C = 0,0041V + 32,43$

Dengan demikian, biosensor yang ditunjukkan pada Gambar 10.8 merupakan alat yang sangat praktis untuk memverifikasi keaslian madu sebelum proses pembelian maupun pemasaran secara massal. Oleh karena itu, dibutuhkan upaya lebih lanjut dan terarah untuk menyusun karakteristik dasar berbagai jenis madu serta bahan pemalsu berbasis gula yang umum digunakan. Selain itu, pengembangan sensor yang lebih serbaguna dan akurat dalam mendeteksi keaslian madu menjadi sangat penting untuk mendukung keandalan sistem ini..

10.8. Perbandingan Berbagai teknik analisis.

Keuntungan dan keterbatasan berbagai teknik untuk mendeteksi serta mengukur pemalsuan dalam madu dibahas dalam bab ini. Metode resmi SCIRA memiliki sejumlah keterbatasan, baik dalam mendeteksi keberadaan madu palsu maupun dalam mengukur tingkat pemalsuan secara akurat. Untuk mengatasi kekurangan tersebut, hingga saat ini telah dikembangkan setidaknya 17 teknik analisis berbeda yang didasarkan pada prinsip kromatografi, spektroskopi, dan penggunaan sensor. Rangkuman data mengenai teknik-teknik tersebut disajikan dalam Tabel 10.4.

Dibandingkan dengan teknik spektroskopi, teknik kromatografi tradisional cenderung lebih memakan waktu, sangat bergantung pada keterampilan operator, mahal, serta menggunakan bahan habis pakai yang tidak ramah lingkungan (Cotte et al., 2007; Bougrini et al., 2016). Meski demikian, ketepatan dan keandalan teknik kromatografi tidak dapat disangkal, karena sejumlah penanda pengotor berhasil diidentifikasi menggunakan metode GC (Ruiz-Matute et al., 2007b; 2010b), LC (Wang et al., 2014), HPLC (Du et al., 2015; Wang et al., 2015), dan HPAEC-PAD (Morales et al., 2008). Hingga saat ini, batas deteksi terendah (limit of detection/LOD) untuk mengidentifikasi tingkat pemalsuan dalam madu adalah sebesar 1%, yang dicapai melalui penggunaan metode SPE-HPAEC-PAD fase terbalik yang canggih (Megherbi et al., 2009).

Sementara itu, teknik spektroskopi dinilai lebih praktis dalam mendeteksi pengotor dalam madu akibat tindakan pemalsuan. Hal ini disebabkan oleh kemudahan pelaksanaan dan kecepatan analisisnya dibandingkan dengan pendekatan kromatografi. Namun, kecuali untuk spektroskopi NMR, sebagian besar teknik spektroskopi seperti Raman, NIR, dan MIR tidak mampu mengidentifikasi penanda spesifik dari pengotor. Oleh karena itu, teknik-teknik ini sering dikombinasikan dengan analisis data kemometrik guna mengekstraksi informasi yang relevan. Hasil analisis spektroskopi juga perlu dikorelasikan dengan metode analisis tradisional guna meningkatkan akurasi dan keandalannya.

Dalam hal ini, spektroskopi NMR terbukti sangat baik dan andal dalam mendeteksi zat pengotor pada madu. Akan tetapi, biaya operasional yang tinggi serta kebutuhan akan operator yang terampil membatasi penerapan teknik ini secara luas. Secara umum, baik teknik spektroskopi maupun kromatografi belum sepenuhnya cocok untuk deteksi dan kuantifikasi zat pengotor dalam madu secara cepat dan dengan kinerja tinggi.

Sebagai alternatif, penggunaan biosensor seperti *electronic nose* (e-nose), *electronic tongue* (e-tongue), dan sensor serat optik menawarkan solusi yang lebih baik. Alat-alat ini mampu mendeteksi berbagai jenis pengotor dalam madu secara sederhana, cepat, dan akurat (Ghasemi-Varnamkhasti et al., 2010). Dengan menggabungkan karakteristik keluaran biosensor dengan analisis data kemometrik, proses penyaringan kualitas madu dapat dilakukan secara akurat,

dalam skala besar, dan langsung di lokasi. Menariknya, biosensor ini diketahui mampu mendeteksi tingkat pemalsuan madu hingga serendah 2% (Bougrini et al., 2016).

10.9. Prospek dan kesimpulan masa depan

Tren dalam kimia analitik saat ini bergerak ke arah pendekatan yang lebih sederhana dan tidak melelahkan, seiring dengan kemajuan teknologi inovatif, pengembangan metodologi kualitatif dan teknik penyaringan, otomatisasi, serta pemanfaatan kolektif kemometrik.

Bab ini menyajikan tinjauan mengenai perkembangan historis, tren terkini, serta potensi masa depan dalam metode deteksi dan pengukuran pemalsuan pada madu. Selain itu, dibahas pula kelebihan dan keterbatasan dari berbagai metode yang digunakan.

Yang terpenting, perkembangan pesat dalam bidang kimia analitik dapat dimanfaatkan oleh konsumen maupun pelaku industri madu untuk memastikan keamanan dan kualitas produk. Meskipun telah terjadi kemajuan signifikan dalam teknik deteksi madu palsu, upaya pengembangan metode analitik yang lebih mutakhir, cepat, dan mudah digunakan tetap perlu ditingkatkan.

Hal ini dapat diwujudkan melalui penerapan teknik spektroskopi yang dikombinasikan dengan kemometrik, seperti spektroskopi Raman dan inframerah (IR), serta teknologi biosensor. Teknologi ini memungkinkan penentuan dan pengukuran tingkat kemurnian madu secara akurat dan efisien.

Bahkan, pemantauan kualitas madu menggunakan teknologi biosensor dinilai sebagai pendekatan yang prospektif, mengingat proses persiapan bahan yang lebih ramah lingkungan dan sederhana, serta kemampuannya dalam mendeteksi tanpa memerlukan reagen yang mahal.

Dalam konteks pengawasan mutu, departemen pengendalian kualitas dapat melakukan inspeksi berskala besar terhadap madu secara berkala guna mencegah peredaran produk palsu di pasaran. Pemeriksaan dan evaluasi standar kualitas dapat dilakukan secara efisien dengan memanfaatkan data yang diperoleh dari teknik spektroskopi terintegrasi kemometrik sebagaimana disebutkan sebelumnya.

BAB XI

PENGARUH PEMALSUAN PADA KHASIAT MADU

11.1. Pengantar

Madu merupakan salah satu produk pangan tertua yang dikenal dan dimanfaatkan oleh manusia. Produk alami ini mengandung berbagai zat gizi penting yang berperan dalam menunjang kesehatan serta proses pemulihan tubuh. Sebagai bahan pangan manis yang khas, madu memiliki regulasi ketat mengenai keasliannya; menurut ketentuan yang berlaku saat ini, tidak diperkenankan adanya penambahan zat atau aditif lain dalam madu, termasuk dalam bentuk olahannya (Codex, 2011).

Komposisi dan sifat fisikokimia madu sangat bervariasi, tergantung pada sumber nektar atau embun madu yang dikumpulkan oleh lebah, serta dipengaruhi oleh kondisi geografis dan iklim setempat (Lazaridou et al., 2004). Madu juga dikenal memiliki manfaat kesehatan, antara lain menjaga daya tahan tubuh dan memberikan perlindungan terhadap berbagai penyakit.

Secara definisi, madu merupakan produk alami dan murni yang tidak mengandung bahan tambahan apa pun (Wikipedia, 2008). Namun demikian, praktik pemalsuan madu kerap terjadi, yang tidak hanya menurunkan nilai gizi dan khasiat pengobatannya, tetapi juga menimbulkan masalah dalam hal mutu dan keamanan pangan (Lawal et al., 2009). Oleh karena itu, pengujian madu menjadi penting sebagai bagian dari pengendalian mutu, dengan tujuan untuk memverifikasi keaslian produk, mendeteksi kemungkinan adanya pemalsuan atau campuran zat buatan, serta memenuhi standar industri dan permintaan pasar (Krell, 1996).

Karakteristik fisik dan kimia madu telah dimanfaatkan sebagai parameter untuk membandingkan madu dari berbagai lokasi geografis, sekaligus menjadi indikator penting dalam membedakan madu alami dari madu yang dipalsukan (James et al., 2009). Pemalsuan, khususnya dengan penambahan gula atau sirup, dapat mengubah berbagai parameter kimia dan biokimia madu, seperti aktivitas enzimatik, konduktivitas listrik, serta kadar senyawa-

senyawa seperti hidroksimetilfurfural (HMF), glukosa, fruktosa, sukrosa, maltosa, isomaltosa, prolin, dan abu.

Lebih lanjut, beberapa parameter kimia seperti kadar HMF yang sebelumnya disarankan sebagai indikator untuk mendeteksi penambahan sirup invert, dapat menimbulkan interpretasi yang ambigu. Hal ini disebabkan oleh fakta bahwa kadar HMF dan aktivitas enzimatis dalam madu dapat bervariasi secara alami antarjenis madu, serta mengalami perubahan secara spontan akibat pemanasan atau penyimpanan dalam kondisi lingkungan yang panas dan lembap (Ajlouni & Sujirapinyokul, 2010).

11.2. Efek pemalsuan pada sifat madu

11.2.1. Efek pada sifat fisik

11.2.1.1. Efek pada warna madu

Warna madu merupakan salah satu fitur yang paling sering mengalami perubahan. Selain itu, warna juga menjadi salah satu parameter utama dalam penurunan kualitas madu selama proses penyimpanan, yang dipengaruhi oleh kadar air serta suhu penyimpanan madu (Bulut & Kilic, 2009). Berdasarkan analisis warna, madu yang telah dipalsukan cenderung memiliki warna yang lebih cerah, sementara madu murni menunjukkan warna yang lebih kemerahan (Naila et al., 2018).

Perubahan warna pada madu yang dipalsukan sangat tergantung pada bahan yang digunakan dalam proses pemalsuan. Sebagai contoh, Gemeda & Negera (2017) melaporkan bahwa pemalsuan madu dengan menggunakan irid menghasilkan warna kuning, sedangkan pemalsuan madu dengan gula melalui proses pemanasan dan penambahan air menghasilkan warna putih muda. Pemalsuan madu dengan perbandingan yang sama antara madu dan gula menghasilkan warna merah dan menjadi padat. Sementara itu, pemalsuan madu putih dengan penambahan gula langsung menghasilkan warna putih yang lebih pekat, dan pemalsuan dengan molase melalui pemanasan menghasilkan warna hitam yang menyerupai warna madu kopi, sebagaimana yang ditemukan pada madu dari wilayah Oromia.

Ambaw & Teklehaimanot (2018) juga melaporkan bahwa madu yang dipalsukan dengan bahan-bahan umum seperti gula, pisang matang, bunga gandum, kentang, bunga jagung, serbuk sari, sisir

kosong, permen cair, molase, dan air panas menunjukkan warna kuning, kuning kecoklatan, dan coklat, berdasarkan pengamatan fisik pada madu dari zona Arsi. Warna madu kemungkinan dipengaruhi oleh senyawa fenolik, serbuk sari, dan kandungan mineralnya (Lazaridou et al., 2004)

11.2.1.2. Kadar air atau indeks bias dan aktivitas air

Kadar air madu dapat bervariasi antara 15% hingga 20% (Bogdanov, 2010). Kadar air ini merupakan salah satu kriteria utama dalam menentukan kualitas dan kondisi penyimpanan madu. Madu yang berasal dari daerah tropis cenderung memiliki kadar air lebih tinggi akibat tingginya kelembaban udara di wilayah tersebut. Kadar air madu juga memiliki hubungan yang erat dengan fermentasi. Semakin tinggi kadar air dalam madu, semakin besar kemungkinan terjadinya fermentasi pada madu tersebut. Menurut Crane (1975), madu yang mengandung lebih dari 18% air rentan mengalami fermentasi, terutama jika disimpan dalam waktu lama. Kadar air yang tinggi juga berpengaruh pada kelangsungan hidup ragi dalam madu. Selain itu, pemalsuan madu dapat mengubah kadar air, indeks bias, dan aktivitas air madu. Perbedaan sifat antara madu murni dan madu campuran sering kali disebabkan oleh bahan-bahan campuran tersebut.

El-Biale & Sorour (2011) melaporkan bahwa pemalsuan madu murni dengan menambahkan empat bahan berbeda (larutan kanji 3%, sirup glukosa 20%, molase, dan air suling) pada konsentrasi yang berbeda (1%, 3%, 6%, 12%, 24%) dapat menyebabkan sedikit perbedaan pada nilai indeks bias. Kadar air madu murni seharusnya berada di kisaran 14% hingga 18%, meskipun angka ini sangat dipengaruhi oleh musim dan kondisi geografis (Rehman et al., 2008). Sebaliknya, kadar air madu yang dipalsukan dengan penambahan pati berkisar antara 21,2% hingga 36,6%, madu yang dipalsukan dengan glukosa memiliki kadar air antara 20,7% hingga 39,6%, dan madu yang dipalsukan dengan air suling memiliki kadar air antara 21,4% hingga 29,2% (El-Biale & Sorour, 2011).

Peningkatan kadar air madu dapat menjadi indikasi adanya pemalsuan (Lawal et al., 2009). Kingsta et al. (2018) menemukan bahwa semakin tinggi zat pengotor yang ditambahkan ke madu murni, maka semakin cepat terjadi peningkatan tegangan keluaran dan

penurunan indeks bias. Ribeiro et al. (2014) juga menemukan bahwa kadar air madu murni (17,65%) meningkat secara bertahap seiring dengan peningkatan persentase zat pengotor. Pada tingkat pemalsuan 50%, kadar airnya mencapai 20,2%, yang mendekati batas maksimum kadar air yang diperbolehkan untuk madu alami (20%), batas kritis yang diperlukan untuk menjaga kualitas madu (Codex, 2001; EU, 2002). Jika madu diperiksa menggunakan air untuk mendeteksi pemalsuan, madu dengan kadar air yang tinggi mungkin belum sepenuhnya matang atau bisa jadi merupakan campuran madu dengan air (Gebremariam & Brhane, 2014). Madu murni umumnya menunjukkan kadar air terendah dibandingkan dengan madu yang dipalsukan, karena bahan-bahan pemalsu cenderung meningkatkan kadar air madu.

Aktivitas air adalah ukuran proporsional dari air bebas dalam produk pangan. Dalam kasus produk pangan dengan aktivitas air lebih rendah dari 0,60, produk tersebut dapat dianggap stabil secara mikrobiologis. Saat ini, aktivitas air dianggap sebagai parameter yang lebih akurat dibandingkan kadar air untuk menilai kualitas madu. Menurut Chirife et al. (2006), terdapat korelasi linier antara kadar air dan aktivitas air. Oroian et al. (2018) mengevaluasi madu yang dipalsukan dengan fruktosa dan sirup inulin terhidrolisis, dan menemukan bahwa aktivitas air meningkat secara proporsional seiring dengan bertambahnya proporsi bahan pemalsu. Selain itu, pemalsuan madu dengan air juga menyebabkan peningkatan aktivitas air dan kadar air madu, yang pada gilirannya mempercepat proses fermentasi dan kerusakan madu.

11.3. Efek pada sifat kimia

Mendeteksi pemalsuan madu dengan memanfaatkan sifat kimia sangatlah penting, karena indeks warna dan sifat reologi jauh kurang akurat jika dibandingkan dengan sifat kimia dan fisik lainnya. Penambahan sejumlah zat ke dalam makanan dapat mengubah rasio komponen tertentu atau menciptakan ketidakaturan dalam komposisinya. Beberapa parameter seperti HMF, abu, keasaman bebas, aktivitas diastase, sukrosa, dan konduktivitas listrik memiliki peran yang sangat penting dalam mendeteksi serta mengklasifikasikan jenis dan konsentrasi bahan pemalsuan yang mungkin ada dalam madu (Amiry et al., 2017).

11.3.1. Pengaruh pemalsuan pada kadar abu

Nilai abu pada madu bergantung pada kadar mineral dan secara langsung mencerminkan jumlah residu anorganik setelah proses karbonisasi. Abdel-Aal et al. (1993) melakukan upaya melalui deteksi pemalsuan madu yang sengaja dicampur dengan berbagai konsentrasi HFCS (*High Fructose Corn Syrup*) sebesar 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% (b/b). Tim tersebut menyarankan bahwa peningkatan kadar abu dapat digunakan sebagai metode yang sederhana dan cepat untuk mendeteksi tingkat pemalsuan madu, dengan rentang pemalsuan antara 10% hingga 50%. Selain itu, Ribeiro et al. (2014) melaporkan pula kadar abu pada madu bunga murni yang awalnya sebesar 0,15% meningkat secara bertahap seiring dengan peningkatan persentase bahan pemalsuan. Peningkatan kadar abu ini tercatat pada seluruh madu yang dipalsukan menggunakan HFCS.

11.3.2. Efek pemalsuan nilai pH

Madu murni umumnya mengandung sedikit asam yang berperan penting dalam memberikan rasa khas madu. Oleh karena itu, madu bersifat sedikit asam dengan nilai pH yang kurang dari 7. Rata-rata nilai pH madu adalah sekitar 3,9, dengan kisaran nilai pH yang umum bervariasi antara 3,4 hingga 6,1 (Bogdanov, 2010). Madu yang tidak murni atau tercemar cenderung memiliki nilai pH yang lebih rendah, yang tidak sesuai dengan kriteria pH madu murni. Menurut Gebremariam & Brhane (2014), nilai pH madu meningkat, sementara keasaman bebasnya menurun setelah penambahan gula komersial. Ribeiro et al. (2014) juga mengamati bahwa peningkatan persentase bahan pengotor dalam madu menyebabkan peningkatan nilai pH secara signifikan, terutama pada madu yang dipalsukan dengan sirup jagung. Hal yang serupa juga ditemukan oleh Rehman et al. (2008), yang menyatakan bahwa pH pada madu yang dipalsukan lebih tinggi dibandingkan dengan pH pada madu murni yang dianalisis di Pakistan. Oroian et al. (2018) menyatakan pula bahwa pemalsuan madu dengan fruktosa dapat meningkatkan nilai pH, sementara pemalsuan dengan sirup inulin terhidrolisis justru menurunkan nilai pH. Fenomena tersebut menjelaskan bahwa penurunan nilai pH pada madu yang dipalsukan dengan sirup inulin terhidrolisis disebabkan oleh sifat asam dari sirup tersebut, yang dihidrolisis dengan HCl pada pH antara 1 hingga 2. Bahkan, beberapa penulis menyarankan bahwa

pH madu cenderung menurun seiring dengan meningkatnya kadar bahan pemalsu, seperti yang diungkapkan oleh Naila et al. (2018) dan Samat et al. (2018), yang menunjukkan bahwa pemalsuan dapat menurunkan pH madu.

11.3.3. Efek pemalsuan pada gula

Telah diketahui bahwa karbohidrat dalam madu terutama terdiri dari campuran kompleks yang mencakup sekitar 70% monosakarida (glukosa dan fruktosa), 10% disakarida, serta sejumlah kecil trisakarida dan tetrasakarida. Tidak ditemukan oligosakarida dengan derajat polimerisasi (DP) lebih dari lima dalam madu. Namun, sejumlah besar oligosakarida tinggi dapat ditemukan dalam sirup pati, yang merupakan produk antara dari proses produksi sirup melalui enzimolisis pati (White, 1978; Low & Sporns, 1998). Oleh karena itu, oligosakarida tinggi ini dapat dijadikan indikator untuk mendeteksi pemalsuan madu yang menggunakan sirup pati (Morales et al., 2008; Corzo & Sanz, 2008).

Fruktosa, glukosa, dan maltosa membentuk sekitar 76,8% komposisi madu dalam bentuk basah, dengan kadar masing-masing berkisar antara 27,3 hingga 44,3% untuk fruktosa, 22,0 hingga 40,8% untuk glukosa, dan 2,7 hingga 16,0% untuk maltosa (Martin, 1979). Beberapa madu yang dipalsukan sering kali memiliki kadar fruktosa yang rendah, karena sifatnya yang biasanya dekstrorotatori (Garcia et al., 2002). Samat et al. (2018) menegaskan bahwa total gula pereduksi dalam madu yang dipalsukan lebih rendah dibandingkan dengan madu murni. Penambahan air ke dalam madu dapat menurunkan kadar gula yang berkurang setelah air ditambahkan, sehingga rasa manisnya pun berkurang, sebagaimana diungkapkan oleh Guo et al. (2011).

Rasio fruktosa/glukosa (F/G) dalam madu murni menurut IHC adalah 1, tetapi menurun pada madu yang dipalsukan (0,75) dibandingkan dengan madu murni (1,21) sebagaimana dikemukakan oleh Samat et al. (2018). Temuan lain menunjukkan bahwa rasio fruktosa/glukosa berada dalam kisaran 1,10 hingga 1,42 pada madu murni maupun madu yang dicampur HFCS, sebagaimana dilaporkan oleh Abdel-Aal et al. (1993).

11.3.3.1. Efek pemalsuan pada sukrosa

Kandungan sukrosa dalam madu sering dianalisis untuk mengidentifikasi kemungkinan adanya manipulasi atau pemalsuan madu. Kadar sukrosa yang tinggi dalam madu dapat mengindikasikan penambahan bahan pemanis murah, seperti gula tebu, gula bit olahan, atau jenis gula lainnya. Salah satu penyebab tingginya kadar sukrosa adalah panen madu yang belum sepenuhnya matang, di mana sukrosa belum sepenuhnya berubah menjadi glukosa dan fruktosa. Selain itu, pemberian makan buatan yang berkepanjangan pada lebah dengan sirup sukrosa juga dapat meningkatkan kadar sukrosa dalam madu, yang seringkali dimotivasi oleh keuntungan komersial yang tinggi (Escuredo et al., 2013; Puscas et al., 2013; Tornuk et al., 2013)

Sebagai antisipasi terhadap praktik pemalsuan, Komite Gula *Codex Alimentarius* menetapkan batas maksimum kandungan gula total sebesar 5 g per 100 g madu bunga (Codex, 2001). Madu yang dipalsukan sering kali memiliki kadar sukrosa lebih dari 5%, yang menjadi indikator penting dalam mendeteksi pemalsuan. Studi oleh Gebremariam & Brhane (2014) menunjukkan bahwa penambahan produk gula komersial pada madu dapat meningkatkan kadar sukrosa dari 3,81% pada madu murni menjadi 9,80% pada campuran madu dan gula (dalam perbandingan 1:1 b/b).

Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa beberapa madu yang diperoleh dari pasar lokal mengandung kadar sukrosa melebihi batas maksimum yang diperbolehkan, yang mengindikasikan pemalsuan melalui penambahan gula atau produk sejenis (Gebremariam & Brhane, 2014). Selain itu, pada beberapa madu yang dicampur dengan bahan pengotor, kadar sukrosa dan monosakarida hampir serupa, yang menunjukkan bahwa madu tersebut bukan hanya ditambah dengan sirup, melainkan lebah diberi makan sirup gula dalam jumlah besar. Dalam proses ini, lebah mengubah sebagian sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa melalui hidrolisis enzimatik, meskipun sebagian sukrosa tetap terakumulasi dalam madu.

Jika madu telah dicampur dengan sirup, seharusnya terjadi penurunan relatif pada semua puncak profil karbohidrat, termasuk monosakarida. Hal ini disebabkan oleh penurunan aktivitas enzim invertase yang biasanya menguraikan sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa (Dumté, 2010). Dumté (2010) juga mengungkapkan bahwa dalam pemberian makan yang berkepanjangan kepada lebah, sukrosa

akan terhidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa. Namun, setelah pemberian makan intensif, lebah mulai menyimpan glukosa dalam bentuk oligosakarida yang lebih kompleks, seperti maltosa dan maltotriosa.

Madu yang tercemar dengan sirup gula seringkali menunjukkan kadar sukrosa sekitar 27%, sementara kadar monosakarida tercatat sekitar 17%. Hal ini menunjukkan bahwa pemalsuan madu dapat terjadi melalui pemberian sirup gula pada lebah. Secara umum, kandungan sukrosa dalam madu murni cenderung rendah, karena enzim invertase dalam madu memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Oleh karena itu, kadar sukrosa yang tinggi dalam madu dapat menjadi indikasi bahwa madu tersebut telah tercemar, baik karena pemalsuan maupun akibat pemanasan berlebihan yang mendenaturasi invertase.

Dengan demikian, kandungan sukrosa menjadi salah satu kriteria utama dalam menentukan kualitas madu. Madu alami atau murni memiliki kadar sukrosa yang sangat rendah, sementara madu yang dipalsukan cenderung memiliki kadar sukrosa yang lebih tinggi, umumnya akibat pemberian gula pada lebah.

11.3.4. Efek pemalsuan pada konduktivitas listrik

Konduktivitas listrik madu memiliki hubungan yang erat dengan konsentrasi garam mineral, asam organik, dan protein. Parameter ini menunjukkan variasi yang besar tergantung pada asal bunga madu dan dianggap sebagai salah satu indikator terbaik untuk membedakan madu berdasarkan sumber bunganya (Terrab et al., 2004). Madu murni umumnya memiliki konduktansi yang mendekati nol. Bahkan, madu yang dipalsukan dengan air atau larutan gula jenuh cenderung memiliki konduktivitas yang lebih tinggi dibandingkan madu murni (Rehman et al., 2008).

Studi perbandingan antara madu murni dan madu yang dipalsukan menunjukkan bahwa nilai rata-rata konduktivitas listrik untuk madu murni adalah 0,28 ms/cm, sementara untuk campuran madu dan gula dengan perbandingan 1:1 (b/b), nilai konduktivitasnya menurun menjadi 0,17 ms/cm. Penurunan konduktivitas listrik ini mengindikasikan adanya pemalsuan pada madu. Konsentrasi garam mineral, asam organik, dan protein pada gula komersial jauh lebih

rendah dibandingkan dengan madu alami (Gebremariam & Brhane, 2014).

Oroian et al. (2018) menunjukkan bahwa madu yang dipalsukan dengan fruktosa memiliki konduktivitas listrik yang lebih rendah dibandingkan asli karena fruktosa dapat menurunkan konduktivitas listrik. Sebaliknya, madu yang dipalsukan dengan sirup inulin terhidrolisis menunjukkan konduktivitas listrik yang lebih tinggi dibandingkan dengan madu asli, hal ini disebabkan oleh sifat asam pada sirup tersebut. Hal ini ditegaskan oleh temuan lainnya yang mengindikasikan bahwa konduktivitas listrik merupakan salah satu parameter terbaik untuk mendeteksi pemalsuan madu (Corbella & Cozzolino, 2006).

11.3.5. Efek pemalsuan pada Hidroksimetil furfural (HMF).

Hidroksimetilfurfural (HMF) merupakan senyawa asing endogen yang sangat reaktif, dan dapat bereaksi lebih lanjut, salah satunya dengan mengalami reaksi Maillard. Proses pembentukan HMF dalam madu berlangsung lambat pada suhu normal selama penanganan. Kandungan HMF dalam berbagai jenis madu umumnya dipengaruhi oleh komposisi gula dan pH madu tersebut (Singh & Bath, 1997). Menurut Capuano & Fogliano (2011) serta Yucel & Sultanoglu (2013), kadar HMF yang tinggi dalam madu dapat menjadi indikasi pemalsuan, khususnya akibat penambahan sirup invert. HMF dapat terbentuk dengan memanaskan gula bersama asam untuk proses inversi sukrosa (Silva et al., 2016; Capuano et al., 2011; Yucel et al., 2013).

Pada konsentrasi tinggi, HMF dapat memengaruhi warna madu. Selain itu, kandungannya juga meningkat pada suhu tinggi selama penyimpanan. Oleh karena itu, HMF merupakan indikator yang efektif untuk mendeteksi pemalsuan madu dengan penambahan gula invert. Nilai HMF sebesar 200 mg/kg dianggap sebagai indikasi adanya pemalsuan madu menggunakan gula invert hasil hidrolisis asam, sedangkan nilai 500 mg/kg dianggap sebagai bukti konklusif pemalsuan madu (Kalabova et al., 2003).

Corbella & Cozzolino (2006) menyatakan bahwa HMF adalah sifat yang berguna dalam mendeteksi pemalsuan madu, karena pemalsuan dapat meningkatkan kandungan HMF dalam madu. Berkenaan dengan ini, Gebremariam & Brhane (2014) telah

membahas penilaian tingkat pemalsuan pada produk makanan, termasuk madu, yang menunjukkan bahwa madu yang diambil dari pasar lokal memiliki kadar air dan HMF yang lebih tinggi dari tingkat yang disarankan. Hal ini mengindikasikan adanya pemalsuan dan perlakuan panas, sedangkan madu murni yang dibeli langsung dari peternak lebah atau petani rumah tangga memenuhi standar nasional dan internasional, serta berkualitas baik. Dengan demikian, peningkatan kadar HMF dan kadar air pada madu dapat menjadi indikasi pemalsuan.

Doner (1977) melaporkan bahwa kadar HMF pada madu segar biasanya sangat rendah, namun meningkat seiring dengan penambahan gula invert. Menurut Abdel-Aal et al. (1993), peningkatan kadar HMF dapat dijadikan sebagai uji yang sederhana dan cepat untuk mendeteksi tingkat pemalsuan madu. Selain pemalsuan, faktor lain yang turut memengaruhi peningkatan kadar HMF adalah penyimpanan. Madu dengan kadar HMF rendah menunjukkan bahwa kadar gula pada madu tersebut tidak terpengaruh oleh proses penyimpanan (Lawal et al., 2009).

Fenomena ini oleh Samat et al. (2018) telah diinformasikan bahwa kadar HMF pada madu yang dipalsukan secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan madu murni, bahkan melebihi batas yang ditetapkan oleh Codex. Batas HMF yang diterima oleh Codex bervariasi, yaitu 0 mg/kg untuk madu segar yang baru dipanen, 40 mg/kg untuk madu dari iklim sedang, dan 80 mg/kg untuk madu tropis. Namun, proses pembentukan HMF dapat dipercepat dengan penambahan gula komersial dan pemanasan, yang merupakan praktik umum dalam produksi madu palsu. Oleh karena itu, madu murni umumnya menunjukkan kadar HMF yang lebih rendah dibandingkan dengan madu yang dipalsukan, karena penambahan bahan pemalsu atau agen lainnya akan meningkatkan kadar HMF.

11.3.6. Efek pemalsuan pada Enzim (diastase, invertase)

Angka diastase merupakan salah satu kriteria yang sangat penting untuk mendeteksi pemalsuan madu, serta untuk memastikan apakah madu tersebut mengalami perlakuan panas yang tidak sesuai atau disimpan dalam kondisi yang tidak tepat. Jika madu dicampur dengan gula atau sirup jagung fruktosa tinggi, atau bahan pengencer lainnya, angka diastase yang rendah dapat dinaikkan kembali dengan

penambahan amilase asing. Enzim-enzim yang terdapat dalam madu, seperti diastase, berfungsi sebagai indikator yang penting dalam pengendalian mutu madu. Aktivitas enzim invertase atau diastase sering digunakan untuk mengetahui apakah madu telah mengalami kerusakan akibat pemanasan.

Batasan aktivitas enzimatik diastase telah ditetapkan oleh badan standar Ethiopia dan regulasi Uni Eropa (UE). Aktivitas enzimatik ini mencerminkan proses konversi nektar menjadi madu selama proses pematangan. Aktivitas enzim dalam madu dapat sangat bervariasi tergantung pada asal botani madu tersebut, meskipun enzim tersebut umumnya ditambahkan oleh lebah. Oleh karena itu, penting untuk mengumpulkan madu dan nektar selama proses pematangan madu, kemudian mempelajari aktivitas enzim dengan memperhatikan sumber bunga asalnya (Zabrodska & Vorlova, 2014).

Aktivitas diastase oleh Abdel-Aal et al. (1993), ditemukan bahwa angka aktivitas diastatik cenderung menurun secara bertahap seiring dengan meningkatnya persentase pengotor HFCS (*High Fructose Corn Syrup*) yang digunakan untuk memalsukan madu, dengan menggunakan konsentrasi HFCS yang berbeda. Invertase, yang berfungsi untuk mengubah sukrosa dalam madu murni menjadi fruktosa dan glukosa, akan terdegradasi oleh panas selama proses pemrosesan madu. Akibatnya, madu yang dipalsukan akan mengandung sukrosa yang berlebih dan fruktosa yang lebih rendah, hal ini disebabkan oleh hilangnya aktivitas enzim invertase (Lawal et al., 2009)

11.3.7. Efek pemalsuan pada prolin

Menurut *Codex Alimentarius* dan Uni Eropa, kandungan prolin pada madu yang berkualitas baik dan dapat diterima adalah 180 mg per kg madu (Bogdanov, 2009). Beberapa peneliti menggunakan prolin sebagai salah satu kriteria untuk menilai kualitas dan kematangan madu, serta sebagai indikator pemalsuan madu dengan menggunakan gula tambahan, terutama apabila kandungan asam amino ini secara signifikan lebih rendah dari 180 mg/kg, yang merupakan nilai minimum yang telah disepakati untuk madu asli (Bogdanov et al., 1999). Oleh karena itu, penentuan kandungan prolin pada madu menjadi salah satu cara untuk mengidentifikasi pemalsuan

madu, baik yang mengandung zat asing maupun hasil panen madu yang belum matang.

11.4. Efek pada sifat reologi

Pemalsuan madu dapat memengaruhi perilaku reologi, baik viskometrik maupun dinamis. Hal ini disebabkan oleh perubahan komposisi madu, yang sebagian besar terdiri dari gula seperti fruktosa dan glukosa. Pemalsuan akan mengubah profil komposisi tersebut, yang pada gilirannya memengaruhi viskositas dan sifat reologinya. Sejumlah upaya telah dilakukan untuk mempelajari reologi madu, dengan tujuan untuk menentukan asal botani madu, pengaruh suhu terhadap sifatnya, dan berbagai faktor lainnya. Penggunaan parameter reologi yang dikombinasikan dengan parameter lain telah terbukti sebagai metode yang efektif untuk mengidentifikasi persentase pemalsuan dalam madu (Kamboj & Mishra, 2015).

11.4.1. Viskositas

Madu merupakan cairan kental yang bersifat nonelastis dan memiliki perilaku yang mirip dengan cairan pada umumnya. Ketahanan madu terhadap deformasi pada madu palsu cenderung lebih rendah dibandingkan dengan madu asli. Oleh karena itu, ketahanan total terhadap deformasi dapat dijadikan sebagai indikator yang efektif untuk mendeteksi adanya zat pengotor dalam madu. Sebagaimana yang dilaporkan oleh Yilmaz et al. (2014), penambahan sirup sukrosa dan fruktosa ke dalam madu alami mengakibatkan penurunan viskositas madu, dan penurunan tersebut semakin signifikan seiring dengan peningkatan konsentrasi zat pengotor. Selain itu, mereka juga menyatakan bahwa tegangan geser madu palsu berkurang seiring dengan meningkatnya kandungan bahan pemalsu, yang pada akhirnya menyebabkan penurunan viskositas madu. Berkenaan dengan hal tersebut, Yilmaz et al. (2014) menyimpulkan bahwa perubahan perilaku *creep*, aliran, dan viskoelastis madu murni dapat digunakan untuk mendeteksi pemalsuan madu.

Penambahan sirup pada madu juga terbukti dapat menurunkan nilai viskositas, stabilitas penyimpanan, dan modulus kehilangan pada madu kontrol. Temuan ini menunjukkan bahwa analisis *creep* yang stabil dan dinamis dapat dijadikan alat baru untuk mendeteksi pemalsuan madu yang disebabkan oleh penambahan sirup fruktosa dan sukrosa (Yilmaz et al., 2014). Madu yang baru diekstraksi

memiliki viskositas yang bergantung pada berbagai zat yang terkandung di dalamnya, dan karenanya viskositasnya bervariasi sesuai dengan komposisinya, terutama kadar airnya.

El-Biale & Sorour (2011) menunjukkan bahwa penambahan berbagai konsentrasi molase menyebabkan viskositas madu menurun seiring dengan meningkatnya laju geser, menandakan perilaku pengenceran geser. Sebaliknya, viskositas madu murni cenderung stabil, yang mengindikasikan sifat Newtonian. Selain itu, Da Costa et al. (2002) menemukan bahwa penambahan ekstrak propolis pada madu murni dapat menurunkan viskositasnya. Sementara itu, Kamboj & Mishra (2015) melaporkan bahwa penurunan kadar air akibat pemalsuan madu menyebabkan peningkatan viskositas.

Madu murni, yang memiliki viskositas tinggi, menunjukkan bahwa viskositas rendah pada madu umumnya mengindikasikan kadar air yang tinggi atau pengenceran yang signifikan (Ramirez-Cervantes et al., 2000). Oleh karena itu, pemalsuan madu cenderung menurunkan viskositas dan pada akhirnya akan mengurangi aliran produk tersebut.

11.4.2. Kepadatan

Kepadatan madu dipengaruhi oleh kadar airnya. El-Biale & Sorour (2011) melaporkan bahwa madu murni memiliki kepadatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan madu yang telah dipalsukan. Mereka juga menjelaskan bahwa pemalsuan madu murni dengan penambahan konsentrasi pati, molase, dan air suling yang berbeda akan menyebabkan penurunan kepadatan seiring dengan meningkatnya kadar pati yang ditambahkan. Tren serupa juga ditemukan pada madu yang dipalsukan dengan penambahan glukosa dan air suling, meskipun pada pemalsuan dengan molase, nilai kepadatan justru meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi molase yang ditambahkan. Secara keseluruhan, madu murni memiliki kepadatan yang lebih tinggi dibandingkan madu yang dipalsukan, kecuali pada pemalsuan yang menggunakan molase.

11.4.3. Tegangan permukaan

El-Biale & Sorour (2011) mengemukakan bahwa tegangan permukaan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi pati, glukosa, molase, dan air suling. Sementara itu, nilai tegangan geser dan

viskositas yang stabil cenderung menurun seiring dengan peningkatan tingkat pemalsuan (Yilmaz et al., 2014). Tegangan permukaan madu dipengaruhi oleh kadar airnya, dan akan meningkat seiring dengan penambahan pengotor. Penurunan viskositas pada sampel yang dipalsukan dapat menjelaskan fenomena ini, sebagaimana dijelaskan dalam percobaan yang dilakukan oleh Rehman et al. (2008).

11.5. Efek pada sifat gizi

Pemalsuan madu merupakan masalah yang sering terjadi dan dapat mengakibatkan penurunan nilai gizi serta nilai medis madu itu sendiri. Menurut Lawal et al. (2009), sebagian besar madu yang beredar di pasaran sebenarnya adalah sukrosa karamel yang tidak mengandung nilai gizi apapun. Hal ini disebabkan oleh bahan pemalsu yang tidak memiliki kandungan gizi seperti madu asli, sehingga konsumen kehilangan manfaat gizi yang seharusnya diperoleh dari madu. Beberapa sumber juga menyebutkan bahwa pemalsuan madu dapat menurunkan kandungan protein yang terdapat dalam madu. Madu yang dipalsukan, dipanaskan terlalu lama, atau disimpan dalam jangka waktu yang lama cenderung menunjukkan penurunan atau bahkan tidak mengandung protein sama sekali (Almeida et al., 2013).

Abdel et al. (1993) mengungkapkan adanya variasi kandungan nitrogen antara madu murni, madu yang dipalsukan, dan HFCS (*High Fructose Corn Syrup*) murni. Kandungan nitrogen madu murni tercatat sekitar 0,6%, sedangkan pada madu yang dipalsukan dengan campuran 50% madu hanya sebesar 0,3%, dan pada HFCS murni hanya sekitar 0,1%. Para peneliti ini juga menemukan bahwa madu murni memiliki kandungan nitrogen, prolin, kalium, dan natrium yang lebih tinggi dibandingkan dengan madu yang dipalsukan (Abdel-Aal et al., 1993). Nisbet et al. (2018) menunjukkan bahwa kandungan protein madu dapat dijadikan indikator yang andal untuk mendeteksi madu yang dipalsukan dengan penambahan gula hingga 30%. Semua jenis madu mengandung asam amino dalam jumlah 50–300 mg/kg, dengan prolin sebagai asam amino yang paling melimpah, menyumbang sekitar 50–85% dari total asam amino. Secara khusus, rasio konsentrasi prolin (dengan nilai minimum 180 mg/kg) dapat digunakan untuk membedakan antara madu asli dan madu yang dipalsukan (Da Silva et al., 2016; Cotte et al., 2007). Dalam hal ini,

kandungan prolin dapat dijadikan indikator yang lebih akurat dibandingkan kandungan protein untuk membedakan madu asli dan madu palsu, menurut Nisbet et al. (2018).

Informasi lain juga menunjukkan bahwa kadar prolin, kandungan fenolik total, aktivitas antioksidan, serta konsentrasi mineral seperti kalium, kalsium, magnesium, dan fosfat memiliki potensi untuk membedakan madu murni dari madu yang dipalsukan. Hal ini dikarenakan proses pemalsuan dapat menyebabkan penurunan nilai gizi madu. Meskipun penentuan satu parameter tunggal tidak dapat diandalkan untuk mendeteksi pemalsuan madu, analisis profil komponen-komponen tertentu dalam madu mungkin lebih tepat untuk tujuan ini. Mengingat madu mengandung banyak zat aktif biologis, pemalsuan dapat menghilangkan beberapa komponen fungsional tersebut melalui reaksi kimia dengan bahan pemalsu yang ditambahkan. Oleh karena itu, konsumsi madu yang dipalsukan dapat membahayakan kesehatan manusia.

BAB XII

DETEKSI MADU PALSU DENGAN TEKNIK *DNA* *BARCODING*

12.1. Pengantar

Madu adalah zat manis alami yang dihasilkan oleh lebah madu, dan telah digunakan secara luas sebagai produk pangan serta pemanis alami. Karakteristik madu sangat bervariasi, tergantung pada asal botani sumber nektar yang dikumpulkan oleh lebah, yang juga dipengaruhi oleh lokasi geografis pemeliharaan lebah dan musim panen. Faktor-faktor ini menghasilkan madu dengan rasa, warna, dan komposisi yang berbeda-beda (Lazarević et al., 2017). Secara global, konsumsi madu mengalami peningkatan yang signifikan, tidak hanya sebagai dampak dari pertumbuhan populasi dunia, tetapi juga karena meningkatnya preferensi terhadap produk pangan alami yang lebih sehat. Hal ini mendorong terjadinya lonjakan dalam perdagangan madu internasional (García, 2018). Sebagai contoh, di Inggris pada tahun 2023, lebih dari 50.000 ton madu diimpor untuk melengkapi produksi lokal yang terbatas, guna memenuhi permintaan konsumen yang terus meningkat (HMRC, 2023).

Namun, seperti halnya produk pangan bernilai tinggi lainnya, madu juga rentan terhadap penipuan makanan. Kekhawatiran terkait keaslian produk ini memicu penyelidikan di Uni Eropa pada tahun 2016, yang mengungkapkan bahwa 14,2% dari madu (n = 893) yang diuji untuk pemalsuan gula C4 dicurigai tidak memenuhi kriteria yang ditetapkan dalam arahan Madu Uni Eropa 2001/110/EC (Aries et al., 2016; EU, 2002). Mengejutkannya, data terbaru dari Uni Eropa pada tahun 2023 menunjukkan bahwa 46% madu yang diimpor ke Uni Eropa (n = 320) dan diuji untuk penanda pemalsuan gula juga dicurigai tidak memenuhi persyaratan, yang menunjukkan bahwa pemalsuan madu menjadi masalah yang semakin memprihatinkan (Ždiniaková et al., 2023). Penting untuk dicatat bahwa peningkatan ketidakpatuhan yang diamati didasarkan pada serangkaian pengujian yang sangat interpretatif, selain metode deteksi gula C4 tradisional.

Secara komposisi, madu sebagian besar terdiri dari berbagai bentuk gula, seperti fruktosa, glukosa, maltosa, dan sukrosa, namun juga mengandung komponen minor lainnya seperti vitamin, mineral

esensial, asam amino, protein, dan senyawa fenolik. Komponen-komponen ini memberikan dampak positif terhadap nilai gizi dan ekonomi madu (da Silva et al., 2016). Sebaliknya, sirup gula yang berasal dari tanaman diperoleh dengan mengolah sari buah atau memodifikasi pati melalui perlakuan panas, enzim, atau asam (Fakhlaei et al., 2020; Güler et al., 2014). Meskipun sirup gula ini umumnya memiliki nilai ekonomi dan gizi yang lebih rendah dibandingkan madu, ia memiliki tampilan dan rasa manis yang serupa, sehingga sering digunakan untuk memalsukan madu demi keuntungan ekonomi. Pemalsuan ini berimbas pada perubahan rasa, komposisi kimia, dan sifat gizi madu, menghasilkan produk dengan kualitas yang lebih rendah (Soares et al., 2017b). Sirup yang sering digunakan untuk pemalsuan ini antara lain berasal dari jagung, tebu, bit gula, beras, dan gandum, tergantung pada ketersediaan di pasar (Trifković et al., 2017). Pemalsuan juga bisa terjadi secara tidak langsung melalui pemberian makan lebah yang tidak etis dengan menggunakan sirup gula selama aliran nektar, guna meningkatkan hasil panen (Stefas et al., 2022).

Metode tradisional untuk mendeteksi pemalsuan gula dalam madu bergantung pada analisis komposisi gula menggunakan teknik seperti kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Undang-undang Madu Inggris (*Honey (England) Regulations*, 2015) dan *Standar Codex* 12-1981 untuk madu (*Codex Alimentarius*, 1981) menetapkan jumlah minimum fruktosa dan glukosa dalam madu (tidak kurang dari 60 g/100 g), serta kadar maksimum sukrosa (tidak lebih dari 5 g/100 g). Adapun beberapa jenis madu tertentu, seperti embun madu, lavender, *borage*, dan *Citrus* spp., diperbolehkan memiliki penyimpangan tertentu karena perbedaan alami dalam komposisi gula sumber nektar mereka. Namun, karena beberapa sirup gula memiliki komposisi yang mirip dengan nektar yang dikonsumsi lebah, diperlukan teknik yang lebih canggih untuk mendeteksi pemalsuan gula dalam madu. Metodologi modern untuk mendeteksi gula eksogen dalam madu sebagian besar didasarkan pada analisis rasio isotop karbon stabil (SCIRA), yang berfokus pada identifikasi keberadaan tanaman C4 yang menjadi pengotor dengan menilai rasio isotop $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (White, 1992). Hal ini berdasarkan fakta bahwa madu harus hampir seluruhnya berasal dari tanaman dengan jalur fotosintesis C3 (siklus Calvin), sedangkan tanaman seperti jagung dan tebu memiliki

jalur fotosintesis C4 (*Hatch-Slack*) (Tosun, 2013). Tanaman C4 memiliki nilai ^{13}C yang lebih tinggi, yang akan terdeteksi jika madu dipalsukan dengan sirup jagung atau tebu (Tosun, 2013). Namun, untuk sirup yang berasal dari tanaman C3, seperti beras dan bit gula, metode SCIRA tidak cocok, sehingga diperlukan teknik alternatif. Data teknis Uni Eropa tahun 2023 menunjukkan bahwa metode SCIRA (metode AOAC 991.41) tidak efektif dalam mendeteksi madu yang dicurigai tidak memenuhi persyaratan, yang mengindikasikan bahwa sirup gula dari jagung atau tebu tidak lagi digunakan untuk memalsukan madu yang diimpor ke Eropa (Ždiniaková et al., 2023).

Metode alternatif yang digunakan untuk mendeteksi pemalsuan gula meliputi penilaian komposisi kimia madu dengan mencari penanda spesifik seperti mannosa, difruktosa anhidrat (DFA), dan 2-Asetilfuran-3-glukopiranosida (AFGP) (Misslera et al., 2016; Montilla et al., 2006; Xue et al., 2013), penerapan karakterisasi gula (Cordella et al., 2005; Morales et al., 2008), atau pembuatan profil madu menggunakan resonansi magnetik nuklir (NMR) (Rhee et al., 2023; Spiteri et al., 2015). Namun, metode-metode ini kemungkinan besar akan terpengaruh oleh variasi besar dalam komposisi fisik dan kimia jenis madu alami yang berasal dari sumber yang berbeda, yang dapat menghasilkan hasil yang tidak dapat diandalkan atau salah ditafsirkan (Soares et al., 2017b). Oleh karena itu, perlu adanya basis data yang luas dan valid untuk secara akurat mewakili sidik jari dari berbagai jenis madu dan campuran umumnya, yang merupakan tantangan besar. Metode berbasis DNA telah banyak digunakan untuk autentikasi makanan guna mengidentifikasi keberadaan spesies tanaman dalam berbagai produk makanan atau bahan mentah (Madesis et al., 2014). Dalam madu, terdapat berbagai sumber asam nukleat, termasuk DNA tanaman dari nektar bunga, DNA mikroba, serta DNA hewan yang berasal dari lebah madu (Wirta et al., 2021). Meskipun sebagian besar metodologi berbasis DNA difokuskan pada autentikasi botani madu (Laube et al., 2010; Lopes et al., 2023; McDonald et al., 2018; Soares et al., 2018; Wu et al., 2017b), juga telah ditemukan bahwa DNA tanaman dari sirup gula dapat berhasil diidentifikasi dalam madu yang dicampur dengan molase beras atau jagung (Sobrinho-Gregorio et al., 2019; Truong et al., 2022). Namun, teknik ini belum banyak diuji pada berbagai jenis sirup dan madu atau diterapkan pada bahan pengotor sirup gula lainnya. Oleh karena itu,

sangat penting untuk menilai keandalan metode-metode ini dalam situasi kehidupan nyata, di mana berbagai bahan pengotor sirup dapat digunakan pada semua jenis madu.

12.2. Spesifikasi Madu dan Data Identifikasi

Tabel 12.1. Spesifikasi madu yang digunakan (Dodd et al., 2025)

Kode Madu	Deskripsi Madu	Makanan Lebah ^a	musim	Area
H01	Woodland	Pohon-pohon hutan dan Bunga di sekitarnya, <i>hippocastanum</i>) dan Kastanye manis (<i>Castanea sativa</i>).	Panas	Yorkshire
H02	Sycamore	Dominasi oleh <i>Acer pseudoplatanus</i> dengan sedikit hawthorn <i>monogyna</i>) dan kacang (Fabaceae)	Semi	Yorkshire
H03	Phacelia	<i>Phacelia tanacetifolia</i>	semi	Yorkshire
H04	Ivy	<i>Hedera helix</i>	gugur	Yorkshire
H05	Himalayan Balsam	<i>Impatiens glandulifera</i>	gugur	Yorkshire
H06	spring set	Campuran bunga musim semi yang dibudidayakan dan liar	semi	Yorkshire
H07	Borage	<i>Borago officinalis</i>	panas	Warwickshire
H08	Buckwheat	<i>Fagopyrum esculentum</i>	gugur	Yorkshire
H09	Meadowfoam	<i>Limnanthes alba</i>	panas	Warwickshire
H10	sea lavender	<i>Limonium vulgare</i>	panas	Norfolk
H11	heather	<i>Calluna vulgaris</i>	gugur	Exmoor
H12	echium	<i>Echium plantagineum</i>	panas	Warwickshire
H13	field dan Forest	Campuran padang rumput, hutan dan alam liar	campuran	Yorkshire
H14	Hedgerow	Bunga padang rumput, campuran bunga dari pagar tanaman, padang rumput, dan lahan pertanian	campuran	Norfolk
H15	English Blossom	Campuran bunga musim semi dan musim panas	campuran	Yorkshire
H16	apple blossom	<i>Malus domestica</i>	semi	Norfolk
H17	Wildflower	Campuran bungan liar musim panas	panas	Warwickshire
CH1	Wildflower	Campuran bunga liar musim panas dan semak berduri	panas	Oxfordshire
CH2	Heather	Heather dari perbukitan dan pedesaan Skotlandia	gugur	Scotland
CH3	Heather	Heather dari Scottish Moors	gugur	Scotland
CH4	Borage	<i>Borago officinalis</i>	semi	England

^a Seperti yang dijelaskan oleh produsen madu atau ditafsirkan dari label produk.

Tabel 12.2. Gula sirup dan informasi bahan sebagai kontrol (Dodd et al., 2025)

Bahan Kontrol	Deskripsi	Spesies tanaman	Negara produksi
C1	sirup jagung	Jagung	Korea
C2	sirup jagung	Jagung	Italia
C3	sirup jagung	Jagung	Korea
C4 ^b	tepung jagung	Jagung	NK ^a
R1	sirup beras	Beras	Spanyol
R2	sirup beras	Beras	Spanyol
R3	sirup beras	Beras	Korea
R4	sirup beras	Beras	Korea
R5 ^b	sirup beras	Beras	NK ^a
R6	sirup beras	Beras	Jerman
R7	sirup beras	Beras	Non-EU
S1	sirup gula	NK ^a	Korea
S2	sirup gula	NK ^a	Korea
B1	molase bit gula	bit gula	Jerman
B2	sirup pakan lebah	bit gula	Jerman
B3 ^b	gula pasir	bit gula	Inggris
B4 ^b	sirup gula	bit gula	Inggris
B5	sirup jernih	bit gula	Swedia
B6	sirup <i>golden</i>	bit gula	Inggris
B7	sirup <i>dark</i>	bit gula dan tebu	Swedia

^a NK = *Not known*.

^b Bahan Kontrol

Tabel 12.3. Informasi Senyawa Primer Sekuens DNA (Dodd et al., 2025)

Spesies target	Gen target	Nama	Sekuens 5'-3'	Panjang amplikon (bp)
tanaman	tRNA-Leu (trnL) P6 loop (Taberlet et al., 2007)	<i>trnL_P6_f</i>	GGGCAATCCTGAGCCAA	10 – 144
		<i>trnL_P6_r</i>	CCATTGAGTCTCTGCACCTATC	
beras (<i>Oryza sativa</i>)	phospholipaseD1 (PLD1) (JRC, 2006)	<i>rice_PLD1_f</i>	TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT	68
		<i>rice_PLD1_r</i>	CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC	
	cytosinemethyltransferase Zmet3	<i>rice_Zmet3_f</i>	CCCGGCCCTAAGGAACATAG	210
		<i>rice_Zmet3_r</i>	CAGCAACCAAAGCACCTGAC	
	region of chloroplast	<i>rice_cp_f</i>	TTACACCGCACACCCTG	99
		<i>rice_cp_r</i>	AGACCCGTTTCCTTTTGGTATC	
	26S rRNA	<i>rice_rrn26_f</i>	TTTGGCGACCAGCAAACCTCT	54
		<i>rice_rrn26_r</i>	TCATCCCTTGCTTCAAACTAC	
Jagung (<i>Zea mays</i>)	<i>formin-like protein 7</i> (LOC103635325)	<i>corn_PERK2_f</i>	TCTATAAGCTTTGATTCCAGGG	275

	(Truong et al., 2022)	<i>corn_PERK2_r</i>	TTGCTCTCCGAAATGACACTAT	
	tRNA-Leu (trnL)	<i>corn_trnL_f</i>	ACTACCCCTCCCCATTTCTCT	108
		<i>corn_trnL_r</i>	CCCTTTCTTGTGCATCATCTTA	
	26S rRNA	<i>corn_rrn26_f</i>	TCTTTGGCGACCAGCAAAGC	66
		<i>corn_rrn26_r</i>	CTCATCCCTTGCTTCAAAACGA A	
Gula bit (<i>Beta vulgaris</i> subs p. <i>vulgaris</i> var. <i>altissima</i>)	<i>adenylate transporter (ant)</i> (Chaouachi et al., 2013)	<i>beet_ant_f</i>	CAGTATATTTTAGTCAATTCCA AG	135
		<i>beet_ant_r</i>	ACATTTTCTGTCTGGTCTACTA CC	
	<i>unknown region</i>	<i>beet01_f</i>	GCCCCCAAAAACCCCTTCA	116
		<i>beet01_r</i>	GGGCAATTTGGTAGGCTTCTT	
		<i>beet02_f</i>	ATCCCTGCAGCCATCAGTGA	121
		<i>beet02_r</i>	ACCAGTAAGCCACTCAACAGTC AA	
	<i>maturase K (matK)</i>	<i>beet_matk_f</i>	CCCAGACCGACTTACTAACG	76
		<i>beet_matk_r</i>	ATTCTCTGTGGTGGATCCTTG	
	<i>open readingframe 409 (orf409)</i>	<i>beet_orf409_f</i>	GATCTTCCCAACCCATATGGA	56
		<i>beet_orf409_r</i>	GGCGAATAAAGTCCGACAGTA	

12.3. Analisa Data

12.3.1. Amplifikasi dan spesifisitas primer

Reaksi PCR dilakukan untuk ke-13 pasangan primer, yang mengamplifikasi daerah nDNA, mtDNA, atau cpDNA dari ekstrak DNA beras, jagung, dan bit gula (Tabel 12.4). Penanda kontrol positif tanaman (trnL_P6) berhasil diamplifikasi pada ketiga ekstrak tanaman tersebut. Untuk penanda beras, PLD_1 berhasil diamplifikasi pada ekstrak beras maupun jagung, sementara Zmet3, cp, dan rrn26 hanya spesifik untuk ekstrak beras. Ketiga penanda untuk jagung bersifat spesifik untuk spesies jagung. Pada ekstrak bit gula, penanda semut gagal diamplifikasi, sementara penanda 01, 02, matk, dan orf409 hanya berhasil diamplifikasi pada ekstrak bit gula. Keberhasilan amplifikasi penanda-penanda tersebut selanjutnya dibandingkan menggunakan qPCR, di mana nilai Cq yang lebih rendah menunjukkan jumlah target yang lebih tinggi terdapat dalam bahan (Tabel 12.5).

12.3.2. Ekstraksi DNA dari sirup gula

12.3.2.1. Amplifikasi penanda tanaman umum

Dua kit DNA, yaitu *QIAGEN DNeasy Plant Pro* dan *Macherey-Nagel Nucleospin Food Kit*, digunakan untuk mengekstraksi DNA tanaman dari sirup gula. Efisiensi ekstraksi DNA dievaluasi dengan cara menilai amplifikasi loop trnL P6 kloroplas melalui qPCR, yang bertujuan untuk mengevaluasi hasil ekstraksi DNA tanaman. Pada kedua kit tersebut, proses ekstraksi DNA berhasil, dengan penanda trnL_P6 menunjukkan amplifikasi di atas 32 siklus pada semua bahan, yang merupakan hasil yang signifikan mengingat matriks bahan yang sulit. Secara umum, nilai Cq pada *kit Nucleospin Food* lebih rendah dibandingkan dengan *kit DNeasy Plant Pro*, yang menunjukkan bahwa *kit Nucleospin Food* menghasilkan DNA tanaman yang lebih tinggi serta memiliki kapasitas ekstraksi yang lebih efisien. Senyawa C4 dan B4-7 tidak berhasil diekstraksi menggunakan *kit DNeasy Plant Pro*, sehingga senyawa-senyawa tersebut tidak disertakan dalam analisis ini. Selanjutnya, *kit Nucleospin Food* digunakan untuk ekstraksi lebih lanjut.

Hasil ini mengonfirmasi bahwa gen *rice_PLD1* teramplifikasi pada beras dan jagung, dengan bit gula juga menunjukkan amplifikasi *rice_PLD1* setelah 35 siklus, yang menjelaskan mengapa amplifikasi ini tidak terdeteksi pada PCR. Selanjutnya, penanda *corn_trnL* hanya menunjukkan amplifikasi terbatas pada beras (Cq 36,60), sedangkan *rice_cp* menunjukkan amplifikasi rendah pada ekstrak jagung dan bit gula (Cq 38,42 dan 38,59). Semua penanda lainnya hanya diamplifikasi pada spesies yang diinginkan, kecuali penanda *beet_ant* yang gagal diamplifikasi.

Secara umum, penanda spesifik yang menargetkan gen inti (nDNA) menghasilkan nilai Cq yang lebih tinggi untuk spesies target (Cq 22,30–25,64), sedangkan penanda mitokondria (mtDNA) menghasilkan nilai Cq yang lebih rendah (18,46–19,17), dan penanda kloroplas (cpDNA) menghasilkan nilai Cq terendah, yaitu antara 14,43 dan 16,48 untuk spesies target. Namun, penanda kloroplas untuk padi dan jagung menunjukkan spesifisitas yang lebih rendah, yang menunjukkan bahwa penanda mitokondria mungkin menjadi pilihan yang lebih baik dalam hal spesifisitas spesies.

Tabel 12.4. Komposisi gula madu, madu yang dicampur dengan sirup beras 10% (R1) dan sirup (Dodd et al., 2025)

Kode Sampel	Spike (%)	Fruktosa (g/100g)	Glukosa (g/100g)	Sukrosa (g/100g)	Maltosa (g/100g)	F + G (g/100g)
H01	0	36.18	29.00	0.99	2.14	65.18
	10	26.74	22.53	0.72	3.88	49.27
H02	0	38.37	30.80	1.41	0.58	69.17
	10	26.36	22.76	1.08	2.89	49.11
H03	0	38.96	31.76	1.84	2.16	70.72
	10	27.71	22.28	2.50	3.06	49.98
H04	0	33.35	38.18	0.59	1.90	71.53
	10	23.42	27.67	1.08	3.59	51.09
H05	0	37.92	28.75	0.91	0.98	66.67
	10	27.70	22.49	0.74	4.24	50.19
H06	0	38.10	35.58	0.68	0.75	73.68
	10	26.86	26.75	0.54	2.91	53.61
H07	0	37.26	31.24	4.86	2.75	68.49
	10	26.31	23.21	3.27	4.39	49.52
H08	0	35.09	35.32	1.37	0.21	70.42
	10	26.05	24.50	0.99	2.62	50.55
H09	0	37.87	35.19	0.50	1.70	73.06
	10	26.74	24.83	0.33	2.60	51.56
H10	0	34.11	26.43	0.55	1.73	60.54
	10	27.34	23.36	0.47	2.94	50.70
H11	0	33.51	23.29	1.23	0.52	56.80
	10	28.73	21.96	1.04	3.30	50.68
H12	0	32.93	26.33	0.77	1.78	59.26
	10	27.33	23.46	0.66	3.91	50.79
H13	0	33.53	26.10	0.65	0.67	59.64
	10	27.70	21.47	0.70	2.68	49.16
H14	0	33.02	26.44	1.13	0.80	59.46
	10	27.78	23.38	0.99	4.13	51.16
H15	0	41.61	33.92	0.96	1.95	75.54
	10	27.93	24.05	0.56	4.42	51.98
H16	0	38.74	31.93	1.50	0.33	70.66
	10	26.61	23.24	1.03	3.68	49.85
H17	0	40.81	32.00	4.15	3.41	72.81
	10	28.11	22.28	2.77	3.78	50.39
CH1	0	37.69	30.72	4.90	0.46	68.42
CH2	0	44.69	33.59	1.94	0.45	78.27
CH3	0	43.05	31.34	3.35	0.51	74.39
CH4	0	35.84	30.48	4.25	3.04	66.32
R1	0	1.49	22.49	0.22	31.90	23.99
R2	0	1.49	23.31	0.25	28.57	24.80
R3	0	1.68	17.34	0.85	42.59	19.02
R4	0	1.77	9.54	1.51	28.94	11.31
R5	0	1.65	9.76	0.50	12.39	11.41
R6	0	1.49	23.01	0.32	36.70	24.51
R7	0	1.79	26.90	0.62	37.14	28.69
R8	0	3.58	28.11	1.49	33.10	31.69
C1	0	1.49	0.82	0.75	41.16	2.31
C2	0	1.79	22.53	0.86	33.48	24.32
C3	0	1.49	1.56	1.93	50.86	3.05
S1	0	1.83	17.19	0.54	8.97	19.01
S2	0	5.12	23.24	18.95	0.30	28.36
B1	0	19.03	16.40	27.34	0.21	35.43
B2	0	39.71	31.03	7.92	0.30	70.74
B4	0	1.49	0.43	53.99	0.29	1.92
B5	0	24.74	24.37	31.52	0.27	49.11
B6	0	23.88	26.97	34.64	0.40	50.85
B7	0	24.13	23.67	31.64	0.28	47.80

12.3.2.2. Amplifikasi penanda spesifik tanaman

Berdasarkan hasil amplifikasi penanda spesifik, satu penanda dipilih untuk setiap spesies, yaitu **rice_rrn26** untuk beras, **corn_rrn26** untuk jagung, dan **beet_matk** untuk bit gula. Semua ekstrak DNA sirup kemudian dievaluasi untuk spesifisitas penanda menggunakan qPCR. Hasilnya, yang ditunjukkan pada Gambar 12.1, diskalakan ke amplifikasi DNA tanaman target sebesar 100%. Nilai Cq dan deviasi standar (SD) disajikan pada Tabel 12.4, yang juga mencakup hasil penanda tanaman **trnL_P6** sebagai perbandingan.

Seluruh sirup beras menunjukkan amplifikasi untuk penanda **rice_rrn26**, dengan nilai Cq yang berkisar antara 19,73 (pada R5) hingga 37,32 (pada R7). Amplifikasi yang rendah juga terdeteksi pada beberapa sirup gula lainnya (C1, C2, C3, S1, dan S2), meskipun dengan nilai Cq yang lebih tinggi, berkisar antara 35,33 hingga 37,59.

Penanda **corn_rrn26** diamplifikasi pada satu dari tiga sirup jagung (C2), sedangkan C4 digunakan sebagai kontrol. Amplifikasi untuk penanda ini juga terlihat pada R4 (Cq 37,11), R5 (Cq 31,58), S1 (Cq 37,28), dan B3 (Cq 35,94). Di sisi lain, penanda **beet_matK** tidak menunjukkan amplifikasi yang kuat selain ekstrak tanaman bit gula. Ekstrak sirup bit gula menunjukkan nilai Cq antara 33,44 dan 35,68 untuk penanda **beet_matK**, dengan tidak adanya amplifikasi pada B4, B5, dan B7. Nilai amplifikasi serupa juga terlihat pada sirup gula lainnya (Cq 33,48–36,69), yang mengarah pada kesimpulan bahwa amplifikasi tersebut kemungkinan tidak terkait dengan keberadaan DNA bit gula dalam bahan.

Oleh karena itu, tidak ada upaya lebih lanjut yang dilakukan dengan menggunakan penanda **beet_matK**. Ketiga penanda bit lainnya yang berhasil, yaitu **beet01**, **beet02**, dan **beet_orf409**, juga telah diuji dengan ekstrak sirup bit gula, namun tidak berhasil dilakukan amplifikasi).

Tabel 12.5. Amplifikasi penanda DNA pada kontrol tanaman padi, jagung dan bit gula menggunakan qPCR (Dodd et al., 2025)

Primer	Genom target	Amplifikasi (Cq)		
		Beras	Jagung	Gula bit
<i>trnL_P6</i>	cp	15.11	15.01	15.17
<i>rice_PLD1</i>	n	23.04	26.40	35.97
<i>rice_Zmet3</i>	n	22.30	a	a
<i>rice_cp</i>	cp	16.48	38.42	38.59
<i>rice_rrn26</i>	mt	18.88	a	a
<i>corn_PERK2</i>	n	a	25.64	a
<i>corn_trnL</i>	cp	36.60	14.43	a
<i>corn_rrn26</i>	mt	a	19.17	a
<i>beet_ant</i>	n	a	a	a
<i>beet01</i>	u	a	a	24.62
<i>beet02</i>	u	a	a	28.54
<i>beet_matk</i>	cp	a	a	15.45
<i>beet_orf409</i>	mt	a	a	18.46

^a Tidak teramplifikasi, cp: kloroplas, mt: mitokondria, n: nuklir, u: target tidak diketahui.

12.3.3. Deteksi penanda beras dan jagung pada madu yang dipalsukan

Untuk mereproduksi madu palsu, sirup beras jenis R1, R2, dan R4, serta sirup jagung jenis C2, dipilih untuk dicampurkan dengan madu alami jenis H17. Penanda yang berasal dari beras maupun jagung terdeteksi dalam madu yang dicampur dengan konsentrasi 1% (Gambar 12.1), dengan nilai Cq yang sebanding dengan persentase campuran. Namun, pada bahan yang menggunakan R1, terdapat anomali di mana campuran 5% menunjukkan nilai Cq yang lebih rendah (Cq 25,09) dibandingkan dengan campuran 30% (Cq 26,84) dan 10% (Cq 26,73). Untuk penanda beras dan jagung, amplifikasi terdeteksi pada madu murni (campuran 0%), namun nilai Cq yang dihasilkan jauh lebih tinggi dibandingkan dengan yang dicampur 1%. Perbedaan antara madu murni dan campuran 1% terendah, baik untuk penanda jagung (sekitar 5 siklus) maupun untuk penanda beras (antara 8 hingga 10 siklus), memungkinkan pemisahan yang jelas antara madu murni dan madu yang telah dicampur.

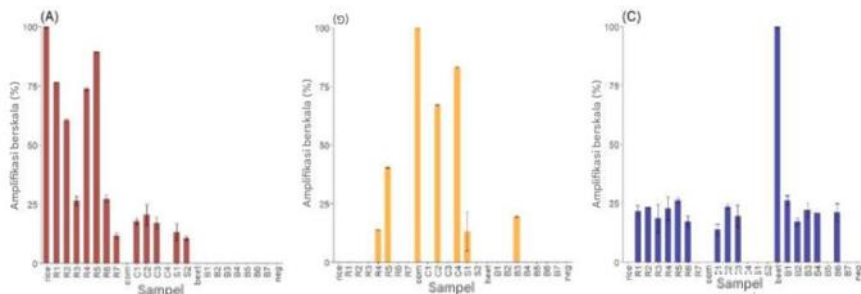
12.3.4. Amplifikasi penanda pada berbagai jenis madu

12.3.4.1. Amplifikasi asal-usul penanda beras dan jagung

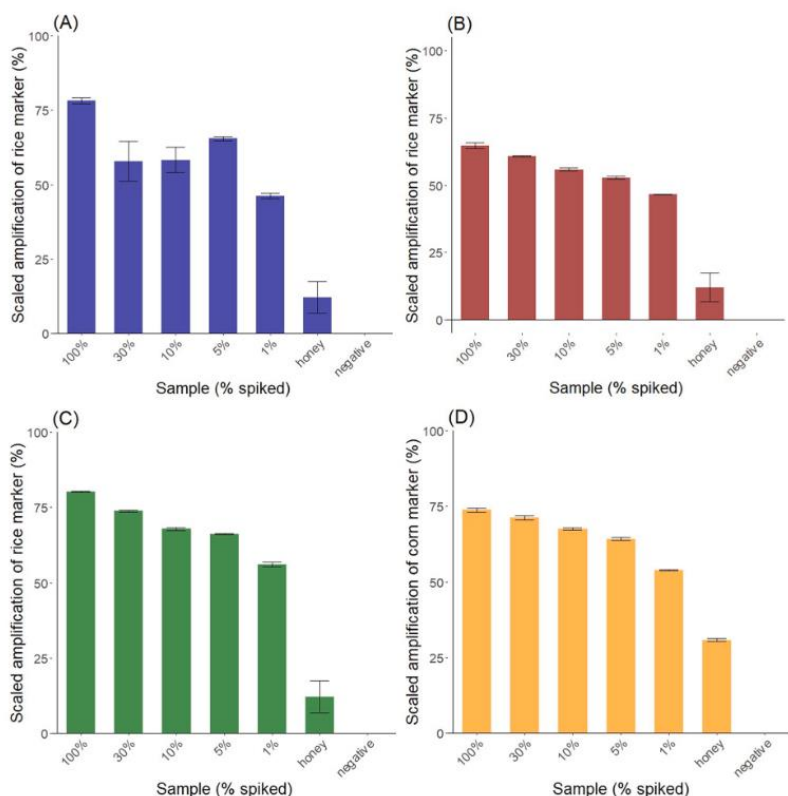
Untuk menganalisis amplifikasi latar belakang penanda beras dan jagung yang terdeteksi dalam madu alami, dilakukan uji amplifikasi pada 16 jenis madu yang berbeda guna menentukan nilai ambang batas untuk metode ini. Madu H15 dikeluarkan dari hasil

analisis karena tidak menunjukkan amplifikasi pada penanda trnL_P6, yang digunakan sebagai kontrol positif untuk DNA tanaman (Tabel 12.5). Penanda beras berhasil diamplifikasi pada 8 dari 16 madu, sementara penanda jagung berhasil diamplifikasi pada 10 dari 16 madu. Pada kedua penanda tersebut, madu soba (H8) menunjukkan amplifikasi terkuat dengan nilai Cq sebesar 35,89 untuk penanda *rice_rrn26* dan 32,67 untuk penanda *corn_rrn26* (Gambar 12.2). Penanda jagung menunjukkan tingkat amplifikasi yang lebih tinggi pada bahan yang menunjukkan amplifikasi.

Untuk memastikan bahwa pengujian ini tidak salah mengidentifikasi madu alami sebagai madu yang dipalsukan, nilai ambang batas ditetapkan untuk masing-masing penanda berdasarkan bahan uji dengan nilai Cq terendah, kemudian ditambahkan interval kepercayaan 95%. Untuk penanda beras, ambang batas yang ditetapkan adalah 34,27 siklus, sedangkan untuk penanda jagung adalah 31,27 siklus (Gambar 12.1).



Gambar 12.1. Perbandingan visualisasi amplifikasi penanda DNA (A) *rice_rrn26*, (B) *corn_rrn26* dan (C) *beet_matK* pada ekstrak tanaman dan sirup gula. Amplifikasi diskalakan di mana amplifikasi untuk tanaman target ditetapkan pada 100% dan batang galat mewakili deviasi standar dari tiga reaksi PCR (Dodd et al., 2025)



Gambar 12.2. Perbandingan visualisasi amplifikasi penanda DNA (A–C) *rice_rrn26* dan (D) *corn_rrn26* untuk madu yang dicampur dengan sirup beras (A) R1, (B) R2, (C) R4 dan sirup jagung (D) C2. Amplifikasi diskalakan di mana amplifikasi tanaman target ditetapkan pada 100% dan batang galat mewakili deviasi standar dari tiga reaksi PCR (Dodd et al., 2025).

12.3.4.2. Amplifikasi penanda beras dalam 5% madu campuran

Setiap jenis madu dicampur dengan sirup beras 5% R1 dan diuji untuk amplifikasi penanda *rice_rrn26* guna menentukan kesesuaian metode pengujian pada madu yang berbeda. Ekstrak yang tidak menunjukkan amplifikasi pada penanda *loop trnL P6* dari tanaman (H4, H10, dan H15) dikeluarkan dari analisis. Semua madu yang telah dicampur menunjukkan amplifikasi pada penanda *rice_rrn26* dengan nilai siklus lebih dari ambang batas 34,27 siklus (setara dengan 25,03% apabila diskalakan), seperti yang ditunjukkan pada Gambar 12.4.

12.3.4.3. Penerapan pada madu komersial

Madu komersial yang dipasarkan sebagai madu asal Inggris dibeli dari pasar Inggris dan diekstraksi menggunakan protokol yang telah dijelaskan sebelumnya. Ekstrak madu kemudian diuji untuk amplifikasi penanda *trnL_P6*, *rice_rrn26*, dan *corn_rrn26* (lihat Tabel 12.4). Tiga ekstrak madu komersial (CH₂ hingga CH₄) menunjukkan amplifikasi DNA tanaman yang baik berdasarkan penanda *trnL_P6* (Cq 19,16 hingga 23,97), sementara satu ekstrak madu komersial (CH₁) tidak menunjukkan amplifikasi penanda DNA tanaman. Dari tiga madu yang berhasil mengamplifikasi penanda tanaman, tidak ditemukan amplifikasi penanda *rice_rrn26*. Pada ketiga ekstrak madu tersebut, terdeteksi amplifikasi penanda *corn_rrn26* dengan nilai Cq rendah (Cq 35,67 hingga 38,47). Hasil ini serupa dengan hasil yang diperoleh dari madu asal Inggris lainnya.

12.3.5. Komposisi gula pada madu murni, madu campuran, dan madu komersial

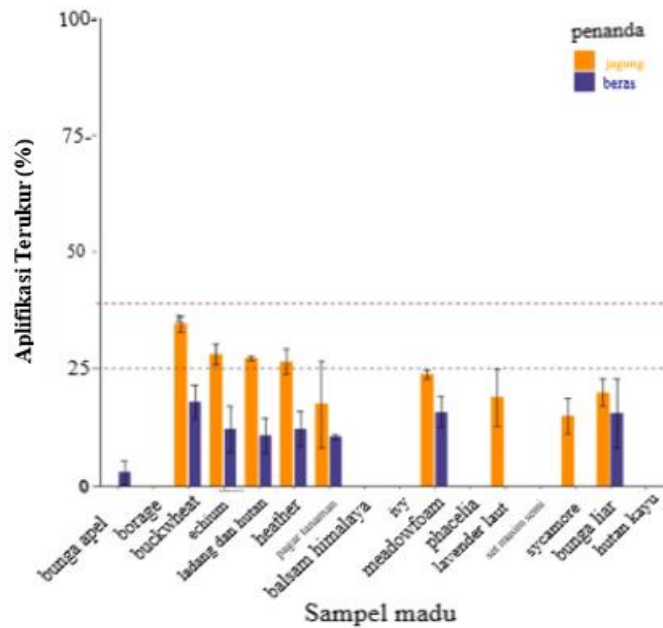
Setiap jenis sirup gula, madu murni, madu yang dicampur dengan R1 sebesar 10%, dan madu komersial telah dianalisis menggunakan HPLC-ELSD untuk mengukur kadar fruktosa, glukosa, sukrosa, dan maltosa dalam madu (Tabel 12.5). Berdasarkan hasil analisis tersebut dan dengan mempertimbangkan interval kepercayaan 95%, diketahui bahwa semua 17 madu murni dan 4 madu komersial berada di bawah batas maksimal sukrosa, yaitu 5 g/100 g. Bahkan untuk madu H07 dan CH₄, madu borage, yang memiliki batas sukrosa yang lebih tinggi, yaitu 15 g/100 g menurut peraturan (*Codex Alimentarius*, 1981; Peraturan Madu (Inggris), 2015), kadar sukrosanya juga masih di bawah batas tersebut.

Namun, ketika menilai kadar fruktosa dan glukosa, terdapat satu madu (H11) yang berada di bawah batas minimum 60 g/100 g, dengan nilai 56,79 g/100 g, yang berarti madu ini tidak memenuhi peraturan yang berlaku untuk madu. Semua madu komersial, di sisi lain, masih berada dalam batasan peraturan komposisi gula.

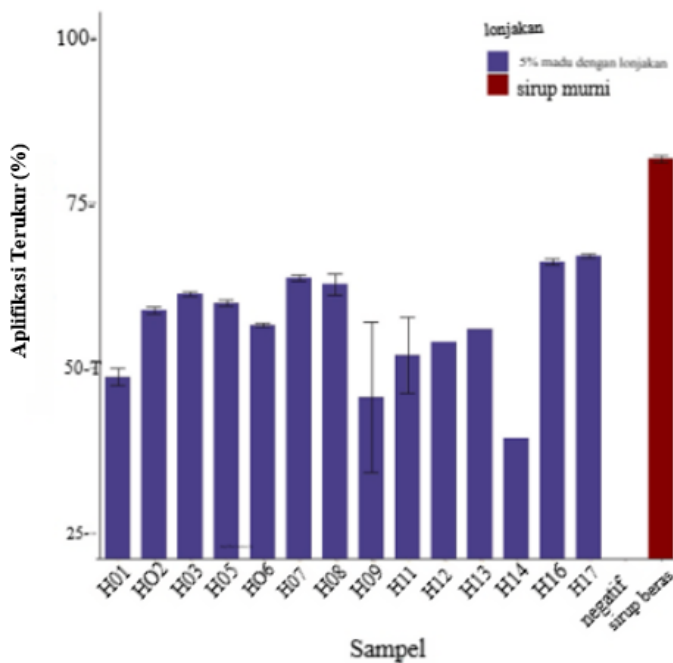
Analisis terhadap komposisi sirup beras yang digunakan untuk pencampuran (R1) menunjukkan bahwa sirup ini mengandung 1,49 g/100 g fruktosa, 22,49 g/100 g glukosa, 0,22 g/100 g sukrosa, dan 31,90 g/100 g maltosa, dengan total fruktosa-glukosa sebesar 23,99 g/100 g. Oleh karena itu, tidak mengherankan jika kadar sukrosa pada

madu yang dicampur dengan R1 tidak melebihi ambang batas yang ditetapkan, yaitu 5 g/100 g atau 15 g/100 g.

Pada seluruh 17 jenis madu yang dicampur dengan sirup beras, total kadar fruktosa dan glukosa berada di bawah batas ketentuan 60 g/100 g, dengan konsentrasi rata-rata 67,27 g/100 g sebelum pencampuran dan 50,57 g/100 g setelah pencampuran. Dengan demikian, madu yang terindikasi pemalsuan ini akan dianggap tidak memenuhi standar peraturan madu. Selain itu, konsentrasi maltosa pada madu yang dicampur dengan R1 meningkat secara signifikan jika dibandingkan dengan madu murni, dengan konsentrasi rata-rata masing-masing sebesar 1,43 g/100 g dan 3,47 g/100 g ($p < 0,01$).



Gambar 12.3. Visualisasi amplifikasi rice_rrn26 dan corn_rrn26 dalam madu alami. Ambang batas ditunjukkan sebagai garis putus-putus. Amplifikasi diskalakan di mana amplifikasi tanaman target ditetapkan pada 100% dan batang galat mewakili deviasi standar dari tiga reaksi PCR (Dodd et al., 2025)



Gambar 12.4. Perbandingan visualisasi amplifikasi rice_rrn26 dalam berbagai jenis madu yang dicampur dengan sirup beras 5% (R1), dan sirup beras murni (R1). Sumbu y dipotong untuk mewakili ambang batas beras (25,03%). Amplifikasi diskalakan di mana amplifikasi tanaman target ditetapkan pada 100% dan batang galat mewakili deviasi standar dari tiga replikasi PCR (Dodd et al, 2025)

12.4. Interpretasi Data Analisis.

12.4.1 Penanda DNA dan spesifisitasnya

Data ini menunjukkan bahwa pendekatan penggunaan kode batang DNA untuk mengautentikasi madu dievaluasi menggunakan penanda endogen baru yang dikembangkan untuk mendeteksi komponen beras, jagung, dan sirup bit gula. Biasanya, gen referensi harus spesifik terhadap spesies tertentu, memiliki jumlah salinan yang rendah dan stabil, serta menunjukkan variabilitas intra-spesies yang terbatas (Chaouachi et al., 2013). Gen referensi umumnya digunakan untuk menentukan keberadaan organisme hasil rekayasa genetika (GMO) dalam bahan, dengan cara membandingkan keberadaan gen yang dimodifikasi dengan gen referensi (Xiujie et al., 2019). Namun, dalam kasus produk makanan yang diproses secara intensif, seperti sirup gula, gen dengan jumlah salinan rendah sering kali tidak

terdeteksi karena rendahnya jumlah DNA yang terdegradasi dalam bahan (Caldwell, 2017). Oleh karena itu, lebih tepat untuk menargetkan wilayah genom dengan jumlah salinan yang lebih tinggi, seperti gen kloroplas atau mitokondria, guna meningkatkan peluang deteksi. Meskipun pendekatan ini mengurangi kemungkinan kuantifikasi penipuan yang akurat, hal tersebut tidak diperlukan dalam autentikasi madu, karena identifikasi bahan pengotor yang sederhana dapat memberikan bukti substansial terhadap pelanggaran (Nehal et al., 2021).

Data ini juga menunjukkan bahwa penanda DNA yang tepat, baik yang dipilih dari literatur maupun yang dirancang secara in-house, menargetkan gen inti, kloroplas, dan mitokondria pada beras, jagung, dan bit gula. Sebagian besar penanda yang diterapkan menunjukkan kekurangan, seperti tidak adanya amplifikasi atau amplifikasi silang dengan spesies lain. Penanda *beet_ant* yang dikembangkan oleh Chaouachi et al. (2013) sebagai penanda referensi untuk bit gula (*Beta vulgaris* L) terbukti diperkuat di semua 39 varietas *Beta vulgaris* L yang diuji, tanpa amplifikasi pada spesies yang berkerabat dekat. Namun, penanda *beet_ant* gagal mengamplifikasi meskipun berbagai suhu annealing telah diuji. Hal ini mungkin disebabkan oleh perbedaan varietas bit gula yang digunakan, mengingat varietas "Altissima" yang digunakan tidak disertakan dalam pengamatan. Meskipun demikian, hasil ini menunjukkan bahwa primer *beet_ant* tidak cocok sebagai penanda endogen untuk bit gula. Sementara itu, penanda *rice_PLD1* yang digunakan oleh Sobrino-Gregorio et al. (2019) untuk mendeteksi pemalsuan madu yang mengandung molase beras, ditemukan sebagai primer yang paling efektif, karena mampu memberikan kuantifikasi pada konsentrasi 2-5% saat menggunakan kurva standar DNA genomik beras. Namun, penanda *rice_PLD1* juga diamplifikasi pada ekstrak DNA jagung dan bit gula. Hasil ini juga dikonfirmasi oleh Xiujie et al. (2019), yang menemukan bahwa *PLD1* pada padi menunjukkan pengikatan non-spesifik pada jagung dan kentang, yang menunjukkan bahwa penanda ini bukanlah penanda spesifik padi yang dapat digunakan secara akurat.

Dari penanda DNA yang berhasil digunakan, primer yang menargetkan daerah nDNA menghasilkan data dengan nilai C_q yang lebih tinggi dibandingkan dengan penanda yang menargetkan cpDNA

atau mtDNA. Meskipun penanda inti telah berhasil digunakan, terdapat keuntungan yang jelas dalam menggunakan target dengan jumlah salinan yang lebih tinggi. Sebagai contoh, Truong et al. (2022) berhasil menggunakan penanda inti *corn_PERK2* untuk mendeteksi madu Korea yang tercampur dengan sirup jagung, tetapi mereka hanya mampu mencapai batas deteksi $\geq 10\%$. Dalam hal ini, penggunaan penanda mitokondria memungkinkan deteksi madu yang tercampur dengan sirup jagung pada konsentrasi 1%, yang menunjukkan bahwa penanda plastid lebih cocok untuk meningkatkan sensitivitas deteksi. Memang, DNA mitokondria sering digunakan dalam analisis DNA produk pangan karena struktur plastid yang lebih stabil mengurangi degradasi DNA (Sajali et al., 2018). Meskipun penanda kloroplas yang digunakan menghasilkan nilai Cq yang lebih rendah (menunjukkan deteksi yang lebih tinggi) dibandingkan penanda mitokondria, namun, penanda tersebut memiliki spesifisitas yang lebih rendah terhadap tanaman target, karena penanda cpDNA pada jagung dan padi menunjukkan amplifikasi silang dengan ekstrak DNA tanaman non-target lainnya. Hal ini disebabkan oleh fakta bahwa genom kloroplas lebih terkonservasi daripada genom mitokondria, sehingga memiliki tingkat evolusi dan variabilitas urutan yang lebih lambat (Li et al., 2022). Penjelasan ini juga mungkin dapat menggambarkan mengapa penanda kloroplas *beet_matK* menunjukkan amplifikasi yang marginal dalam banyak ekstrak sirup gula, meskipun tampaknya spesifik pada spesies ketika diuji terhadap DNA tanaman padi dan jagung.

12.4.2. Ekstraksi DNA dari sirup gula

Salah satu tantangan utama dalam uji autentikasi makanan berbasis DNA adalah ekstraksi DNA, terutama karena produk pangan mengandung matriks bahan yang kompleks, yang kemungkinan telah mengalami perubahan akibat berbagai jenis proses pengolahan. Madu, sebagai contoh, merupakan matriks yang sulit untuk diekstraksi DNA-nya, mengingat adanya berbagai penghambat PCR, seperti asam organik, polifenol, pigmen, enzim, dan partikel lilin. Meskipun demikian, sejumlah temuan telah menunjukkan keberhasilan penggunaan kit komersial untuk isolasi DNA dari tanaman atau produk makanan (Chiara et al., 2021; Hawkins et al., 2015; Khansaritoreh et al., 2020; Soares et al., 2018; Wu et al., 2017b).

Ekstraksi DNA dari sirup gula menghadirkan masalah tambahan, yaitu intensitas proses pengolahan yang menyebabkan fragmentasi DNA yang tinggi, sehingga mengurangi jumlah DNA target yang dapat diekstraksi. Lebih lanjut, penambahan sirup gula dalam jumlah kecil ke dalam madu akan semakin mengurangi kandungan DNA dari sirup residu tersebut. Tantangan lainnya adalah menilai kualitas dan kuantitas DNA yang berhasil diekstraksi, mengingat kemungkinan adanya beberapa jenis DNA (tumbuhan, hewan, mikroba) dalam bahan tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa pengukuran spektrofotometer yang umum digunakan, seperti data dari nanodrop, hanya akan mencerminkan kandungan total DNA dalam bahan uji, dan bukan jenis DNA yang diinginkan. Oleh karena itu, pengukuran semacam itu dapat menjadi cara yang kurang akurat untuk menilai keberhasilan ekstraksi DNA pada produk pangan.

Sebagai alternatif, penanda tanaman yang dilestarikan digunakan sebagai sarana untuk mengevaluasi hasil ekstraksi DNA, terutama dalam hal keberhasilan isolasi DNA tanaman. Primer yang menargetkan loop trnL P6 terbukti sangat efektif pada DNA yang terdegradasi, karena produk amplifikasinya yang pendek (10-143 bp) dan jumlah salinan yang tinggi. Penanda ini menunjukkan tingkat keberhasilan amplifikasi 100% dalam berbagai bahan pangan, termasuk beras, jagung, dan bit, menjadikannya penanda yang sangat tepat (Taberlet et al., 2007). Selain itu, penanda trnL P6 telah digunakan berhasil mengeksplorasi asal-usul tanaman dalam madu melalui metabarcoding wilayah tersebut, meskipun belum diterapkan untuk mendeteksi pemalsuan sirup gula (Chiara et al., 2021; Valentini et al., 2010).

Hasil lainnya juga menunjukkan bahwa kit Nucleospin Food menghasilkan jumlah DNA tanaman yang lebih tinggi dari ekstrak sirup dibandingkan dengan *kit DNeasy Plant Pro*. Sobrino-Gregorio et al. (2019) juga menemukan bahwa kit NucleoSpin Food menghasilkan ekstraksi DNA berkualitas tinggi dari molase beras. Meskipun metode ekstraksi DNA ini terbukti berhasil pada semua sirup gula, pada satu madu murni (H15), satu madu komersial (CH1), dan tiga madu yang dicampur sirup beras 5% (H04, H10, dan H15), tidak ditemukan amplifikasi dengan trnL_P6. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada DNA tanaman yang terdeteksi dalam bahan uji tersebut, atau protokol ekstraksi yang digunakan tidak sesuai untuk bahan tersebut

(meskipun ekstraksi telah diulang tiga kali, hasilnya tetap gagal). Oleh karena itu, bahan-bahan ini dikeluarkan dari analisis, karena kemungkinan diperlukan ekstraksi DNA yang lebih optimal untuk mengatasi penghambat PCR atau untuk meningkatkan hasil ekstraksi DNA.

12.4.3. Penanda DNA dalam ekstrak sirup

Amplifikasi penanda DNA spesifik menunjukkan variasi yang signifikan di antara berbagai jenis sirup beras dan jagung. Beberapa bahan tersebut menunjukkan amplifikasi penanda target yang lemah (R7) atau bahkan tidak teramplifikasi sama sekali (C1 dan C3). Pada sirup R1, R2, R4, R5, dan C2, amplifikasi penanda tanaman *trnL_P6* dan penanda target beras atau jagung memiliki nilai Cq yang serupa, dengan masing-masing menggandakan dalam tiga siklus satu sama lain. Hal ini mengindikasikan bahwa beras atau jagung merupakan komponen utama dalam sirup-sirup tersebut.

Namun, terdapat beberapa hasil yang menunjukkan ketidakkonsistenan antara amplifikasi penanda tanaman dan penanda spesifik spesies. Sebagai contoh, pada R3, amplifikasi *trnL_P6* menghasilkan Cq 26,42, sementara penanda *rice_rrn26* menunjukkan amplifikasi dengan Cq 34,02. Pola serupa juga terlihat pada R6 (Cq 27,81 dan 33,8) serta R7 (Cq 26,78 dan 37,32), yang menunjukkan bahwa jumlah DNA padi jauh lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah total DNA tanaman. Meskipun hal ini bisa jadi disebabkan oleh degradasi urutan target primer *rice_rrn26*, kemungkinan lain adalah bahwa sirup tersebut bukan berasal dari bahan yang asli. Namun, ada kemungkinan juga bahwa varietas padi yang berbeda digunakan dalam pembuatan sirup, yang dapat menyebabkan variasi urutan pada lokasi target primer, mengingat uji spesifisitas primer hanya dilakukan menggunakan satu galur padi.

Ketidakkonsistenan serupa juga ditemukan pada ekstrak sirup jagung dan bit gula, di mana penanda target tidak teramplifikasi. Walaupun demikian, amplifikasi positif untuk *trnL_P6* menunjukkan bahwa bahan mengandung DNA tanaman, meskipun tidak dapat dipastikan apakah DNA tersebut berasal dari jagung atau bit gula berdasarkan uji qPCR. Pada ekstrak sirup bit gula, amplifikasi dari penanda bit gula tidak cukup kuat meskipun dalam bahan kontrol tanaman bit gula menunjukkan amplifikasi yang signifikan. Hasil

serupa ditemukan oleh Oguchi et al. (2009), yang menyatakan bahwa DNA bit gula terdegradasi selama tahap awal pemrosesan gula, sehingga penanda spesifik *beet01* dan *beet02* dapat diamplifikasi dalam jus bit gula, namun tidak dalam produk gula yang telah jadi..

Wang et al. (2020) juga menunjukkan hasil serupa pada produk gula dari tebu, di mana DNA tebu terdeteksi dalam jumlah rendah dalam ekstrak yang dibuat dari molase, sirup olahan, dan gula kristal, meskipun amplifikasi PCR berhasil pada semua ekstrak gula kecuali satu. Oleh karena itu, amplifikasi positif untuk *trnL_P6* pada sirup jagung C1 dan C3, serta semua sirup bit gula, perlu diselidiki lebih lanjut untuk memastikan keberhasilan protokol ekstraksi. Penyelidikan lebih lanjut ini bisa dibantu dengan pengurutan ampikon penanda tersebut. Metode ini juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi asal tanaman dalam sirup yang tidak diketahui (S1 dan S2), karena penanda untuk beras, jagung, atau bit gula teramplifikasi dengan kuat.

12.4.4. Amplifikasi penanda beras dan jagung pada madu alami dan yang dipalsukan

Penanda *rice_rrn26* dan *corn_rrn26* diuji untuk amplifikasi pada madu yang dicampur dengan sirup dan berhasil diamplifikasi secara positif pada semua konsentrasi yang diuji, termasuk pada tingkat pemalsuan 1%. Sensitivitas uji ini lebih tinggi dibandingkan dengan metode serupa, dimana sensitivitas yang diperoleh adalah masing-masing 2-5% dan $\geq 10\%$ untuk beras dan jagung (Sobrinho-Gregorio et al., 2019; Truong et al., 2022). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh penggunaan penanda plastida spesifik. Amplifikasi penanda yang lebih rendah terlihat pada madu murni, namun dapat dipahami bahwa DNA beras atau jagung mungkin hadir dalam jumlah kecil pada madu alami akibat interaksi lebah dengan tanaman, baik saat mencari makan maupun akibat sisa pakan lebah musim dingin yang masuk ke dalam madu. Di Inggris, jagung adalah tanaman yang umum ditemukan, meskipun tidak menghasilkan nektar dan bukan merupakan tanaman penghasil madu. Namun, jagung kaya akan serbuk sari yang dapat digunakan oleh lebah sebagai sumber protein (Becher et al., 2016; Höcherl et al., 2012). Penemuan ini dapat menjelaskan mengapa penanda jagung lebih kuat terdeteksi dalam

madu alami dibandingkan dengan penanda beras, karena beras tidak ditanam di Inggris.

Untuk itu, berbagai jenis madu Inggris juga diuji untuk menilai penguatan latar belakang yang diharapkan dari penanda rice_rrn26 dan corn_rrn26 dalam madu alami. Hasil tersebut digunakan untuk menentukan ambang batas di mana bahan dapat diidentifikasi sebagai campuran atau madu alami. Ketika ambang batas diterapkan pada jenis madu yang dicampur dengan sirup beras 5% (R1), 100% berhasil diklasifikasikan dengan benar sebagai campuran, yang membuktikan keberhasilan metode ini untuk sirup beras tersebut. Namun, uji ini belum dilakukan pada sirup jagung atau jenis sirup beras lainnya. Jika sirup hanya menunjukkan amplifikasi DNA target yang rendah, sirup tersebut kemungkinan tidak akan melewati ambang batas, seperti pada kasus R7, di mana sirup murni tidak dapat dikenali sebagai campuran berdasarkan amplifikasi penanda rice_rrn26. Selain itu, ambang batas yang dikembangkan dalam dihitung berdasarkan pengaturan bahan uji kecil yang terdiri dari 17 madu. Oleh karena itu, upaya lebih lanjut diperlukan untuk membangun basis data madu referensi guna memperoleh pemahaman yang lebih baik mengenai amplifikasi latar belakang yang diharapkan. Dengan demikian, penentuan ambang batas yang tepat beserta pengujian kontrol amplifikasi yang sesuai sangat penting untuk mencegah kesalahan klasifikasi madu alami sebagai madu yang dipalsukan.

Perlu dicatat bahwa jenis madu yang diuji adalah madu premium yang diperoleh dari peternak lebah di Inggris. Oleh karena itu, madu yang digunakan tidak sepenuhnya mencerminkan kondisi pasar madu Inggris, yang mayoritas terdiri dari campuran madu impor. Meskipun demikian, madu yang digunakan telah menggambarkan dengan baik variasi sumber bunga yang ada di Inggris selama beberapa musim, sehingga memberikan pemahaman yang tepat mengenai potensi amplifikasi penanda nonspesifik yang dapat terjadi akibat sumber tanaman alami dalam madu Inggris. Metode ini selanjutnya perlu diuji pada madu dari berbagai negara dan pada madu yang lebih mewakili pasar madu Inggris. Lebih lanjut lagi, madu dari negara-negara penghasil padi sebagai komoditas utama dalam sistem pertanian harus dianalisis untuk memastikan apakah ambang batas yang dikembangkan dalam dapat diterapkan pada madu non-Inggris.

12.4.5. Madu komersial yang digunakan.

Metode qPCR yang diusulkan telah diuji pada madu komersial yang berasal dari Inggris, yang dibeli melalui pasar di Inggris. Madu tersebut dipasarkan dengan label asal Inggris (CH₁, CH₄) atau asal Skotlandia (CH₂, CH₃), sehingga cocok untuk pengujian yang dikembangkan khusus untuk madu asal Inggris. Protokol ekstraksi DNA yang digunakan terbukti cocok untuk tiga dari empat madu komersial yang dipilih, di mana tiga madu berhasil menunjukkan amplifikasi yang baik pada penanda DNA tanaman.

Namun, pada satu madu (CH₁), tidak terjadi amplifikasi pada penanda tanaman yang digunakan sebagai kontrol positif, yang menunjukkan bahwa protokol ekstraksi tidak sesuai untuk madu ini. Oleh karena itu, madu ini tidak dianalisis untuk amplifikasi penanda beras atau jagung. Penanda beras tidak berhasil teramplifikasi pada semua madu komersial, yang menunjukkan bahwa tidak ada DNA beras yang terdeteksi dalam madu tersebut.

Untuk penanda jagung, terdapat amplifikasi yang rendah pada ketiga bahan, sebanding dengan hasil yang diperoleh dari madu asal Inggris lainnya. Amplifikasi tersebut berada di bawah ambang batas alami yang dikembangkan dalam studi ini. Hal ini sejalan dengan prinsip bahwa jagung memang dapat ditemukan dalam jenis madu Inggris, dan hal ini dapat diharapkan pada madu komersial yang berasal dari daerah penghasil jagung dalam sistem pertanian di negara asal. Meskipun demikian, keterbatasan ini dapat diatasi dengan mengembangkan ambang batas representatif yang sesuai, seperti yang ditunjukkan dalam data.

Penerapan metode ini pada madu komersial menyoroti pentingnya penggunaan penanda kontrol tanaman trnL P6 untuk memverifikasi keberadaan DNA tanaman dalam ekstrak madu. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa amplifikasi negatif pada penanda pengotor benar-benar negatif, atau apakah hal tersebut disebabkan oleh ekstraksi DNA yang tidak memadai.

12.4.6. Kombinasi pengujian dengan metode tradisional

Biasanya, untuk mengautentikasi madu, pendekatan berbasis bobot bukti atau hasil evaluatif perlu diterapkan, mengingat kompleksitas analisis madu yang telah diketahui (Walker et al., 2022). Hal ini mengindikasikan bahwa apabila ditemukan satu hasil yang

atipikal, hal tersebut harus memicu penyelidikan lebih lanjut, dengan menggunakan berbagai analisis berbeda untuk memperkuat bukti sebelum keputusan akhir mengenai ketidakpatuhan produk dibuat. Oleh karena itu, analisis komposisi gula tradisional menggunakan teknik kromatografi cair performa tinggi (HPLC) diterapkan bersamaan dengan hasil analisis DNA.

Dari madu murni, hanya satu madu (H11, madu heather) yang dinyatakan tidak selaras berdasarkan hasil HPLC, karena kandungan gula (fruktosa + glukosa) yang lebih rendah dari 60 g/100 g, yang akan memicu analisis lebih lanjut. Namun, kegagalan ini bersifat marginal, yakni hanya 0,36 g/100 g di bawah batas yang ditetapkan, jika dihitung dengan mempertimbangkan interval kepercayaan (CI). Hasil analisis DNA untuk penanda beras dan jagung menunjukkan hasil negatif, yang memberikan bukti kontras bahwa bahan tersebut tidak tercemar oleh beras atau sirup jagung. Dalam hal ini, masih dapat menjalani pengujian lanjutan untuk memastikan kemurnian madu, karena analisis ganda masih diperlukan untuk memperoleh kesimpulan yang lebih akurat.

Hasil HPLC pada madu komersial menunjukkan kepatuhan terhadap peraturan yang berlaku, yang sejalan dengan hasil analisis DNA yang tidak mencurigai adanya pemalsuan dengan sirup jagung atau beras. Sebaliknya, madu yang dicampur dengan sirup beras semuanya terdeteksi tidak patuh berdasarkan kandungan total fruktosa dan glukosa yang diukur menggunakan HPLC. Temuan ini diperkuat oleh hasil analisis DNA, yang menunjukkan amplifikasi penanda beras melebihi ambang batas alami yang biasanya ditemukan dalam madu Inggris (Gambar 12.4). Selain itu, konsentrasi maltosa pada madu yang dicampur dengan 10% sirup beras juga meningkat dibandingkan dengan madu murni. Walaupun saat ini tidak ada batasan resmi untuk maltosa dalam madu, peningkatan ini dapat menjadi pertimbangan dalam penilaian kualitas madu.

Dengan demikian, untuk madu yang terindikasi dipalsukan, bukti yang diperoleh dari kedua jenis analisis ini memperkuat temuan mengenai ketidakpatuhan produk. Lebih jauh lagi, hasil analisis DNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis sirup yang ditambahkan, yang dapat membantu dalam menentukan pengujian lanjutan yang perlu dilakukan, seperti untuk mendeteksi penanda AFGP yang terkait dengan beras. Metode DNA yang diusulkan

memiliki potensi besar untuk digunakan bersama dengan analisis madu tradisional, metodologi analitis modern, serta uji penyaringan spektroskopi cepat, yang merupakan metode sensitif untuk mengidentifikasi asal spesies sirup berbasis tanaman tertentu dan membantu mengonfirmasi adanya praktik pemalsuan.

BAB XIII

DETEKSI PEMALSUAN MADU MELALUI ENZIM AMILASE DENGAN METODE *native PAGE*

13.1. Pengantar

Madu adalah salah satu makanan bergizi yang telah ada sejak zaman kuno, sebagaimana tercermin dalam relief peternakan lebah pada makam Mesir kuno Pabasa (Naggar et al., 2018). Sepanjang sejarahnya, madu terus menjadi objek penelusuran yang mendalam, yang mengungkapkan bahwa fruktosa dan glukosa merupakan komponen utama madu. Selain itu, madu juga mengandung berbagai jenis enzim serta sejumlah komponen nutrisi lainnya (Bogdanov et al., 2008). Madu memiliki beragam manfaat kesehatan, salah satunya adalah kemampuannya untuk memulihkan tubuh setelah kelelahan dan mengisi kembali energi setelah berolahraga. Selain itu, karena kandungannya yang kaya akan oligosakarida, fenol, dan karbohidrat, madu diyakini memiliki efek positif dalam pengaturan sistem pencernaan (Jiang et al., 2020).

Madu juga mengandung keseimbangan asam amino, mineral, dan protein yang baik, serta sejumlah besar polifenol, termasuk kuersetin, yang memiliki efek antioksidan dan antibakteri yang signifikan (Hossen et al., 2017). Salah satu enzim penting yang terkandung dalam madu adalah α -amilase, yang merupakan salah satu enzim tertua yang dipelajari dalam lebah madu. Enzim ini diperkirakan dihasilkan setelah disekresikan oleh kelenjar sekresi lebah madu. α -amilase telah diisolasi, dimurnikan, dan berbagai sifatnya, seperti pH, suhu, serta parameter kinetika, telah dipelajari (Babacan & Rand, 2005; Babacan & Rand, 2007; Rinaudo et al., 1973). Aktivitas α -amilase dalam madu diukur dengan menggunakan angka diastase (*Diastase Number/DN*), yang berfungsi sebagai indikator kesegaran madu sesuai dengan standar CODEX (CODEX, 2001). Ambang batas kualitas madu umumnya ditetapkan pada angka diastase minimal 8 DN, kecuali untuk madu dengan kandungan enzim alami rendah, seperti madu jeruk, yang menggunakan ambang batas minimal 3 DN.

Lebah madu memiliki tiga isozim α -glukosidase, di antaranya α -glukosidase III diyakini berperan dalam produksi madu (Nishimoto et al., 2001). Aktivitas α -glukosidase ini juga dapat ditemukan dalam madu, karena enzim tersebut disekresikan dari kelenjar lebah madu, mirip dengan α -amilase (Kubota et al., 2004). Aktivitas α -glukosidase, seperti aktivitas diastase, kadang diukur untuk pengendalian kualitas madu (Lichtenberg-Kraag, 2014).

Sejarah madu juga terkait erat dengan perjuangan melawan penipuan pangan. Madu berkualitas tinggi, seperti madu Manuka dari Selandia Baru, telah diperdagangkan dengan harga yang sangat tinggi (Rogers et al., 2010). Hal ini mendorong munculnya metode pemalsuan madu, salah satunya adalah dengan mengencerkannya menggunakan sirup (Fakhlaei et al., 2020). Sirup murah, seperti sirup jagung, fruktosa tinggi, glukosa, sukrosa, dan sirup invert, umumnya digunakan untuk memalsukan madu. Sejak awal abad ke-20, ketika gula invert pertama kali diproduksi dari pati, sirup telah menjadi bahan utama dalam pemalsuan madu. Salah satu metode yang digunakan untuk mengidentifikasi sirup dalam madu adalah kromatografi lapis tipis (TLC) untuk mendeteksi polisakarida turunan pati (White, 1980). Kemudian, analisis rasio isotop karbon stabil (SCIRA) dikembangkan untuk mengidentifikasi senyawa yang berasal dari tanaman C3 (Soares et al., 2017b). Baru-baru ini, metode resonansi magnetik nuklir (NMR), yang memberikan gambaran lengkap mengenai konstituen madu, juga telah diterapkan dalam analisis madu (Ribeiro et al., 2014). Namun, dengan semakin banyaknya metode produksi sirup yang beragam, membedakan penambahan sirup dalam madu menggunakan metode tersebut menjadi semakin sulit.

Pengenceran madu dengan sirup, sebagaimana dijelaskan sebelumnya, akan menurunkan aktivitas diastase, meskipun aktivitas tersebut juga bisa berkurang pada madu yang disimpan dalam kondisi yang tidak tepat atau terlalu panas selama proses pembuatan. Beberapa pihak juga menambahkan amilase asing dari sumber lain untuk menyamarkan berkurangnya aktivitas diastase pada madu (Damto, 2019; Naila et al., 2021). Salah satu metode untuk mendeteksi amilase asing adalah dengan membandingkan aktivitas diastase yang diukur dengan menggunakan metode Schade dan Phadebas (Voldrich et al., 2009). Metode Schade adalah uji klasik untuk aktivitas diastase

dengan menggunakan pati terlarut sebagai substrat (White, 1964), sedangkan metode Phadebas menggunakan tablet uji Phadebas® sebagai substrat (Oddo & Pulcini, 1999). Kedua uji ini memberikan hasil yang berbeda bila terdapat amilase asing dalam madu, karena amilase asing memiliki spesifisitas substrat yang berbeda dari amilase yang berasal dari lebah madu. Baru-baru ini, analisis komprehensif protein madu menggunakan kromatografi cair nano-spektrometri massa tandem (LC-MS/MS) telah digunakan untuk mendeteksi keberadaan amilase asing, seperti α -amilase dari *Aspergillus niger* dan *Bacillus amyloliquefaciens*, pada madu yang dijual di Eropa (Erban et al., 2021).

Di Jepang, madu murah sering dijual di pasar, sehingga dilakukan penelusuran di pasar terhadap 67 madu yang tersedia, termasuk madu impor. Pertama, aktivitas enzimatik digunakan untuk menilai ada atau tidaknya penambahan sirup atau bahan lain, dan kemudian spektrometer massa waktu terbang kuadrapol (LC-QTOF-MS) digunakan untuk mengonfirmasi keberadaan amilase asing. Lebih lanjut, metode pewarnaan aktivitas menggunakan *native PAGE* diperiksa sebagai alternatif yang lebih sederhana. Di Jepang, penambahan amilase asing dalam madu belum lazim, sehingga metode deteksi amilase asing yang efektif sangat diperlukan, dan salah satunya adalah dengan menggunakan *native PAGE* sebagai metode deteksi.

13.2. Deteksi dan Konfirmasi Amilase Asing pada Madu dengan metode pewarnaan aktivitas *native PAGE*

Amilase asing terdeteksi menggunakan LC-QTOF-MS, dan pewarnaan aktivitas setelah elektroforesis *native PAGE* dilakukan sebagai uji konfirmasi. Pemisahan α -amilase dalam *native PAGE* dikonfirmasi dengan menggunakan madu 22, 2, dan 3, yang menunjukkan hasil sebagai berikut: amilase asing tidak terdeteksi pada madu 3, sedangkan amilase turunan dari *Geobacillus* terdeteksi pada madu 2 dan 22, dan amilase turunan dari *Aspergillus* terdeteksi pada madu 22. Pada madu 2 dan 22, α -amilase terdeteksi pada posisi yang sama (Gambar 13.1.A). Hasil LC-QTOF-MS menunjukkan adanya perbedaan α -amilase antara madu ini. Oleh karena itu, 1% maltodekstrin ditambahkan untuk menyiapkan gel elektroforesis, dan *native PAGE* kemudian dilakukan. Selanjutnya, pita α -amilase pada

madu 22 dan 2 terdeteksi pada posisi yang berbeda, dengan pita α -amilase yang diturunkan dari bakteri *Geobacillus* hanya terdeteksi pada madu 2 (Gambar 13.1.B). Dengan asumsi bahwa α -amilase yang diturunkan dari lebah madu tidak bergerak dalam gel dan terdeteksi pada posisi (0), bagian tersebut dipotong, dicerna dalam gel, dan diukur menggunakan LC-QTOF-MS dengan bantuan ProteinPilot terhadap basis data Uniprot/TrEMBL (nama protein: amilase, nomor urut: 310.568, tanggal unduhan: 14 Desember 2021).

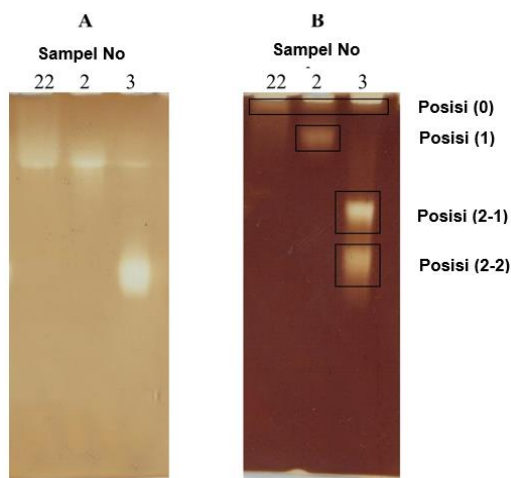
Tabel 13.1. Aktivitas enzim dan amilase asing yang terdeteksi pada madu (Takahashi et al., 2023).

No.	Asal	Negara	Harga (yen/100g)	Aktivitas α - Glucosidase (mU/g)	Aktivitas Diastase (DN)	Amilase asing yang terdeteksi	
						LC-QTOF- MS	Native PAGE MS
1	Blended	China	39.7	<5	8.7	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i>
2	Blended	China	45.2	<5	8.3	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i>
3	Blended	China	49.8	8	10.0	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
4	Blended	China	49.7	<5	15.6	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
5	Blended	Thailand	59.7	<5	13.3	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
6	Blended	Myanmar	69.1	201	11.2	N.D.	N.D.
7	Blended	China	49.8	8	10.2	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i>
8	Blended	China	59.8	17	12.5	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
9	Blended	China	59.7	6	13.2	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
10	Blended	China	36.8	<5	13.8	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
11	Blended	China	59.2	<5	10.2	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i>
12	Blended	China	49.8	25	10.6	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
13	Blended	China	55.4	<5	11.2	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i>
14	Blended	China	59.2	<5	7.3	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus</i>
15	Blended	China	49.8	49	9.1	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
16	Blended	China	72.3	82	7.7	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
17	Blended	Vietnam	147.2	30	3.8	N.D.	N.D.
18	Blended	Brazil	217.1	76	7.3	N.D.	N.D.
19	Blended	China	107.8	161	12.0	N.D.	N.D.
20	Blended	Mexico	154.0	38	5.6	N.D.	N.D.
21	Lotus	Japan	892.6	101	6.6	N.D.	N.D.
22	Lotus	Japan	370.3	1243	16.6	N.D.	N.D.
23	Blended	China	143.2	125	7.7	N.D.	N.D.
24	Blended	Hungary, Canada	224.5	224	7.6	N.D.	N.D.
25	Blended	Canada	263.3	310	8.7	N.D.	N.D.
26	Sunflower	Ukraine	185.3	52	5.3	N.D.	N.D.
27	Blended	China, Argentina	185.3	145	7.1	N.D.	N.D.
28	Lemon	Italy	383.1	34	6.6	N.D.	N.D.

29	<i>Acacia</i>	Italy	383.1	72	6.7	N.D.	N.D.
30	<i>Acacia</i>	Hungary	383.1	23	5.8	N.D.	N.D.
31	<i>Multifloral</i>	Japan	285.5	212	19.2	N.D.	N.D.
32	<i>Cherry Blossoms</i>	Japan	518.5	435	14.9	N.D.	N.D.
33	<i>Mandarin orange</i>	Japan	592.6	504	18.6	N.D.	N.D.
34	<i>Lavender</i>	France	1600.0	32	4.5	N.D.	N.D.
35	<i>Rosemary</i>	France	1600.0	167	7.1	N.D.	N.D.
36	<i>Acacia</i>	Japan	835.0	420	10.9	N.D.	N.D.
37	<i>Multifloral</i>	Japan	670.0	415	14.4	N.D.	N.D.
38	<i>Acacia</i>	China	182.7	99	10.7	N.D.	N.D.
39	<i>Lotus</i>	China	179.2	48	7.4	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
40	<i>Blended</i>	China	111.6	<5	<2.0	N.D.	N.D.
41	<i>Lotus</i>	China	238.7	142	6.4	N.D.	N.D.
42	<i>Blended</i>	Romania, Ukraine	199.2	68	5.4	N.D.	N.D.
43	<i>Blended</i>	Argentina, Canada, Hungary, Japan	275.2	72	7.0	N.D.	N.D.
44	<i>Blended</i>	China	119.2	37	6.5	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
45	<i>Blended</i>	Canada	199.2	27	4.6	N.D.	N.D.
46	<i>Acacia</i>	Japan	948.0	271	11.1	N.D.	N.D.
47	<i>Multifloral</i>	Japan	552.0	7	3.3	N.D.	N.D.
48	<i>Multifloral</i>	Japan	756.0	8	4.6	N.D.	N.D.
49	<i>Blended</i>	China	67.8	34	10.1	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
50	<i>Blended</i>	Argentina, New Zealand	164.5	78	11.7	N.D.	N.D.
51	<i>Lotus</i>	China	150.0	47	6.6	N.D.	N.D.
52	<i>Acacia</i>	China	162.0	41	6.4	N.D.	N.D.
53	<i>Acacia</i>	Switzerland	392.0	464	10.6	N.D.	N.D.
54	<i>Acacia</i>	Hungary	420.0	<5	6.4	N.D.	N.D.
55	<i>Blended</i>	Myanmar	119.8	26	4.4	N.D.	N.D.
56	<i>Blended</i>	China	78.9	5	<2.0	N.D.	N.D.
57	<i>Acacia</i>	Japan	816.7	480	11.6	N.D.	N.D.
58	<i>Lotus</i>	Japan	883.3	573	16.0	N.D.	N.D.
59	<i>Multifloral</i>	Japan	555.6	435	11.0	N.D.	N.D.
60	<i>Acacia</i>	Japan	549.7	582	15.4	N.D.	N.D.
61	<i>Acacia</i>	Japan	900.0	277	9.3	N.D.	N.D.
62	<i>Lotus</i>	Japan	954.5	413	8.9	N.D.	N.D.
63	<i>Acacia</i>	Japan	1035.7	396	6.1	N.D.	N.D.
64	<i>Lotus</i>	Japan	1035.7	531	8.5	N.D.	N.D.
65	<i>Multifloral</i>	Japan	638.6	68	3.1	N.D.	N.D.
66	<i>Time</i>	Greece	1000.0	206	7.2	N.D.	N.D.
67	<i>Blended</i>	China	89.8	25	7.0	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>

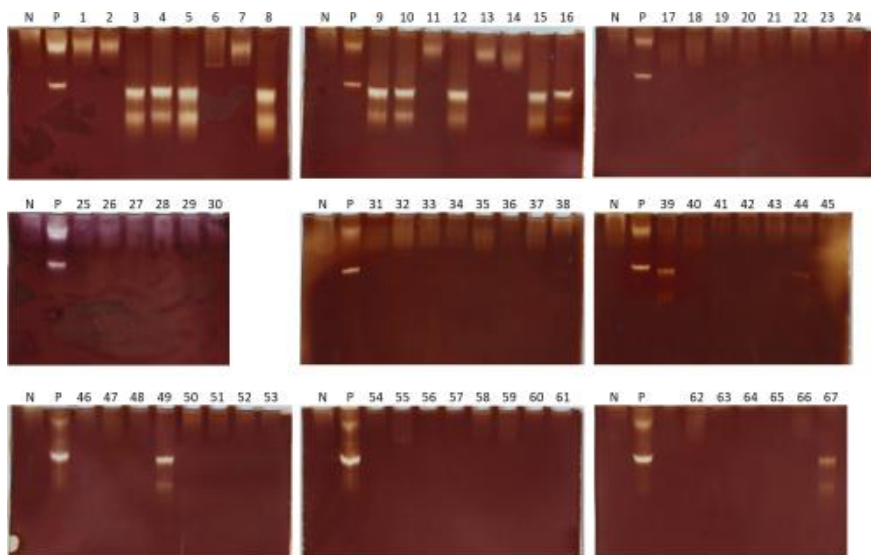
Amilase asing dideteksi dengan metode pewarnaan LC-QTOF-MS dan aktivitas *native PAGE*.

Selanjutnya, α -amilase yang berasal dari lebah madu terdeteksi, yang menunjukkan bahwa enzim tersebut tidak bermigrasi dalam gel yang mengandung maltodekstrin. Hal ini mengindikasikan bahwa penggunaan gel maltodekstrin dalam teknik *Native PAGE* efektif untuk mendeteksi amilase asing dan menguji semua madu (Gambar 13.2 dan Tabel 13.1). Hasil ini konsisten dengan temuan yang diperoleh menggunakan LC-QTOF-MS. Tidak ditemukan pita pada madu yang hanya mengandung α -amilase dari lebah madu, sementara pada madu yang mengandung α -amilase dari *Geobacillus*, pita terdeteksi pada posisi (1), seperti yang ditunjukkan pada Gambar 13.1.B. Pada madu yang mengandung α -amilase dari *Aspergillus*, LC-QTOF-MS mendeteksi pita pada posisi (2-1) dan (2-2), sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 13.1.B. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa α -amilase pada posisi (1) berasal dari *Geobacillus*, sedangkan α -amilase pada posisi (2-1) dan (2-2) berasal dari *Aspergillus*. Selain itu, adanya dua pita turunan dari *Aspergillus* menunjukkan kemungkinan adanya isoenzim, sebagaimana terlihat pada Gambar 13.1.



Gambar 13.1. Perbandingan *native PAGE* menggunakan gel tanpa (A) dan dengan maltodekstrin (B). Posisi (0), α -amilase dari lebah madu; Posisi (1), α -amilase dari *Bakteri Geobacillus*; Posisi (2), α -amilase dari *Aspergillus*. Madu No. 22: Madu yang representatif yang tidak terdeteksi amilase asing. Madu No. 2: madu representatif yang tidak terdeteksi amilase asing. *Bakteri Geobacillus* terdeteksi. Madu No. 3: madu representatif yang mengandung amilase asing dari *Aspergillus* terdeteksi ditemukan berasal dari *Aspergillus* (Takahashi et al., 2023).

Beberapa α -amilase diketahui dapat menyerap pati karena memiliki domain pengikat pati pada ujung C, yang berfungsi untuk mengikat pati mentah (Ohdan et al., 2020; Tibbott et al., 2002; Yu et al., 2018). Meskipun belum ada data yang menyebutkan adanya domain pengikat pati pada produk turunan lebah madu, α -amilase diduga terikat sangat kuat pada maltodekstrin dalam gel dan tidak bergerak pada analisis *native PAGE*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa metode pewarnaan aktivitas *native PAGE*, menggunakan gel yang mengandung maltodekstrin, efektif untuk mendeteksi amilase asing dalam madu secara cepat dan mudah.



Gambar 13.2. Analisis Aktivitas Protein Menggunakan *Native PAGE* dengan Gel 1% Maltodekstrin. Ekstrak madu diaplikasikan pada *native PAGE* menggunakan gel yang mengandung maltodekstrin 1% (akrilamida 12%) dan amilase asing dideteksi dengan pewarnaan aktif. N, kontrol negatif; P, kontrol positif (pita atas; A-amilase dari *Bacillus licheniformis*, pita bawah; α -amilase dari *Aspergillus oryzae*). No. sesuai dengan nomor pada Tabel 13.1 (Takahashi et al., 2023).

Dengan demikian, ditemukan bahwa amilase asing ditambahkan ke dalam madu murah yang didistribusikan. Seperti halnya penambahan sirup, penambahan amilase asing ini juga dapat menyamarkan aktivitas diastase yang menurun akibat proses seperti pemanasan. Di Jepang, hanya metode TLC (*Thin Layer Chromatography*) dan SCIRA (*Screening for Contaminants in Royal*

Jelly) yang digunakan untuk mengidentifikasi zat pengotor dalam madu, namun kedua metode tersebut tidak dapat mendeteksi penambahan amilase asing ke dalam madu. Pada awalnya, LC-QTOF-MS (*Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry*) digunakan untuk mendeteksi amilase asing, namun peralatan LC-QTOF-MS ini tergolong mahal dan kurang fleksibel.

Oleh karena itu, sebuah metode verifikasi baru untuk mendeteksi α -amilase dalam madu yang dijual di Jepang telah dilaporkan. Metode yang diusulkan adalah pewarnaan aktivitas *native PAGE* (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) yang menggunakan gel yang mengandung maltodekstrin sebagai pendekatan yang mudah dan efektif untuk mendeteksi amilase asing dalam madu. Dalam pekerjaan ini, dua jenis amilase asing terdeteksi, meskipun kemungkinan ada α -amilase lainnya yang akan ditambahkan ke dalam madu di masa mendatang. Oleh karena itu, perlu dilakukan penyelidikan lebih lanjut untuk mengetahui apakah berbagai jenis α -amilase biogenik dapat dipisahkan dari α -amilase yang berasal dari lebah madu menggunakan metode pewarnaan aktivitas *native PAGE*.

BAB XIV

DETEKSI MADU PALSU: PERBANDINGAN DUA METODE SPEKTROSKOPI

14.1. Pengantar

Madu merupakan bahan pangan yang memiliki manfaat penting bagi kesehatan dan pengobatan. Selain itu, madu juga merupakan salah satu komoditas ekspor penting bagi banyak negara. Secara ilmiah, madu adalah cairan manis alami yang dihasilkan oleh lebah madu dari nektar bunga atau bagian lain dari tanaman berbunga (Gebremariam & Brhane, 2014). Madu yang dipasarkan secara komersial sering kali dipalsukan dengan penambahan bahan lain untuk tujuan tertentu, baik untuk kebutuhan gizi maupun pengobatan. Bahkan, beberapa produk madu yang dipalsukan masih mengandung sebagian kecil madu murni.

Untuk membedakan madu murni dari madu palsu atau bukan madu, berbagai metode telah dikembangkan, baik yang bersifat tradisional maupun modern. Salah satu metode yang menjanjikan adalah spektroskopi fluoresensi dan spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR), yang dapat digunakan untuk mendeteksi keaslian madu (El-Biale et al., 2013). Spektroskopi fluoresensi yang diinduksi oleh laser atau LED juga telah diusulkan sebagai alternatif yang memiliki sejumlah keunggulan. Selain itu, kombinasi antara visi komputer dan spektroskopi fluoresensi yang diinduksi laser juga telah diterapkan untuk membedakan madu murni dari madu palsu (Shiddiq et al., 2018). Temuan terbaru menunjukkan bahwa spektroskopi fluoresensi yang diinduksi cahaya menggunakan LED telah dikembangkan dengan memanfaatkan serat optik agar menjadi lebih efisien dan portabel (Marudova et al., 2013).

Beberapa metode tradisional yang digunakan untuk menguji kemurnian madu, seperti pengujian dengan menggunakan indera manusia (misalnya, penglihatan, penciuman, dan perasa), kini mulai ditiru dengan teknologi sensor buatan. Kualitas madu dapat tercermin dari aspek-aspek seperti warna, aroma, dan rasa. Aspek-aspek ini dapat dianalisis melalui sistem sensorik buatan seperti visi komputer

untuk penampilan, hidung elektronik untuk aroma, dan lidah elektronik untuk rasa (Magdalena et al., 2014). Hidung elektronik sendiri telah diterapkan untuk berbagai aplikasi, termasuk pengujian madu (Veloso et al., 2018). Selain itu, metode hibrida yang menggabungkan penggunaan lidah elektronik dan FTIR juga telah berhasil diterapkan untuk mengklasifikasikan madu murni dan madu palsu (Subari et al., 2012).

Spektroskopi fluoresensi yang diinduksi laser dan FTIR terbukti efektif dalam membedakan madu murni dari produk nonmadu, termasuk madu palsu yang mengandung sirup jagung. Sirup jagung yang lebih murah sering digunakan sebagai pengganti madu dalam industri makanan, yang menyebabkan munculnya madu palsu di pasaran (Abd El-Aal et al., 1993). Dengan demikian, metode deteksi madu murni dan madu palsu terus berkembang, dan berbagai teknologi canggih kini dapat digunakan untuk memastikan kualitas madu yang beredar di pasar.

14.2. Kandungan pada Gula Madu

Tabel 14.1 menunjukkan kadar gula pada berbagai jenis madu, termasuk madu yang dipalsukan. Hasil analisis menunjukkan bahwa semua madu yang diuji memenuhi standar Nasional Indonesia, yaitu memiliki kadar gula lebih dari 65% (SNI, 2013). Gula merupakan komponen utama dalam madu selain air. Kadar gula yang tinggi menyebabkan madu memiliki kekentalan yang lebih besar. Selain itu, kadar gula yang tinggi juga berkontribusi pada peningkatan kualitas rasa madu dan dapat memperpanjang umur simpan madu tersebut (*National Honey Board*, 2003).

Kadar gula dalam madu turut berperan penting dalam mempengaruhi efek osmotik madu tersebut, yang pada gilirannya dapat mencegah pertumbuhan bakteri. Madu yang memiliki kadar air lebih rendah dan kadar gula lebih tinggi cenderung berwarna lebih gelap, karena mengandung senyawa fenolik dalam jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan madu yang berwarna lebih terang (Eleazu et al., 2013).

Tabel 14.1. Spesifikasi madu untuk analisis amilase (Shiddiq et al, 2019)

No.	Kode Madu	Kemurnian	Gula %	No.	Kode Madu	Kemurnian	Gula %
1.	A	<i>Pure, Forest</i>	69,0	15.	O	<i>Pure, Forest</i>	78,0
2.	B	<i>Pure, Forest</i>	69,5	16.	P	<i>Pure, Forest</i>	71,5
3.	C	<i>Pure, Forest+2 flora</i>	75,0	17.	Q	<i>Pure, Forest+2 flora</i>	71,0
4.	D	<i>Pure, Forest</i>	69,0	18.	CL	<i>C + Corn syrup</i>	73,5
5.	E	<i>Pure, Forest</i>	70,0	19.	FL	<i>F + Corn syrup</i>	70,0
6.	F	<i>Royal Jelly, Bee pollen</i>	72,0	20.	GL	<i>G + Corn syrup</i>	67,5
7.	G	<i>Pure, Forest</i>	73,0	21.	HL	<i>H + Corn syrup</i>	70,0
8.	H	<i>Pure, Forest</i>	75,0	22.	IL	<i>I + Corn syrup</i>	73,5
9.	I	<i>Mixed honey, date, royal jelly</i>	76,0	23.	ML	<i>M + Corn syrup</i>	67,5
10.	J	<i>Pure, Forest</i>	77,0	24.	NL	<i>N + Corn syrup</i>	72,0
11.	K	<i>Date Syrup 100 %</i>	78,0	25.	OL	<i>O + Corn syrup</i>	75,0
12.	L	<i>Corn Syrup 100 %</i>	75,0	26.	PL	<i>P + Corn syrup</i>	69,5
13.	M	<i>Pure, Forest</i>	70,0	27.	QL	<i>Q + Corn syrup</i>	69,5
14.	N	<i>Pure, Mono</i>	73,5				

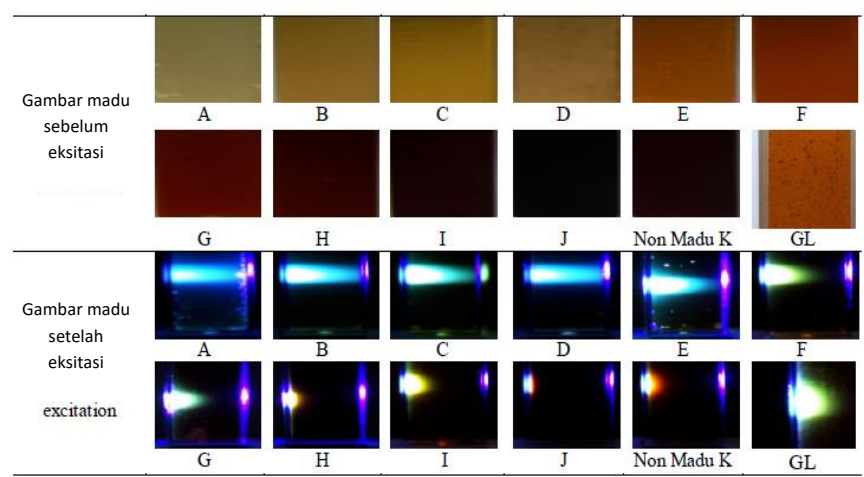
14.3. Hubungan antara Panjang Gelombang Maksimum dan Komposisi Gula Madu

Tabel 14.2 memperlihatkan perubahan warna cairan madu sebelum dan sesudah dieksitasi menggunakan sinar laser dengan panjang gelombang 405 nm (ungu). Spektroskopi fluoresensi yang diinduksi oleh laser atau LED memiliki kemampuan untuk menunjukkan perbedaan warna pada berbagai jenis madu, serta untuk membedakan madu dengan bahan non-madu. Pada proses fluoresensi, sebagian energi cahaya diserap, yang menyebabkan pergeseran panjang gelombang cahaya ke arah panjang gelombang yang lebih panjang daripada panjang gelombang eksitasi. Panjang gelombang puncak warna madu diukur menggunakan program *Ocean Optics Spectra* yang terintegrasi dengan spektrometer.

Panjang gelombang puncak fluoresensi pada madu dengan kode A hingga K berkisar antara 490,9 nm hingga 641,3 nm. Hasilnya menunjukkan bahwa intensitas fluoresensi cenderung menurun seiring dengan peningkatan kadar gula (El-Biale et al., 2013). Berdasarkan data yang disajikan dalam Tabel 14.2, dapat dilihat

bahwa semakin gelap warna madu, semakin rendah pula intensitas cahaya yang terdeteksi. Warna madu ini berkaitan erat dengan kadar gula yang terkandung di dalamnya. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, kadar gula yang lebih tinggi dapat menggelapkan warna madu, sehingga semakin tinggi kadar gula atau semakin rendah kadar air, warna madu akan cenderung menjadi lebih gelap (Eleazu et al., 2013).

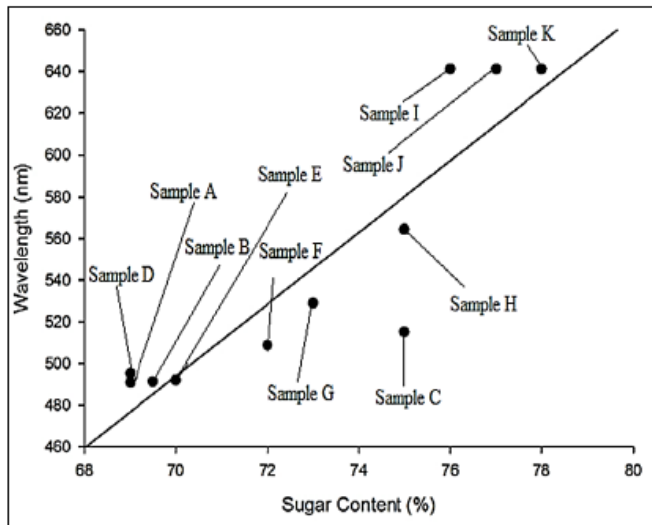
Tabel 14.2. Visualisasi Warna Madu Sebelum dan Setelah Eksitasi dengan Laser 405 nm (Shiddiq et al., 2019).



Hubungan antara panjang gelombang fluoresensi puncak dan kadar gula dapat dilihat pada Gambar 14.1. Gambar tersebut memperlihatkan adanya korelasi linier antara panjang gelombang puncak dengan kadar gula. Kadar gula yang lebih tinggi menyebabkan peningkatan penyerapan energi cahaya eksitasi, sehingga energi yang dipancarkan oleh madu menjadi lebih sedikit. Akibatnya, panjang gelombang cahaya fluoresensi yang dipancarkan menjadi lebih panjang. Temuan sebelumnya menunjukkan bahwa panjang gelombang eksitasi 405 nm efektif untuk memunculkan fenomena fluoresensi pada madu (El-Biale et al., 2013).

Nilai regresi linier yang diperoleh (R^2) dari Gambar 1 adalah 0,7972. Kesalahan relatif (%) yang dihitung berdasarkan nilai tersebut adalah $1 - R^2$, yaitu sebesar 0,2028, atau kurang dari 20%. Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat faktor signifikan lain yang turut

berkontribusi terhadap hubungan tersebut. Dengan kata lain, kadar gula merupakan faktor utama yang memengaruhi pergeseran panjang gelombang puncak. Nilai R^2 yang mendekati satu mengindikasikan adanya korelasi yang kuat antara variabel Y dan X.



Gambar 14.1. Hubungan antara panjang gelombang puncak dengan kadar gula pada madu (Shiddiq et al., 2019).

14.4. Spektral Ultraviolet-Tampak sebagai Alat Verifikasi Keaslian Madu

14.4.1. Persiapan dan Pemrosesan Madu untuk Analisis.

Madu linden, akasia, rapeseed, bunga matahari, madu embun, dan madu polifloral murni (hasil panen tahun 2018) dipilih dari wilayah Vâlcea. Madu tersebut disimpan dalam wadah kedap udara di tempat yang gelap pada suhu ruangan. Sebelum dilakukan pelarutan, madu diperiksa untuk mengetahui apakah telah mengalami kristalisasi. Madu kemudian dipanaskan secara perlahan pada suhu 50°C untuk menghilangkan fase padat yang terbentuk, dan setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm ($1610\times g$) selama 5 menit.

Berbagai jenis sirup, termasuk sirup jagung, sirup jagung dengan ekstrak tumbuhan, sirup inversi, dan sirup buah (Dulcofruct, Focsani, Rumania), digunakan untuk melakukan pemalsuan madu dengan menambahkan sirup dalam konsentrasi 5%, 10%, 20%, 30%,

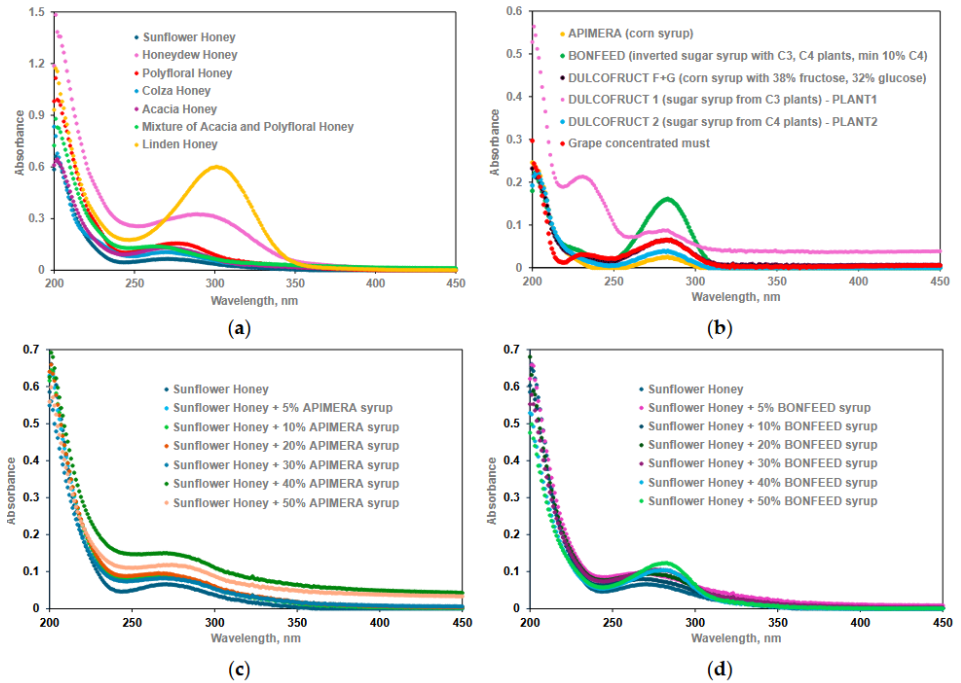
40%, dan 50% (b:b). Madu yang telah dipalsukan kemudian dihomogenisasi secara mekanis sebelum dilakukan pengukuran spektral.

14.4.2. Pengukuran dan Interpretasi Spektrum UV-Vis Sirup dan Madu

Pelarut yang digunakan untuk tujuan disolusi, pengenceran, dan penetapan baseline adalah etanol 80% dalam air (v:v), yang diperoleh dari etanol absolut berkualitas analitik (>99%) (Merck Co., Darmstadt, Jerman) dan air ultra murni yang diproduksi menggunakan sistem *Milli-Q Millipore* (Bedford, MA, AS). Larutan stok 10% (b:v) bahan disaring melalui membran PTFE berukuran 0,45 μm , kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:10 (v:v), dan dilakukan pengukuran spektrofotometri. Spektrum direkam menggunakan spektrofotometer UV-Vis Specord 250 Plus (Analytik Jena, Jena, Jerman), dengan sel kuarsa berukuran 1 cm, resolusi 1 nm, menggunakan larutan etanol 80% sebagai blangko, pada rentang panjang gelombang 200–450 nm. Selama perekaman, suhu divariasikan pada kisaran $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Setiap bahan dianalisis dalam tiga kali pengulangan.

Inspeksi visual terhadap spektrum menunjukkan bahwa daerah panjang gelombang 200–400 nm mengandung informasi yang relevan. Khususnya, daerah 250–350 nm dalam spektrum serapan UV-Vis menunjukkan perhatian khusus, karena berkaitan dengan polifenol dan senyawa volatil yang berasal dari bunga madu (Ciucure & Geana, 2019) serta propolis (Nichitai et al., 2019). Pita serapan yang kuat sekitar 280/290 nm yang diamati dalam spektrum UV-Vis sirup gula dapat dikaitkan dengan asam fenolik tak berwarna, monomer flavanol, polimer, dan senyawa terkait lainnya. Madu yang diteliti sebelumnya telah dikarakterisasi berdasarkan komposisi fitokimia (Ropciuc et al., 2023), yang menunjukkan bahwa madu tersebut mengandung sejumlah besar asam fenolik (seperti 3,4-dihidroksibenzoat, p-hidroksibenzoat, kafeat, klorogenat, siringik, p-kumarat, ferulat, dan t-sinamat) serta flavonoid (seperti kuersetin, kaempferol, isorhamnetin, apigenin, pinosembrian, galangin, krisin, dan pinostrobin). Pemalsuan madu dengan penambahan sirup jagung 5–50% atau gula inversi enzimatis tidak mengakibatkan perubahan

spektral yang secara langsung berkorelasi dengan tingkat pemalsuan (Gambar 14.2).



Gambar 14.2. Spektrum UV-Vis dari (a) madu, (b) sirup, (c) madu bunga matahari (*sunflower honey*) yang dipalsukan dengan 5–50% gula jagung (APIMERA), dan (d) madu bunga matahari yang dipalsukan dengan 5–50% gula enzimatis invertase (BONFEED) (Geana et al., 2024)

GLOSARIUM

A

α -4'-glukosil-erlose

Sebuah jenis disakarida dengan struktur glukosa yang terikat pada molekul erlose.

α -6'-glukosil-erlose – Sebuah jenis disakarida lainnya yang memiliki struktur glukosa yang terikat pada molekul erlose, tetapi dengan posisi ikatan yang berbeda.

α -amilase – Enzim yang menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik dalam amilum dan glikogen menjadi gula reduksi.

α -glukosidase III – Enzim yang berfungsi dalam proses pemecahan glukosa dari karbohidrat kompleks.

Adaptive Iteratively Reweighted Penalized Least Squares (airPLS)

Metode statistik yang digunakan untuk koreksi baseline pada data spektrum.

Adulterasi: Proses pencampuran madu asli dengan zat lain (seperti sirup gula, glukosa, atau fruktosa) yang bertujuan untuk menurunkan kualitas atau memalsukan produk

Aktivitas Enzimatik

Mengacu pada aksi enzim alami dalam madu, seperti invertase dan diastase, yang dapat digunakan sebagai indikator kualitas dan keaslian madu.

Analisis Komponen Independen (ICA)

Teknik statistika yang digunakan untuk memisahkan sumber sinyal yang tidak bergantung satu sama lain dalam data multivariat.

Analisis Multivariat Statistik

Teknik statistik yang melibatkan analisis data dengan lebih dari satu variabel sekaligus.

Analisis Isotop Rasio Karbon (CIRA)

Metode yang digunakan untuk mendeteksi penambahan gula tanaman C4 (misalnya sirup jagung) ke dalam madu dengan mengukur rasio isotop karbon-13 dan karbon-12.

Analisis Komponen Utama (PCA)

Alat statistik yang digunakan untuk mengurangi dimensi data dan mengidentifikasi pola atau anomali dalam profil gula pada madu.

Analitik

Metode atau pendekatan ilmiah untuk menganalisis komposisi kimia suatu bahan menggunakan teknik dan instrumen tertentu.

Antibakteri

Sifat madu yang mampu menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri, disebabkan oleh kandungan seperti hidrogen peroksida dan senyawa bioaktif lainnya.

Apigenin

Senyawa flavonoid yang ditemukan pada berbagai tanaman, memiliki sifat antioksidan.

Apis dorsata

Salah satu spesies lebah madu, dikenal karena ukuran tubuhnya yang lebih besar.

Apis mellifera

Lebah madu yang paling umum dipelihara oleh peternak lebah untuk menghasilkan madu.

Asam Glukonat

Asam organik yang ditemukan dalam beberapa produk fermentasi, digunakan dalam industri kosmetik dan farmasi.

Autentikasi

Proses verifikasi atau pembuktian keaslian suatu produk, dalam konteks ini adalah madu, untuk memastikan bahwa produk tersebut tidak dipalsukan atau dicampur dengan bahan lain seperti gula tambahan.

B**Batas Deteksi (*limit of detection*)**

Jumlah terkecil suatu substansi yang dapat dibedakan secara andal dari ketidakhadiran substansi tersebut dalam sampel.

Batas Kuantisasi (*limit of quantification* /LOQ)

Konsentrasi terendah dari analit yang dapat terdeteksi secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima.

Bioindikator

Organisme atau senyawa yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan zat tertentu, misalnya untuk mengetahui sumber nektar atau tingkat pencemaran.

Bio-marker

Senyawa kimia spesifik atau tanda molekuler yang digunakan untuk

menunjukkan keberadaan atau ketiadaan bahan atau kontaminan tertentu dalam madu.

Biosensor

Perangkat yang digunakan untuk mendeteksi perubahan biokimia atau biologis dalam suatu sampel.

Blokchain

Teknologi terdesentralisasi untuk mencatat transaksi atau data secara aman, transparan, dan tidak bisa diubah.

Botani Asal (*Botanical Origin*)

Jenis tanaman dari mana lebah mengumpulkan nektar; hal ini menentukan jenis madu, seperti madu akasia, madu kopi, dll.

C

Caveat emptor

Prinsip hukum yang mengartikan "pembeli harus berhati-hati", berarti pembeli harus melakukan pemeriksaan atas barang sebelum membeli.

Campuran Gula

Penambahan gula, baik sukrosa, glukosa, fruktosa, atau sirup jagung, ke dalam madu yang bertujuan untuk meningkatkan volume atau keuntungan, yang dapat merusak keaslian madu.

Chromatografi

Keluarga teknik analitis yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur komponen dalam campuran, seperti gula dalam madu.

Chromatografi Gas (GC)

Teknik analitis yang digunakan untuk memisahkan dan menganalisis senyawa yang dapat diuapkan tanpa dekomposisi—digunakan untuk profil gula dan deteksi pemalsuan.

Chromatografi Lapisan Tipis (TLC)

Teknik analitis sederhana yang digunakan untuk identifikasi awal jenis gula dalam

Ciri Organoleptik

Karakteristik fisik yang dapat dirasakan oleh pancaindra seperti rasa, aroma, warna, dan tekstur suatu bahan pangan.

Citra Digital

Gambar atau representasi visual yang disimpan dalam format digital untuk analisis atau pemrosesan lebih lanjut.

Codex Alimentarius Commission

Organisasi internasional yang mengembangkan standar internasional untuk makanan dan produk terkait.

Color Grab

Aplikasi atau perangkat untuk menangkap dan mengidentifikasi warna dari gambar atau objek di dunia nyata.

C3 dan C4 Isotop

Rasio isotop karbon yang digunakan untuk mendeteksi adanya pemalsuan madu dengan sirup berbasis tanaman C4 (seperti jagung dan tebu).

D

Deteksi Kualitatif

Metode analisis untuk mengetahui ada tidaknya suatu zat tanpa mengukur jumlahnya.

Deteksi Kuantitatif

Metode analisis untuk mengetahui berapa banyak (kuantitas) suatu zat yang terdapat dalam sampel.

Diastase

Enzim alami dalam madu yang membantu mencerna pati; digunakan sebagai indikator kesegaran madu. Enzim yang mengubah pati menjadi gula sederhana melalui proses hidrolisis.

Difructosyl-isomelezitosa

Sebuah oligosakarida yang dihasilkan melalui modifikasi enzimatik dari isomelezitosa.

DNA Barcoding

Teknik identifikasi spesies tanaman atau lebah berdasarkan sekuens DNA, digunakan untuk menentukan asal usul madu.

E

e-nose

Alat elektronik yang digunakan untuk mendeteksi aroma dan bau dengan meniru cara kerja indera penciuman manusia.

Elektrokimialuminesensi

Teknik analitik yang menggabungkan reaksi elektrokimia dengan emisi cahaya untuk mendeteksi analit.

Enzim

Protein yang mempercepat reaksi kimia dalam madu, seperti invertase, glukosa oksidase, dan diastase.

e-tongue

Teknologi yang meniru indera perasa manusia untuk mendeteksi rasa dalam sampel

F

Fase Padat Fase Terbalik (SPE)

Teknik kromatografi untuk pemisahan komponen berdasarkan interaksi dengan fase padat yang dibalik.

Flavonoid:

Senyawa fenolik yang berperan sebagai antioksidan dan juga menjadi penanda botani madu.

Flavonoid

Kelas senyawa fenolik yang ditemukan dalam berbagai tanaman, berfungsi sebagai antioksidan.

Fluoresensi

Emisi cahaya oleh suatu molekul setelah menyerap cahaya atau radiasi elektromagnetik lainnya.

Fruktosa

Jenis gula sederhana (monosakarida) yang secara alami terdapat dalam madu, tetapi juga bisa berasal dari tambahan eksternal.

FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

Teknik untuk mengetahui struktur kimia senyawa dalam madu.

G

Gentiobiosa

Disakarida yang terdiri dari dua molekul glukosa.

Glukosa

Monosakarida lain yang secara alami ditemukan dalam madu, namun juga sering digunakan sebagai bahan campuran atau pemalsu.

Glucanobacter spp

Genera bakteri yang dikenal dalam fermentasi gula dan produksi asam.

Gula Konstituen

Gula alami yang ditemukan dalam madu, terutama fruktosa dan glukosa, bersama dengan komponen minor seperti sukrosa, maltosa, dan oligosakarida lainnya.

H

Hidroksimetilfurfural (HMF)

Senyawa yang terbentuk dari degradasi gula dalam madu, biasanya meningkat akibat pemanasan atau penyimpanan lama. Kadar HMF sering digunakan sebagai indikator kualitas atau pemalsuan madu.

High Fructose Corn Syrup (HFCS) – Sirup jagung yang mengandung fruktosa lebih tinggi dibandingkan sirup glukosa biasa.

Hue Saturation Value

Model warna yang digunakan untuk menggambarkan perbedaan dalam warna berdasarkan rona, kejenuhan, dan kecerahan.

I

Identifikasi

Langkah ilmiah untuk mengenali dan mengonfirmasi keberadaan zat tertentu dalam suatu sampel.

Identifikasi Pollen (Melissopalynologi):

Studi tentang serbuk sari dalam madu untuk menentukan asal botani dan geografis.

Indeks Refraksi

Ukuran yang digunakan untuk memperkirakan total zat terlarut dalam madu, kadang-kadang berkorelasi dengan kandungan gula dan kemurnian.

Inulobiose

Disakarida yang terdiri dari dua unit inulosa yang berhubungan melalui ikatan β .

Invertase

Enzim yang menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa.

IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry):

Teknologi untuk menganalisis rasio isotop karbon dalam madu untuk mendeteksi pemalsuan.

Isomaltosa

Disakarida yang terdiri dari dua molekul glukosa yang terikat pada posisi yang berbeda dari sukrosa.

Isotop Stabil

Atom dari unsur yang sama dengan jumlah neutron berbeda yang tidak bersifat radioaktif. Isotop digunakan dalam teknik pelabelan untuk mendeteksi sumber gula dalam madu.

K

Karbohidrat

Senyawa organik yang terdiri dari karbon, hidrogen, dan oksigen, termasuk gula seperti glukosa, fruktosa, dan sukrosa, yang merupakan komponen utama madu.

Kestosa

Polimer karbohidrat yang ditemukan pada beberapa bahan makanan, digunakan dalam industri makanan.

Kojibiosa

Disakarida yang ditemukan dalam proses fermentasi dan digunakan dalam aplikasi pangan.

Kristalisasi Madu

Proses fisik di mana madu cair berubah menjadi bentuk padat karena penurunan kelarutan glukosa. Proses pemadatan madu alami ketika kadar glukosa lebih tinggi dari kadar air.

Kromatografi

Teknik pemisahan senyawa kimia dalam campuran berdasarkan perbedaan sifat fisik atau kimia. Umumnya digunakan dalam analisis madu.

Kromatografi Gas (GC):

Teknik yang digunakan untuk menganalisis senyawa volatil dalam madu.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (*High-Performance Liquid Chromatography* /HPLC):

Teknik pemisahan untuk menganalisis komponen larut dalam madu seperti gula. Teknik yang banyak digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur gula individu dalam madu.

Kromatografi Lapisan Tipis (TLC)

Teknik analitis sederhana yang digunakan untuk identifikasi awal jenis gula dalam madu.

Kualitas Kontrol

Prosedur dan standar yang digunakan untuk memastikan madu memenuhi persyaratan keamanan, kemurnian, dan keaslian.

K-Nearest Neighbor (KNN)

Algoritma pembelajaran mesin yang digunakan untuk klasifikasi berdasarkan kedekatannya dengan titik data yang ada.

L

LC2-DE DIGE

Teknik proteomik yang menggabungkan pemisahan dua dimensi dengan elektroforesis gel dan metode identifikasi protein.

LC-IRMS

Teknik analisis yang menggabungkan kromatografi cair dengan spektrometri massa isotop untuk menentukan isotop stabil dalam sampel.

M

Machine Learning

Bidang kecerdasan buatan yang berfokus pada pengembangan algoritma untuk memungkinkan sistem belajar dari data.

Madu Asli

Madu yang dihasilkan lebah dari nektar bunga tanpa campuran atau tambahan bahan lain.

Madu Monofloral

Madu yang mayoritas berasal dari satu jenis tanaman.

Madu Polifloral

Madu yang berasal dari berbagai jenis bunga.

MALDI-TOF MS

Teknik spektrometri massa untuk identifikasi biomolekul seperti protein dan asam nukleat.

Maltosa

Gula disakarida yang secara alami terdapat dalam jumlah kecil pada madu, tetapi kadang-kadang ditambahkan secara curang melalui sirup gula.

Metabolomik

Cabang ilmu yang mempelajari profil senyawa metabolit dalam suatu organisme atau produk seperti madu, untuk keperluan identifikasi dan autentikasi.

Multivariate Statistical Modeling

Pendekatan statistik untuk menganalisis data dengan banyak variabel sekaligus.

Myo-Inositol

Bentuk isomer dari inositol, yang berperan dalam berbagai proses biologi dalam tubuh manusia.

N

Native PAGE

Singkatan dari *Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, yaitu teknik elektroforesis yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran dan muatannya tanpa merusak struktur alaminya.

Nigerosa

Oligosakarida yang terdiri dari beberapa unit glukosa.

Nistosa

Oligosakarida yang ditemukan dalam beberapa tanaman.

O

Oligosakarida

Karbohidrat yang terdiri dari beberapa unit gula; hadir dalam jumlah jejak dalam madu alami dan penting untuk otentikasi madu.

Oligofruktosa

Karbohidrat pendek yang ditemukan pada beberapa tanaman dan digunakan sebagai prebiotik.

Omik

Studi besar-besaran terhadap biomolekul dalam berbagai bidang biologi, seperti genomik, proteomik, dan metabolomik.

Organoleptik

Pengujian atau evaluasi produk berdasarkan rasa, bau, tekstur, dan penampilannya.

Osmolalitas

Ukuran konsentrasi partikel terlarut dalam suatu larutan, biasanya digunakan dalam konteks larutan tubuh.

P

Palatinosa

Disakarida yang terdiri dari glukosa dan fruktosa.

Partial Least Squares-Linear Discriminant Analysis (PLS-LDA) –

Teknik statistik yang menggabungkan regresi dan klasifikasi untuk analisis data.

Pemalsuan Madu

Praktik menambahkan zat tertentu seperti gula atau sirup ke dalam madu dengan tujuan menipu konsumen.

Piroglutamat

Senyawa yang terbentuk dari glutamat melalui siklus metabolik, memiliki berbagai fungsi biologis. Asam amino yang mengandung struktur siklik, terlibat dalam metabolisme glutamin.

Polinasi

Proses penyerbukan bunga oleh lebah, yang menghasilkan nektar sebagai bahan dasar madu.

Pollen

Serbuk sari bunga yang dikumpulkan lebah, digunakan dalam analisis asal madu.

Pollen Analysis (Melissopalynology)

Studi tentang butir-butir pollen dalam madu untuk menentukan asal botani dan geografis, yang membantu dalam memverifikasi keaslian madu.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Teknik dalam biologi molekuler yang digunakan untuk menggandakan (mengamplifikasi) segmen DNA secara cepat dan spesifik.

Principal Component Analysis (PCA)

Teknik analisis data multivariat yang digunakan untuk mengurangi dimensi data.

Profil Gula

Komposisi unik gula dalam madu, yang bervariasi tergantung pada sumber bunga dan membantu menentukan keaslian madu.

Profil Kimia

Susunan berbagai senyawa kimia dalam madu yang menjadi ciri khas spesifik terhadap sumber nektarnya.

Prolin

Asam amino yang berperan dalam pembentukan struktur protein.

Q

Rasio Glukosa/Fruktosa

Parameter penting untuk menilai kualitas madu dan kecenderungan kristalisasi. Rasio yang tidak normal dapat menunjukkan pemalsuan.

Reologi

Ilmu yang mempelajari aliran dan deformasi material, sering digunakan dalam industri makanan dan farmasi.

Root Mean Square Error (RMSE)

Ukuran kesalahan yang digunakan untuk mengevaluasi seberapa baik model dalam memprediksi data.

S

Sensorik

Penilaian madu berdasarkan karakteristik rasa, aroma, warna, dan tekstur.

Sirup Glukosa

Sirup yang mengandung glukosa sebagai bahan utama, digunakan dalam berbagai produk makanan dan minuman.

Sirup Gula Invert

Sirup yang terdiri dari campuran glukosa dan fruktosa, dibuat dengan memecah sukrosa menggunakan enzim atau asam.

Sirup Inulin Fruktosa Tinggi (HFIS)

Sirup yang mengandung fruktosa yang lebih tinggi daripada sirup glukosa biasa, dihasilkan dari inulin.

Sirup Jagung Fruktosa Tinggi (HFCS)

Sirup jagung dengan kandungan fruktosa yang lebih tinggi dari pada glukosa, digunakan dalam banyak produk olahan.

Skala Pfund

Skala untuk menilai intensitas warna madu berdasarkan tingkat kegelapan.

Spektroskopi

Teknik analisis berdasarkan interaksi cahaya dengan materi. Digunakan untuk mengidentifikasi dan menganalisis senyawa dalam madu.

Spektroskopi Resonansi Magnetik Nuklir ((*Nuclear Magnetic Resonance*/NMR)

Teknik analisis lanjutan yang digunakan untuk menentukan struktur senyawa organik, termasuk profil gula dan penanda pemalsuan dalam

madu. Digunakan untuk analisis struktur senyawa organik dalam madu.

Spektroskopi Inframerah Transformasi Fourier (FT-IR)

Teknik spektroskopi yang digunakan untuk menganalisis vibrasi molekul dalam

Spektroskopi Fluoresens

Metode untuk menganalisis substansi berdasarkan kemampuannya untuk memancarkan cahaya setelah dieksitasi. Digunakan dalam mendeteksi kotoran atau sirup gula dalam madu.

Spektrometri Massa Isotop Rasio (IRMS)

Teknik yang digunakan untuk mengukur rasio isotop unsur-unsur, sangat berguna untuk mengidentifikasi madu yang dipalsukan dengan gula tebu atau jagung.

Spektroskopi Resonansi Magnetik Nuklir (NMR)

Teknik analitis lanjutan yang digunakan untuk menentukan struktur senyawa organik, termasuk profil gula dan penanda pemalsuan dalam madu.

Spray Ionisasi Elektrospray (ESI)

Teknik ionisasi yang digunakan dalam spektrometri massa yang memungkinkan analisis molekul gula kompleks dalam madu.

Sukrosa

Gula disakarida yang secara alami hanya sedikit terdapat dalam madu murni. Kadar tinggi menunjukkan kemungkinan pemalsuan. Gula yang terdiri dari glukosa dan fruktosa, sering ditemukan dalam tebu dan bit gula

T

Teknik Isotop Rasio Massa (IRMS)

Metode untuk mendeteksi asal usul gula berdasarkan rasio isotop karbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), digunakan untuk membedakan gula alami dari tambahan.

Traceability (Jejak Asal)

Kemampuan untuk melacak asal usul dan proses produksi madu untuk menjamin keaslian dan keamanannya.

Total Fenolik:

Ukuran jumlah senyawa fenolik dalam madu, berkaitan dengan aktivitas antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Aal, E. S. M., Ziena, H. M., & Youssef, M. M. (1993). Adulteration of honey with high-fructose corn syrup: Detection by different methods. *Food Chemistry*, 48(3), 209–212. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90061-J](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90061-J)
- Afrin, S., Haneefa, S. M., Fernandez-Cabezudo, M. J., Giampieri, F., Al-Ramadi, B. K., & Battino, M. (2020). Health benefits of honey. *Nutrition Research Reviews*, 33(1), 50–76. <https://doi.org/10.1017/S095442241900028X>
- Afrin, S., Forbes-Hernandez, T., Gasparrini, M., Bompadre, S., Quiles, J., Sanna, G., Spano, N., Giampieri, F., & Battino, M. (2017). Strawberry-tree honey induces growth inhibition of human colon cancer cells and increases ROS generation: A comparison with Manuka honey. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 613–618. <https://doi.org/10.3390/ijms18030613>
- Ahmed, J., Prabhu, S. T., Raghavan, G. S. V., & Ngadi, M. (2007). Physico-chemical, rheological, calorimetric and dielectric behavior of selected Indian honey. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1207–1213. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.06.030>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.014>
- Ajlouni, S., & Sujirapinyokul, P. (2010). Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. *Food Chemistry*, 119(3), 1000–1005. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.057>
- Al Eid, S. M. (2006). Chromatographic separation of fructose from date syrup. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(1), 83–96
- Al-Mahasneh, M., Al-U'datt, M., Rababah, T., Al-Widyan, M., Abu Kaeed, A., Al Mahasneh, A. J., & Abu-Khalaf, N. (2021). Classification and prediction of bee honey indirect adulteration using physiochemical properties coupled with k-means clustering and simulated annealing-artificial neural networks (SA-ANNs).

- Journal of Food Quality*, 2021, 6634598.
<https://doi.org/10.1155/2021/6634598>
- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Brenciani, A., Mazzoni, L., Gasparrini, M., González-Paramá, A. M., Santos-Buelga, C., Morroni, G., Simoni, S., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Giovanetti, E., & Battino, M. (2018). *Apis mellifera* vs *Melipona beecheii* Cuban polyfloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.051>
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S., & Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2490–2499. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021>
- Airy, S., Esmaili, M., & Alizadeh, M. (2017). Classification of adulterated honeys by multivariate analysis. *Food Chemistry*, 224, 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.025>
- Almeida, A. D., Eckersall, D., Bencurova, E., Dolinska, S., Mlynarcik, P., Vincova, M., & Bhide, M. (2013). Farm animal proteomics. In *Proceedings of the 4th Management Committee Meeting and 3rd Meeting of Working Groups 1, 2 & 3 of COST Action FA1002* (pp. XX–XX). Springer.
- Ambaw, M., & Teklehaimanot, T. (2018). Study on the quality parameters and the knowledge of producers on honey adulteration in selected districts of Arsi Zone. *International Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, 4(1), 1–6. Retrieved from <http://www.bioinfopublication.org/jouarchive.php?opt=&joui d=BPJ0000217>
- Anconi, A. C. S. A., Brito, N. C. S., & Nunes, C. A. (2022). Determination of peroxide value in edible oils based on digital image colorimetry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 113, 104724. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104724>

- Andric, F., Trifkovic, J., & Lazarevic, K. B. (2012). Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. *Food Chemistry*, 132(4), 2060–2064. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.001>
- Anguebes, F., Pat, L., Ali, B., Guerrero, A., Cordova, A. V., Abatal, M., & Garduza, J. P. (2016). Application of multivariable analysis and FTIR-ATR spectroscopy to the prediction of properties in Campeche honey. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, 1–14.
- Anjos, O., Campos, M. G., Ruiz, P. C., & Antunes, P. (2015). Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry*, 169, 218–223..
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63(4), 549–562.
- Aries, E., Burton, J., Carrasco, L., De Rudder, O., & Maquet, A. (2016). Scientific support to the implementation of a Coordinated Control Plan with a view to establishing the prevalence of fraudulent practices in the marketing of honey (JRC Technical Report No. JRC104749). European Commission Joint Research Centre.
- Babacan, S., & Rand, A. G. (2005). Purification of amylase from honey. *Journal of Food Science*, 70(6), c413–c418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11439.x>
- Babacan, S., & Rand, A. G. (2007). Characterization of honey amylase. *Journal of Food Science*, 72(1), C050–C055. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00215.x>
- Baloš, M. M. Z., Popov, N. S., Prodanov Radulović, J. Z., Stojanov, I. M., & Jakšić, S. M. (2020). Sugar profile of different floral origin honeys from Serbia. *Journal of Apicultural Research*, 59(4), 398–405. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1767279>
- Balsamo, G. M., Valentim-Neto, P. A., Mello, C. S., & Arisi, A. C. M. (2015). Comparative proteomic analysis of two varieties of genetically modified (GM) Embrapa 5.1 common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their non-GM counterparts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(48), 10569–10577. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04659>

- Bansal, V., Premi, M., Sharma, H. K., & Nanda, V. (2017). Compositional, physical, functional attributes and flow characterization of spray-dried skim milk powder enriched with honey. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(3), 1474–1485.
- Beć, K. B., & Huck, C. W. (2019). Advances in near-infrared spectroscopy and related computational methods. *Molecules*, 24(23), 4370. <https://doi.org/10.3390/molecules24234370>
- Beć, K. B., Grabska, J., & Huck, C. W. (2020). Biomolecular and bioanalytical applications of infrared spectroscopy – A review. *Analytica Chimica Acta*, 1133, 150–177. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.015>
- Becher, M. A., Grimm, V., Knapp, J., Horn, J., Twiston-Davies, G., & Osborne, J. L. (2016). BEESCOUT: A model of bee scouting behaviour and a software tool for characterizing nectar/pollen landscapes for BEEHAVE. *Ecological Modelling*, 340, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2016.09.013>
- Benkeblia, N. (2023). Gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–mass spectrometry metabolomics platforms: Tools for plant oligosaccharides analysis. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 5, 100304. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100304>
- Berriel, V. (2018). *Carbon stable-isotope and physicochemical data as a possible tool to differentiate between honey-production environments in Uruguay*. *Foods*, 7(6), 86. <https://doi.org/10.3390/foods7060086>
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Facino, R. M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(1), 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.014>
- Bertelli, D., Papotti, G., Bortolotti, L., & Marcazzan, G. L. (2012). ¹H-NMR simultaneous identification of health-relevant compounds in propolis extracts. *Phytochemical Analysis*, 23(3), 260–266. <https://doi.org/10.1002/pca.1352>
- Bertelli, D., Lolli, M., Papotti, G., Bortolotti, L., Serra, G., & Plessi, M. (2010). Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear

- magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8495–8501. <https://doi.org/10.1021/jf101503k>
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105(2), 822–828. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.025>
- Bergamo, G., Seraglio, S. K. T., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2019). Rapid authentication of honey using ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics. *Food Research International*, 116, 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.009>
- Bertoncelj, J., Golob, T., Kropf, U., & Korošec, M. (2011). Characterisation of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9), 1914–1921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02664.x>
- Bianchi, F., Careri, M., & Musci, M. (2005). Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas-chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 89, 527–532.
- Bidin, N., Zainuddin, N. H., Islam, S., Abdullah, M., Marsin, F. M., & Yasin, M. (2016). Sugar detection in adulterated honey via fiber optic displacement sensor for food industrial applications. *IEEE Sensors Journal*, 16, 299–305
- Biluca, F. C., Bernal, J., Valverde, S., Ares, A. M., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2019). Determination of free amino acids in stingless bee (*Meliponinae*) honey. *Food Analytical Methods*, 1–6.
- Blidi, S., C., Gotsiou, P., Loupassaki, S., Grigorakis, S., & Calokerinos, A. C. (2017). Effect of thermal treatment on the quality of honey samples from Crete. *Advances in Food Science and Engineering*, 1(1), 1-8
- Bodor, Z., Benedek, C., Urbin, Á., Szabó, D., & Sipos, L. (2021). Colour of honey: Can we trust the Pfund scale? – An alternative graphical tool covering the whole visible spectra. *LWT*, 149, 111859. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111859>

- Bogdanov, S. (2010). Honey control. In *Book of honey* (Chapter 9). Bee Product Science. Retrieved April 2008, from www.bee-hexagon.net
- Bogdanov, S. (2009). *Honey elaboration and harvest*. Swiss Bee Research Center. <http://www.bee-hexagon.net>
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>
- Bogdanov, S., & Martin, P. (2002). Honey for food use. Review of food safety issues, chemical and physical parameters. Quality and authenticity of honey for consumer. Swiss Bee Research Centre.
- Bogdanov, S., Lullmann, C., Martin, P., von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., Oddo, L. P., Sabatini, A., Marcazzan, G. L., Piro, R., Flamini, C., Morlot, M., Lheritier, J., Borneck, R., Marioleas, P., Tsigouri, A., Kerkvliet, J., Ortiz, A., Ivanov, T., D'Arcy, B., Mossel, B., & Vit, P. (1999). Honey quality and international regulatory standards: Review by the International Honey Commission. *Bee World*, 80(2), 61–69
- Böhme, K., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J., & Ortea, I. (2019). Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(14), 3854–3864.
- Bontempo, L., Camin, F., Ziller, L., Perini, M., Nicolini, G., & Larcher, R. (2017). Isotopic and elemental composition of selected types of Italian honey. *Measurement*, 98, 283–289.
- Bougrini, M., Tahri, K., Saidi, T., El Hassani, N. E. A., Bouchikhi, B., & El Bari, N. (2016). Classification of honey according to geographical and botanical origins and detection of its adulteration using voltammetric electronic tongue. *Food Analytical Methods*, 9(8), 2161–2173.
- Boynton, B. 2012. [E-mail]. Available from: the author, Sarah Easter Strayer.
- Brar, D. S., Pant, K., Krishna, R., Kaur, S., Rasane, P., Nanda, V., & Gautam, S. (2022). A comprehensive review on unethical honey: Validation by emerging techniques. *Food Control*, 145, 109482. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109482>

- Breen, T. (2010, September 25). States expand efforts to combat 'funny honey' that isn't pure. USA Today. http://usatoday30.usatoday.com/money/industries/food/2010-09-25-honeyproducers_N.htm
- Brobst, K. M., & Lott, C. E., Jr. (1966). Determination of some components in corn syrup by gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives. *Cereal Chemistry*, 43(1), 35-43.
- Brokl, M., Soria, A. C., Martínez-Castro, I., Sanz, M. L., & Ruiz-Matute, A. I. (2009). Characterization of O-trimethylsilyl oximes of trisaccharides by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(25), 4689-4692. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.053>
- Bulut, L., & Kilic, M. (2009). Kinetics of hydroxymethylfurfural accumulation and color change in honey during storage in relation to moisture content. *Journal of Food Process Preservation*, 33(1), 22-32. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00297.x>
- Cabañero, A. I., Recio, J. L., & Rupérez, M. (2006). Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: A new perspective on honey adulteration detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9719-9727. <https://doi.org/10.1021/jf062067x>
- Cai, J., Wu, X., Yuan, L., Han, E., Zhou, L., & Zhou, A. (2013). Determination of Chinese Angelica honey adulterated with rice syrup by an electrochemical sensor and chemometrics. *Analytical Methods*, 5(10), 2324-2328. <https://doi.org/10.1039/c3ay00041a>
- Caira, S., Pinto, G., Nicolai, M. A., Chianese, L., & Addeo, F. (2016). Simultaneously tracing the geographical origin and presence of bovine milk in Italian water buffalo Mozzarella cheese using MALDI-TOF data of casein signature peptides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(21), 5609-5621. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9663-0>
- Caldwell, J. M. (2017). Food analysis using organelle DNA and the effects of processing on assays. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 57-74. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-030216>

- Calle, J. L. P., Punta-Sanchez, I., Gonzalez-de-Peredo, A. V., Ruiz-Rodríguez, A., Ferreiro Gonzalez, M., & Palma, M. (2023). Rapid and automated method for detecting and quantifying adulterations in high-quality honey using vis-nirs in combination with machine learning. *Foods*, 12(13), 2491. <https://doi.org/10.3390/foods12132491>
- Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Turumtay, E. A., Silici, S., & Kolayli, S. (2015). An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry*, 180, 133–141.
- Cantrell, K., Erenas, M. M., de Orbe-Payá, I., & Capitán-Vallvey, L. F. (2010). Use of the hue parameter of the hue, saturation, value color space as a quantitative analytical parameter for bitonal optical sensors. *Analytical Chemistry*, 82(2), 531–542. <https://doi.org/10.1021/ac901753c>
- Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 793–810. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.002>
- Carabetta, S., Di Sanzo, R., Campone, L., Fuda, S., Rastrelli, L., & Russo, M. (2020). High-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC–PAD) and chemometrics for geographical and floral authentication of honeys from Southern Italy (Calabria region). *Foods*, 9(11), 1625. <https://doi.org/10.3390/foods9111625>
- Cavanna, D., Righetti, L., Elliott, C., & Suman, M. (2018). The scientific challenges in moving from targeted to non-targeted mass spectrometric methods for food fraud analysis: A proposed validation workflow to bring about a harmonized approach. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 223–241. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.007>
- Cengiz, M. F., Durak, M. Z., & Ozturk, M. (2014). In-house validation for the determination of honey adulteration with plant sugars (C4) by Isotope Ratio Mass Spectrometry (IR-MS). *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.032>

- Cengiz, M. M., Tosun, M., & Topal, M. (2018). Determination of the physicochemical properties and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios of some honeys from the northeast Anatolia region of Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 69, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.02.006>
- Chaichi, M. J., & Ehsani, M. (2015). Determination of glucose and cholesterol using a novel optimized luminol-CuO nanoparticles- H_2O_2 chemiluminescence method by Box-Behnken design. *Journal of Fluorescence*, 25(4), 861–870. <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1566-5>
- Chaouachi, M., Alaya, A., Ali, I. B. H., Hafsa, A. B., Nabi, N., Bérard, A., Romaniuk, M., Skhiri, F., & Saïd, K. (2013). Development of real-time PCR method for the detection and the quantification of a new endogenous reference gene in sugar beet *Beta vulgaris* L.: GMO application. *Plant Cell Reports*, 32(1), 117–128. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1346-5>
- Chapman, P., Clinton, J., Kerber, R., Khabaza, T., Reinartz, T., Shearer, C., & Wirth, R. (2000). *CRISP-DM 1.0: Step-by-step data mining guide* (The CRISP-DM Consortium). SPSS Inc.
- Chen, Y., Xianyu, Y., Wu, J., Dong, M., Zheng, W., Sun, J., & Jiang, X. (2017). Double-enzymes-mediated bioluminescent sensor for quantitative and ultrasensitive point-of-care testing. *Analytical Chemistry*, 89(10), 5422–5427. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00239>
- Chen, S., Hai, X., Chen, X., & Wang, J. (2014). In situ growth of silver nanoparticles on graphene quantum dots for ultrasensitive colorimetric detection of H_2O_2 and glucose. *Analytical Chemistry*, 86(13), 6689–6694. <https://doi.org/10.1021/ac501497d>
- Chen, L., Xue, X., Ye, Z., Zhou, J., Chen, F., & Zhao, J. (2011). Determination of Chinese honey adulterated with high fructose corn syrup by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 128(4), 1110–1114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.004>
- Chiara, B., Francesco, C., Fulvio, B., Paola, M., Annalisa, G., Stefania, S., Luigi, A. P., & Simone, P. (2021). Exploring the botanical composition of polyfloral and monofloral honeys through DNA

- metabarcoding. *Food Control*, 128, 108175.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108175>
- Chirife, J. M., Zamora, C., & Motto, A. (2006). The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. *Journal of Food Engineering*, 72(3), 287–292.
<https://doi.org/10.1016/j.jfe.2005.07.012>
- Cholil, S. R., Handayani, T., Prathivi, R., & Ardianita, T. (2021). Implementasi algoritma klasifikasi K-Nearest Neighbor (KNN) untuk klasifikasi seleksi penerima beasiswa. *IJCIT (Indonesian Journal on Computer and Information Technology)*, 6(2), 118–127. <https://doi.org/10.31294/ijcit.v6i2.808>
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparri, M., Reboredo-Rodríguez, P., Manna, P., Zhang, J., Bravo Lamas, L., Martínez Florez, S., & Agudo Toyos, P. (2018). Polyphenol composition and antioxidant activity of honey: A comprehensive review. *Molecules*, 23(9), 2322.
<https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Ansary, J., Gil, E., Amici, A., Bompadre, S., Simal-Gandara, J., Giampieri, F., & Battino, M. (2020). Recent advances in the analysis of phenolic compounds in food by mass spectrometry. *Food Chemistry*, 325, 126881.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126881>
- Cinar, S. B., Eksi, A., & Coskun, I. (2014). Carbon isotope ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of pine honey and detection of HFCS adulteration. *Food Chemistry*, 157, 10–13.
- Ciucure, C. T., & Geană, E.-I. (2019). Phenolic compounds profile and biochemical properties of honeys in relationship to the honey floral sources. *Phytochemical Analysis*, 30(4), 481–492.
<https://doi.org/10.1002/pca.2825>
- Ciursă, P., Pauliuc, D., Dranca, F., Ropciuc, S., & Oroian, M. (2021). Detection of honey adulterated with agave, corn, inverted sugar, maple and rice syrups using FTIR analysis. *Food Control*, 130, 108266. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108266>
- Cocuron, J. C., Ross, Z., & Alonso, A. P. (2020). Liquid chromatography tandem mass spectrometry quantification of ^{13}C -labeling in sugars. *Metabolites*, 10(1), 30.
<https://doi.org/10.3390/metabo10010030>

- CODEX Alimentarius Commission. (2001). Adopting the draft revised standard for honey. *Alinorm*, 1(25), 22–24.
- Codex Alimentarius Commission. (1981). *Codex standard for honey (Codex Alimentarius 12-1981)*. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012e.pdf
- Codex Alimentarius Commission. (2001). *Council directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey*. Official Journal of the European Communities. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L110&from=EN>
- Codex Standard, (2001). Revised codex standard for honey, 12-1981, Rev. 1 (1987), Rev.2 (2001). In (Vol. 12, pp. 1-7). <https://www.fao.org/3/x4616e/x4616e0b.htm>.
- Corradini, C., Cavazza, A., & Bignardi, C. (2012). High-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: Principles and applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012, 1–12.
- Corbella, E., & Cozzolino, D. (2006). Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics. *Food Science and Technology*, 39(5), 534–539. <https://doi.org/10.1590/S0104-74062006000500008>
- Cordella, C., Militão, J. S. L. T., Clément, M.-C., Drajnudel, P., & Cabrol-Bass, D. (2005). Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: Preliminary study using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 531(2), 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.018>
- Cortés, V., Blasco, J., Aleixos, N., Cubero, S., & Talens, P. (2019). Monitoring strategies for quality control of agricultural products using visible and near-infrared spectroscopy: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 85, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.015>

- Corzo, N., & Sanz, M. L. (2008). HPAEC–PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food Chemistry*, 107(2), 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.006>
- Cotte, J. F., Casabianca, H., Lheritier, J., Perrucchietti, C., Sanglar, C., Waton, H., & Grenier-Loustalot, M. F. (2007). Study and validity of ¹³C stable carbon isotopic ratio analysis by mass spectrometry and ²H site-specific natural isotopic fractionation by nuclear magnetic resonance isotopic measurements to characterize and control the authenticity of honey. *Analytica Chimica Acta*, 582, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.011>
- Cotte, J. F., Casabianca, H., Chardon, S., Lheritier, J., & Grenier-Loustalot, M. F. (2003). Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of Chromatography A*, 1021(1-2), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.008>
- Crane, E. (Ed.). (1975). *Honey: A comprehensive survey*. Heinemann.
- Crawford, C. W. (1954). The long fight for pure foods. In *Marketing: The yearbook for agriculture* (p. 211). U.S. Government Printing Office.
- Da Costa Leite, J. M., Trugo, L. C., Costa, L. S. M., Quinteiro, L. M. C., Barth, O. M., Dutra, V. M. L., & DeMaria, C. A. B. (2002). Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. *Food Chemistry*, 70(1), 93–98. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00061-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00061-0)
- Damto, T. (2019). *A review on effect of adulteration on honey properties*. SSRN. <https://doi.org/10.2139/ssrn>
- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, C., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- De La Fuente, E., Ruiz-Matute, A. I., Valencia-Barrera, R. M., Sanz, J., & Martínez-Castro, I. (2011). Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. *Food Chemistry*, 129(4), 1483–1489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.103>
- De Souza, R. R., Fernandes, D. D. de S., & Diniz, P. H. G. D. (2021). Honey authentication in terms of its adulteration with sugar syrups using UV–vis spectroscopy and one-class classifiers. *Food*

- Chemistry*, 365, 130467.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130467>
- Dewdney, J. M., Maes, L., Raynaud, J. P., Blanc, F., Scheid, J. P., Jackson, T., Lens, S., & Verschueren, C. (1991). Risk assessment of antibiotic residues of β -lactams and macrolides in food products with regard to their immunoallergic potential. *Food and Chemical Toxicology*, 29(7), 477–483.
[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(91\)90040-V](https://doi.org/10.1016/0278-6915(91)90040-V)
- Dharmananda, S. (2003). *Traces of chloramphenicol in Chinese bee products: Origin, development, and resolution*.
<http://www.itmonline.org/arts/bees.htm>
- Directive, Council 2001/110/EC (2001). Council Directive of 20 December relating to honey 2001/110/EC. In: Official Journal of the European Communities.
<https://wipo.lex.wipo.int/en/text/236319>
- Di Rosa, A. R., Leone, F., Cheli, F., & Chiofalo, V. (2018). Novel approach for the characterisation of Sicilian honeys based on the correlation of physicochemical parameters and artificial senses. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), 389–397.
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1542408>
- Dobre, I., Georgescu, L. A., Alexe, P., Escuredo, O., & Seijo, M. C. (2012). Rheological behavior of different honey types from Romania. *Food Research International*, 49(1), 126–132.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.030>
- Dodd, S., Haughey, S. A., Connolly, L., & Elliott, C. T. (2025). The potential for DNA metabarcoding to identify the floral origin of honey. *Food Control*, 167, 110772.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.110772>
- Dong, H., Luo, D., Xian, Y., Luo, H., Guo, X., Li, C., & Zhao, M. (2016). Adulteration identification of commercial honey with the C-4 sugar content of negative values by an elemental analyzer and liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(14), 3258–3265. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00635>
- Dong, H., Xiao, K., & Xian, Y. (2017). Isotope ratio mass spectrometry coupled to element analyzer and liquid chromatography to identify commercial honeys of various botanical types. *Food*

- Analytical Methods*, 10(9), 2755–2763.
<https://doi.org/10.1007/s12161-017-0857-5>
- Doner, L. W. (1977). The sugars of honey: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(5), 443–456.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740280508>
- Donkersley, P., Rhodes, G., Pickup, R. W., Jones, K. C., Power, E. F., Wright, G. A., & Wilson, K. (2017). Nutritional composition of honey bee food stores vary with floral composition. *Oecologia*, 185(4), 749–761. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3968-3>
- Du, B., Wu, L., Xue, X., Chen, L., Li, Y., Zhao, J., & Cao, W. (2015). Rapid screening of multiclass syrup adulterants in honey by ultrahigh-performance liquid chromatography/quadrupole time of flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(24), 6614–6623. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03088>
- Dumté, M. (2010). *Development of a method for the quantitative detection of honey in imported products* (Master's thesis, University of Waikato). Research Commons. <https://researchcommons.waikato.ac.nz/handle/10289/4960>
- Dyson, N. (1990). *Chromatographic integration methods*. Royal Society of Chemistry.
- Dzulhijjah, A. N., Anraeni, S., & Sugiarti, S. (2021). Klasifikasi kematangan citra labu siam menggunakan metode KNN (K-Nearest Neighbor) dengan ekstraksi fitur HSV (Hue, Saturation, Value). *Buletin Sistem Informasi Dan Teknologi Islam*, 2(2), 103–110. <https://doi.org/10.33096/busiti.v2i2.808>
- El-Biale, N. M., El-Biale, A. M., Harith, M. A., Rania, K. I., & Darwish, E. M. (2013). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(11), 132–138.
- El-Biale, N. M., & Sorour, M. A. (2011). Effect of adulteration on honey properties. *International Journal of Applied Science and Technology*, 1(4), 1–11.
https://www.ijastnet.com/journals/Vol_1_No_4_June_2011/1.pdf
- Eleazu, C. O., Iroaganachi, M. A., Eleazu, K. C., & Okoronkwo, J. O. (2013). Determination of the physicochemical composition microbial quality and free radical scavenging activities of some commercially sold honey samples in Aba Nigeria. The effect of

- varying colours. *International Journal of Biomedical Research*, 4(1), 32–41.
- Elflein, L., & Raezke, K. P. (2008). Improved detection of honey adulteration by measuring differences between $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyser-isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS). *Apidologie*, 39(5), 574–587. <https://doi.org/10.1051/apido:2008048>
- Erban, T., Shcherbachenko, E., Talacko, P., & Harant, K. (2021). A single honey proteome dataset for identifying adulteration by foreign amylases and mining various protein markers natural to honey. *Journal of Proteomics*, 239, 104157. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104157>
- Escuredo, O., Dobre, I., González, M., & Seijo, M. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.097>
- Escuredo, O., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138(2–3), 851–856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.091>
- Esteki, M., Regueiro, J., & Simal-Gándara, J. (2019). Tackling fraudsters with global strategies to expose fraud in the food chain. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 425–440. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12419>
- Etzold, E., & Lichtenberg-Kraag, B. (2008). Determination of the botanical origin of honey by Fourier-transformed infrared spectroscopy: An approach for routine analysis. *European Food Research and Technology*, 227(4), 579–586.
- EU. (2002). COUNCIL DIRECTIVE 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. Official Journal of the European Communities, L 10/47, 1–6
- Europa. (2010). *Summaries of EU legislation: Honey*. http://europa.eu.org/legislation_summaries/consumers/product_labelling_and_packaging/l21124a_en.htm
- European Commission. (2013). *Rapid alert system for food and feed portal*. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>

- Fairchild, G. F., Nichols, J. P., & Capps, O., Jr. (2003). Observations on economic adulteration of high-value food products: The honey case. *Journal of Food Distribution Research*, 34(2), 1–8.
- Fairchild, G. F., Capps, O. J., & Nichols, J. P. (2000). Impacts of economic adulteration on the U.S. honey industry.
- Fakhlaei, R., Selamat, J., Khatib, A., Razis, A. F. A., Sukor, R., Ahmad, S., & Babadi, A. A. (2020). The toxic impact of honey adulteration: A review. *Foods*, 9(10), 1538. <https://doi.org/10.3390/foods9101538>
- Fan, Y., Li, J., Guo, Y., Xie, L., & Zhang, G. (2021). Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement*, 171, 108829. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108829>
- Fansyuri, M., & Yunita, D. (2023). Implementasi K-Nearest Neighbor untuk klasifikasi jenis kelamin berdasarkan analisis citra wajah. *KLIK: Kajian Ilmiah Informatika dan Komputer*, 3(6), 1208–1216. <https://doi.org/10.30865/klik.v3i6.827>
- Fernandes, G. M., Silva, W. R., Barreto, D. N., Lamarca, R. S., Gomes, P. C. F. L., Petrucu, J. F. S., & Batista, A. D. (2020). Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry - A review. *Analytica Chimica Acta*, 1135, 187–203. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.010>
- Ferraro, J. R., & Nakamoto, K. (2012). *Introductory Raman spectroscopy*. Academic Press.
- Ferreira, C. F. I., Aires, E., Barreira, J., & Estevinho, M. L. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114(4), 1438–1443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.018>
- Flaudrops, C., Armstrong, N., Raoult, D., & Chabrière, E. (2015). Determination of the animal origin of meat and gelatin by MALDI-TOF-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.02.009>
- Florida Department of State. (2010). *Florida Administrative Weekly & Florida Administrative Code*. <https://www.flrules.org/gateway/ruleno.asp?id=5K-4.027>

- Folkes, D. J., & Jordan, M. A. (1996). Mono - and Disaccharides: Analytical Aspects. In M. A. C. Eliasson (Ed.), *Carbohydrates in Foods* (pp. 1–40). Taylor and Francis.
- Frasco, D. Scientific, T. F., & Amber, L. (2018). Analysis of honey color and HMF Content using a GENESYS UV-vis spectrophotometer. Thermo Fisher Scientific Inc
- Franco, M., Suarez, W. T., dos Santos, V. B., & Resque, I. S. (2021). A novel digital image method for determination of reducing sugars in aged and non-aged cachaças employing a smartphone. *Food Chemistry*, 338, 127800. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127800>
- Fritsche, J. (2018). Recent developments and digital perspectives in food safety and authenticity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(29), 7562–7567. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00843>
- Füzfai, Z. S., Boldizsár, I., & Molnár-Perl, I. (2008). Characteristic fragmentation patterns of the trimethylsilyl and trimethylsilyloxime derivatives of various saccharides as obtained by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1177(1-2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.087>
- Gallardo, J. M., Ortea, I., & Carrera, M. (2013). Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 52, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.019>
- Gallardo-Velazquez, T., Osorio-Revilla, G., de Loa, M. Z., & Rivera-Espinoza, Y. (2009). Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Research International*, 42(2), 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.11.004>
- Gan, Z., Yang, Y., Li, J., Wen, X., Zhu, M., Jiang, Y., & Ni, Y. (2016). Using sensor and spectral analysis to classify botanical origin and determine adulteration of raw honey. *Journal of Food Engineering*, 178, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.016>
- Garcia A. M., Ceresuela, S., Huidobro, J. F., Hermida, M., & Rodriguez Otero, J. L. (2002). Determination of polarimetric parameters of honey by near-infrared transreflectance spectroscopy. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 50(2), 419–425.
<https://doi.org/10.1021/jf010839f>
- García, N. L. (2018). The current situation on the international honey market. *Bee World*, 95(3), 89–94.
<https://doi.org/10.1080/0005772X.2018.1483814>
- Geana, E. I., & Ciucure, C. T. (2020). Establishing authenticity of honey via comprehensive Romanian honey analysis. *Food Chemistry*, 306, 125595.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125595>
- Geană, E.-I., Isopescu, R., Ciucure, C.-T., Gîjiu, C. L., & Josceanu, A. M. (2024). Honey adulteration detection via ultraviolet–visible spectral investigation coupled with chemometric analysis. *Foods*, 13(23), 3630. <https://doi.org/10.3390/foods13223630>.
- Gebremariam, T., & Brhane, G. (2014). Determination of quality and adulteration effects of honey from Adigrat and its surrounding areas. *International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research*, 2(4), 71–75.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2589.6800>
- Gemeda, M., & Negera, T. (2017). Assessing the effect of adulteration on honey and beeswax quality and designing way of identification in Oromia. *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)*, 5(8), 34–39.
<https://doi.org/10.20431/2349-0365.0508006>
- Ghasemi-Varnamkhashi, M., Mohtasebi, S. S., & Siadat, M. (2010). Biomimetic-based odor and taste sensing systems to food quality and safety characterization: An overview on basic principles and recent achievements. *Journal of Food Engineering*, 100(3), 377–387.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.05.006>
- Goyal, K., Kumar, P., & Verma, K. (2021). Food adulteration detection using artificial intelligence: A systematic review. *Archives of Computational Methods in Engineering*, 29(4), 1845–1874.
<https://doi.org/10.1007/s11831-021-09689-5>
- Granato, D., Putnik, P., Kovačević, D. B., Santos, J. S., Calado, V., Rocha, R. S., Da Cruz, A. G., Jarvis, B., Rodionova, O. Y., & Pomerantsev, A. (2018). Title of the article. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 663–677

- Grand View Research. (2022). Honey market size, share & trends analysis report by processing (organic, conventional), by distribution channel (hypermarkets & supermarkets, online, convenience stores), by region, and segment forecasts, 2022 – 2030.
https://www.grandviewresearch.com/Filters?search=honey&search_submit=
- Gebremariam, T., & Brhane, G. (2014). *International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research*, 2(3), 2347–4289.
- Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., & Severcan, F. (2015). Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis. *Food Chemistry*, 170, 234–240
- Grundy, H. H., Reece, P., Buckley, M., Solazzo, C. M., Dowle, A. A., Ashford, D., O'Connell, S., Haughey, S. A., & Elliott, C. T. (2016). A mass spectrometry method for the determination of the species of origin of gelatine in foods and pharmaceutical products. *Food Chemistry*, 190, 276–284.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.054>
- Guler, A., Kocaokutgen, H., Garipoglu, A. V., Onder, H., Ekinici, D., & Biyik, S. (2014). Detection of adulterated honey produced by honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies fed with different levels of commercial industrial sugar (C_3 and C_4 plants) syrups by the carbon isotope ratio analysis. *Food Chemistry*, 155, 155–160.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.033>
- Guler, A. Y., & Bek, V. (2008). Verification test of sensory analyses of comb and strained honeys produced as pure and feeding intensively with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food Chemistry*, 109(4), 891–898.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.012>
- Guler, A., Bakan, A., Nisbet, C., & Yavuz, O. (2007). Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food Chemistry*, 105(3), 1119–1125.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.002>
- Guo, Y., Chen, X., Zhang, X., Pu, S., Zhang, X., Yang, C., & Li, D. (2018). Comparative studies on ZIF-8 and SiO₂ nanoparticles as carrier

- for immobilized β -glucosidase. *Molecular Catalysis*, 459, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.08.004>
- Guo, J., Wong, J. X. H., Cui, C., Li, X., & Yu, H. Z. (2015). A smartphone-readable barcode assay for the detection and quantitation of pesticide residues. *Analyst*, 140(16), 5518–5525.
<https://doi.org/10.1039/c5an00874c>
- Guo, W., Liu, Y., Zhu, X., & Wang, S. (2011). Temperature dependent dielectric properties of honey associated with dielectric heating. *Journal of Food Engineering*, 102(2), 209–216.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.08.020>
- Harmita, A. A. K., Harahap, Y., & Supandi. (2019). *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*. PT. ISFI Penerbitan.
- Hassoun, A., Måge, I., Schmidt, W. F., Temiz, H. T., Li, L., Kim, H.-Y., Nilsen, H., Biancolillo, A., Aït-Kaddour, A., & Sikorski, M. (2020). [Judul artikel tidak disebutkan, mohon tambahkan jika ada]. *Foods*, 9(8), 1069. <https://doi.org/10.3390/foods9081069>
- Hawkins, J., de Vere, N., Griffith, A., Ford, C. R., Allainguillaume, J., Hegarty, M. J., Baillie, L., & Adams-Groom, B. (2015). Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences. *PLoS One*, 10(8), e0134735.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134735>
- Himawan, R. F. (2010). *Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)*.
- HMRC. (2023). *UK trade info, overseas trade data: HS-0409 natural honey*. <https://www.uktradeinfo.com/trade-data/ots-custom-table/>
- Höcherl, N., Siede, R., Illies, I., Gätschenberger, H., & Tautz, J. (2012). Evaluation of the nutritive value of maize for honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 58(2), 278–285.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.001>
- Honey (England) Regulations. (2015). *The honey (England) regulations 2015* (No. 1348). King's Printer of Acts of Parliament.
<https://www.legislation.gov.uk/uksi/2015/1348/made>
- Honey Market Size & Share Analysis - Growth Trends and Forecast (2025 - 2030)
 Source: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/honey-industry>

- Hong, E., Lee, S. Y., Jeong, J. Y., Park, J. M., Kim, B. H., Kwon, K., & Chun, H. S. (2017). Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 3877–3896. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8550>
- Hong, J. I., & Chang, B. (2014). Development of the smartphone-based colorimetry for multi-analyte sensing arrays. *Lab on a Chip*, 14(10), 1725–1732. <https://doi.org/10.1039/c3lc51451j>
- Hossen, M. S., Ali, M. Y., Jahurul, M. H. A., Abdel-Daim, M. M., Gan, S. H., & Khalil, M. I. (2017). Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review. *Pharmacological Reports*, 69(6), 1194–1205. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.06.002>
- Hossain, K. S., Hossain, M. G., Moni, A., Rahman, M. M., Rahman, U. H., Alam, M., Kundu, S., Rahman, M. M., Hannan, M. A., & Uddin, M. J. (2020). Prospects of honey in fighting against COVID-19: Pharmacological insights and therapeutic promises. *Heliyon*, 6(12), e05798. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05798>
- Huang, L., Liu, H., Zhang, B., & Wu, D. (2015). Application of electronic nose with multi-variate analysis and sensor selection for botanical origin identification and quality determination of honey. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 359–370. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1399-x>
- Iglesias, M. T., de Lorenzo, C., Polo, M. D. C., Martin-Alvarez, P. J., & Pueyo, E. (2004). Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys: Application to honeys from a small geographic area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 84–89. <https://doi.org/10.1021/jf0305062>
- Ilhamy, R. S., & Sanjaya, U. P. (2022). Algoritma K-Nearest Neighbors (KNN) untuk klasifikasi citra buah.
- Indra Pratama, F., Wijaya, A. P., Pratiwi, H., & Budianita, A. (2023). Klasifikasi kematangan buah apel berdasarkan warna dan tekstur menggunakan algoritma K-Nearest Neighbor. *Jurnal Ilmiah Intech: Information Technology Journal of UMUS*, 5(1), 11–18. <https://doi.org/10.46772/intech.v5i1.1119>
- Irawati, N., Isa, N. M., Mohamed, A. F., Rahman, H. A., Harun, S. W., & Ahmad, H. (2017). Optical microfiber sensing of adulterated

- honey. *IEEE Sensors Journal*, 17(17), 5510–5514.
<https://doi.org/10.1109/JSEN.2017.2721867>
- Irudayaraj, J., Xu, R., & Tewari, J. (2003). Rapid determination of invert cane sugar adulteration in honey using FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 68(6), 2040–2045.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb07015.x>
- Islam, M. K., Sostaric, T., Lim, L. Y., Hammer, K., & Locher, C. (2020). Sugar profiling of honeys for authentication and detection of adulterants using high-performance thin layer chromatography. *Molecules*, 25(22), 5289.
<https://doi.org/10.3390/molecules25225289>
- James, O. O., Mesutri, M. A., Usman, L. A., Yeye, S. O., Ajanaku, K. O., Ogunniran, K. O., Ajani, O. O., & Siyanbola, Y. O. (2009). Physical characterization of some honey samples from North-Central Nigerian. *International Journal of Physical Sciences*, 4(9), 464–470.
- Jasicka-Misiak, I., Makowicz, E., & Stanek, N. (2018). Analytical methods used in the study of honey. *European Food Research and Technology*, 244(7), 1169–1184.
<https://doi.org/10.1007/s00217-018-3037-y>
- Jiang, L., Xie, M., Chen, G., Qiao, J., Zhang, H., & Zeng, X. (2020). Phenolics and carbohydrates in buckwheat honey regulate the human intestinal microbiota. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, Article 6432942.
<https://doi.org/10.1155/2020/6432942>
- Johnson, R. (2014). *Food fraud and “economically motivated adulteration” of food and food ingredients* (Congressional Research Service Report No. R43358).
<https://fas.org/sgp/crs/misc/R43358.pdf>
- JRC. (2006). *Event-specific method for the quantitation of rice line LLRICE62 using real-time PCR*. Community Reference Laboratory for GM Food and Feed.
https://www.infogm.org/IMG/pdf/ccr_1507_59122_2006061_3.pdf
- Juan-Borrás, M., Domenech, E., Hellebrandova, M., & Escriche, I. (2014). Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tilia honeys. *Food*

- Research International*, 60, 86–94.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.007>
- Kalábová, K., Vorlová, L., Borkovcová, I., Smutná, M., & Večerek, V. (2003). Hydroxymethylfurfural in Czech honeys. *Czech Journal of Animal Science*, 48(12), 551–555.
- Kamal, A., & Klein, P. (2011). Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(1), 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.09.003>
- Kamble, S. S., Gunasekaran, A., & Sharma, R. (2020). Modelling the blockchain enabled traceability in agriculture supply chain. *International Journal of Information Management*, 52, 101967. <https://doi.org/10.1016/j.ijinfomgt.2019.05.023>
- Kane, D. E., & Hellberg, R. S. (2016). Identification of species in ground meat products sold on the U.S. commercial market using DNA-based methods. *Food Control*, 59, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.020>
- Kamboj, U., & Mishra, S. (2015). Prediction of adulteration in honey using rheological parameters. *International Journal of Food Properties*, 18(9), 2056–2063. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.962656>
- Kasprzyk, I., Depciuch, J., Grabek-Lejko, D., & Parlinska-Wojtan, M. (2018). FTIR-ATR spectroscopy of pollen and honey as a tool for unifloral honey authentication: The case study of rape honey. *Food Control*, 84, 33–40.
- Karabagias, I. K., Karabournioti, S., Karabagias, V. K., & Badeka, A. V. (2020). Palynological, physico-chemical and bioactivity parameters determination, of a less common Greek honeydew honey: “Dryomelo”. *Food Control*, 109, 106940. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106940>
- Karabagias, I. K., Vavoura, M. V., Nikolaou, C., Badeka, A. V., Kontakos, S., & Kontominas, M. G. (2014). Authenticity of honey: A comprehensive review. *Food Research International*, 62, 753–760. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.012>
- Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hashimoto, O., & Hayakawa, T. (1999). Analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein using liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

- Analytical Biochemistry*, 269(2), 297–303.
<https://doi.org/10.1006/abio.1999.4026>
- Kelly, J. D., Petisco, C., & Downey, G. (2006). Potential of near infrared transfectance spectroscopy to detect adulteration of Irish honey by beet invert syrup and high fructose corn syrup. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 14(2), 139–146.
<https://doi.org/10.1255/jnirs.619>
- Kenjeric, D., Mandic, M. L., Primorac, L., Bubalo, D., & Perl, A. (2007). Flavonoid profile of Robinia honeys produced in Croatia. *Food Chemistry*, 102(2), 683–690.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.034>
- Kerkvliet, J. D., & Meijer, H. A. J. (2000). Adulteration of honey: Relation between microscopic analysis and ¹³C/¹²C measurements. *Apidologie*, 31(6), 717–726.
<https://doi.org/10.1051/apido:2000160>
- Khalil, M. I., Alam, N., Moniruzzaman, M., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2011). Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. *Journal of Food Science*, 76(6), C921–C928.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02246.x>
- Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Boukraa, L., Benhanifia, M., Islam, M. A., Islam, M. N., & Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules*, 17(9), 11199–11215. <https://doi.org/10.3390/molecules170911199>
- Khakimov, B., Gürdeniz, G., & Engelsens, S. B. (2015). Trends in the application of chemometrics to foodomics studies. *Acta Alimentaria*, 44(1), 4–31.
<https://doi.org/10.1556/AAlim.44.2015.1.1>
- Khansaritoreh, E., Salmaki, Y., Ramezani, E., Azirani, T. A., Keller, A., Neumann, K., Alizadeh, K., Zarre, S., Beckh, G., & Behling, H. (2020). Employing DNA metabarcoding to determine the geographical origin of honey. *Heliyon*, 6(11), e05596.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05596>
- Kim, E. H., Seo, H. S., Ki, N. Y., Park, N., Lee, W., Do, J. A., Park, S., Baek, S. Y., Moon, B., Oh, H. B., & Hong, J. (2017). Reliable screening and confirmation of 156 multi-class illegal adulterants in dietary supplements based on extracted common ion chromatograms by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight-mass spectrometry. *Journal of*

- Chromatography* A, 1491, 43–56.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.066>
- Kim, M., & Day, D. F. (2011). Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(6), 803–807. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0885-x>
- Kingsta, R. M., Shamilee, M., & Sarumathi, S. (2018). Detection of adulteration in honey using optical sensor. *International Journal of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering*, 7(3), 1334–1339. <https://doi.org/10.15662/IJAREEIE.2018.0703032>
- Kohl, S. K., Landmark, J. D., & Stickle, D. F. (2006). Demonstration of absorbance using digital color image analysis and colored solutions. *Journal of Chemical Education*, 83(4), 644–646. <https://doi.org/10.1021/ed083p644>
- Krell, R. (1996). *Value-added products from beekeeping* (FAO Agricultural Services Bulletin No. 124). FAO.
- Kropf, U., Golob, T., Necemer, M., Kump, P., Korosec, M., Bertoncelj, J., & Ogrinc, N. (2010). Carbon and nitrogen natural stable isotopes in Slovene honey: Adulteration and botanical and geographical aspects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12794–12803. <https://doi.org/10.1021/jf102543w>
- Kropf, U., Bertoncelj, J., Korošec, M., Nečemer, M., Kump, P., Ogrinc, N., & Golob, T. (2009). *Geographical origin of Slovenian multifloral and forest honey*. *Apiacta*, 44, 33–42. Retrieved October 19, 2025, from http://www.apimondia.org/apiacta/articles/2009/geo_origin_slovanian_honey.pdf
- Kubota, M., Tsuji, M., Nishimoto, M., Wongchawalit, J., Okuyama, M., Mori, H., Matsui, H., Surarit, R., Svasti, J., Kimura, A., & Chiba, S. (2004). Localization of α -glucosidases I, II, and III in organs of European honeybees, *Apis mellifera* L., and the origin of α -glucosidase in honey. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(11), 2346–2352. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.2346>
- Kushnir, I. (1979). Sensitive thin layer chromatographic detection of high fructose corn syrup and other adulterants in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62(5), 917–920.

- Lai, T., Chang, T., & Wang, S. (2017). Gold nanoparticle-based colorimetric methods to determine protein contents in artificial urine using membrane micro-concentrators and mobile phone camera. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, 6376805. <https://doi.org/10.1155/2017/6376805>
- Lanjewar, M. G., Panchbhai, K. G., & Patle, L. B. (2024). Sugar detection in adulterated honey using hyper-spectral imaging with stacking generalization method. *Food Chemistry*, 450, 139322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.139322>
- Latha, R. S., & Lakshmi, P. K. (2012). Electronic tongue: An analytical gustatory tool. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 3(1), 3–8. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.93582>
- Laube, I., Hird, H., Brodmann, P., Ullmann, S., Schöne-Michling, M., Chisholm, J., & Broll, H. (2010). Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry*, 118(4), 979–986. <https://doi.org/10.1016/j.FOODCHEM.2008.09.063>
- Lawal, A. K., & Adekalu, J. B. (2009). Physicochemical studies on adulteration of honey in Nigeria. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(15), 1080–1084. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2009.1080.1084>
- Lazarević, K. B., Jovetić, M. S., & Tešić, Ž. L. (2017). Physicochemical parameters as a tool for the assessment of origin of honey. *Journal of AOAC International*, 100(4), 840–851. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0143>
- Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., Bacandritsos, N., & Sabatini, A. G. (2004). Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys. *Journal of Food Engineering*, 64(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.09.007>
- LeBlanc, B. W., Eggleston, G., Sammataro, D., Cornett, C., Dufault, R., Deeby, T., & Cyr, E. S. (2009). Formation of hydroxymethylfurfural in domestic high-fructose corn syrup and its toxicity to the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7369–7376. <https://doi.org/10.1021/jf901337b>
- Lee, W. I., Park, Y., Park, J., Shrivastava, S., Son, Y. M., Choi, H. J., Lee, J., Jeon, B., Lee, H., & Lee, N. E. (2019). A smartphone fluorescence

- imaging-based mobile biosensing system integrated with a passive fluidic control cartridge for minimal user intervention and high accuracy. *Lab on a Chip*, 19(8), 1502–1511. <https://doi.org/10.1039/c8lc01344f>
- Lichtenberg-Kraag, B. (2014). Evidence for correlation between invertase activity and sucrose content during the ripening process of honey. *Journal of Apicultural Research*, 53(3), 364–373. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.3.07>
- Li, F., Liu, Y., Wang, J., Xin, P., Zhang, J., Zhao, K., Zhang, M., Yun, H., & Ma, W. (2022). Comparative analysis of chloroplast genome structure and phylogenetic relationships among six taxa within the genus *Catalpa* (Bignoniaceae). *Frontiers in Genetics*, 13, 845619. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.845619>
- Li, X., Gao, L., & Chen, Z. (2019). Highly sensitive colorimetric detection of glucose through glucose oxidase and Cu²⁺-catalyzed 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine oxidation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 213, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.01.050>
- Li, Y., Zhang, Y., Li, H., Zhao, W., Guo, W., & Wang, S. (2018). Simultaneous determination of heat stable peptides for eight animal and plant species in meat products using UPLC-MS/MS method. *Food Chemistry*, 245, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.066>
- Li, S., Zhang, X., Shan, Y., Su, D., Ma, Q., Wen, R., & Li, J. (2017). Qualitative and quantitative detection of honey adulterated with high-fructose corn syrup and maltose syrup by using near-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 218, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.031>
- Li, S., Shan, Y., Zhu, X., Zhang, X., & Ling, G. (2012). Detection of honey adulteration by high fructose corn syrup and maltose syrup using Raman spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28(1), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.06.002>
- Li, B. W., & Schumann, P. J. (1981). Gas chromatographic analysis of sugars in granola cereals. *Journal of Food Science*, 46(2), 425–427. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb14589.x>
- Lin, B., Yu, Y., Cao, Y., Guo, M., Zhu, D., Dai, J., & Zheng, M. (2018). Point-of-care testing for streptomycin based on aptamer recognizing

- and digital image colorimetry by smartphone. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.028>
- Ling, C. N., & Sowndhararajan, K. (2020). A review on analytical methods for honey classification, identification and authentication. In *Honey analysis – New advances and challenges*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90232>
- Litton, C. (2011, June 10). Tainted honey sparks push for FDA standard. *ABC News*. <http://abcnews.go.com/Business/tainted-honey-sparks-pushfda-standard/story?id=13547820>
- Loomatix. (2017). *Color Grab* [Mobile application]. Google Play Store. https://play.google.com/store/apps/details?id=com.loomatix.colorgrab&hl=pt_BR
- Lopes, A. R., Moura, B. M. V., Grazina, L. M., Costa, J., Amaral, J. S., Pinto, M. A., & Mafra, I. (2023). Authentication of incense (*Pittosporum undulatum* Vent.) honey from the Azores (Mel dos Açores) by a novel real-time PCR approach. *Food Chemistry*, 411, 135492. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135492>
- Low, N. H., & Hammond, D. A. (1996). Detection of high fructose syrup from inulin in apple juice by capillary gas chromatography with flame ionization detection. *Fruit Processing*, 4, 135–139.
- Low, N. H., & Sporns, P. (1988). Analysis and quantification of minor di and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. *Journal of Food Science*, 53(2), 558–561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb07765.x>
- Machuca, G., Staforelli, J., Rondanelli-Reyes, M., Garces, R., Contreras-Trigo, B., Tapia, J., & Coelho, P. (2022). Hyperspectral microscopy technology to detect syrups adulteration of endemic guindo santo and quillay honey using machine-learning tools. *Foods*, 11(23), 3868. <https://doi.org/10.3390/foods11233868>
- Madesis, P., Ganopoulos, I., Sakaridis, I., Argiriou, A., & Tsaftaris, A. (2014). Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International*, 60, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.042>
- Magdalena, S. P., Wisniewska, T., Dymerski, J., Namieśnik, J., & Wardencki, W. (2014). Food Analysis Using Artificial Senses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62, 1423–1448. <https://doi.org/10.1021/jf403215y>

- Maione, C., Barbosa, F., & Barbosa, R. M. (2019). Predicting the botanical and geographical origin of honey with multivariate data analysis and machine learning techniques: a review. *Computers and Electronics in Agriculture*, 157, 436–446.
- Mannina, L., Sobolev, A. P., Di Lorenzo, A., Vista, S., Tenore, G. C., & Daglia, M. (2015). Chemical composition of different botanical origin honeys produced by Sicilian black honeybees (*Apis mellifera* ssp. *sicula*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(26), 5864–5874. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01196>
- Markom, M. A., Shakaff, A. Y. M., Adom, A. H., Ahmad, M. N., Hidayat, W., Abdullah, A. H., & Fikri, N. A. (2009). Intelligent electronic nose system for basal stem root disease detection. *Computers and Electronics in Agriculture*, 66(2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2009.01.002>
- Martin, N., & Maes, H. (1979). *Multivariate analysis*. Academic Press.
- Marudova, M., Eftimov, T., Nikolova, K., Bodurov, I., Vlaeva, I., & Grancharova, C. (2013). Advanced physics methods for honey's quality estimation. *International Scientific Practical Conference*, 3(4), 231–236.
- Maté, A. P., Osés, S. M., Marcazzan, G. L., Gardini, S., Muiño, F. M. A., & Sancho, T. M. (2018). Sugar composition and sugar-related parameters of honeys from the northern Iberian Plateau. *Journal of Food Composition and Analysis*, 74, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.08.005>
- Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., & Sancho, T. M. (2003). Significance of non-aromatic organic acids in honey. *Journal of Food Protection*, 66(12), 2371–2376.
- McDonald, C. M., Keeling, S. E., Brewer, M. J., & Hathaway, S. C. (2018). Using chemical and DNA marker analysis to authenticate a high-value food, manuka honey. *npj Science of Food*, 2(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41538-018-0016-6>
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91(3), 571–577.
- Megherbi, M., Herbreteau, B., Faure, R., & Salvador, A. (2009). Polysaccharides as a marker for detection of corn sugar syrup

- addition in honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 2105–2111.
- Meng, X., Schultz, C. W., Cui, C., Li, X., & Yu, H. (2015). On-site chip-based colorimetric quantitation of organophosphorus pesticides using an office scanner. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 215, 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.04.011>
- Meo, S. A., Al-Asiri, S. A., Mahesar, A. L., & Ansari, M. J. (2017). Role of honey in modern medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5), 975–978
- Merck. (2009). *The Merck Manual: Chloramphenicol*. Merck Manuals. http://www.merckmanuals.com/professional/infectious_diseases/bacteria_and_antibacterial_drugs/chloramphenicol.html#v1003117
- Mesnage, R., Agapito-Tenfen, S. Z., Vilperte, V., Renney, G., Ward, M., Séralini, G.-E., et al. (2016). An integrated multi-omics analysis of the NK603 Roundup-tolerant GM maize reveals metabolism disturbances caused by the transformation process. *Scientific Reports*, 6, 37855. <https://doi.org/10.1038/srep37855>
- Mid-Atlantic Apicultural Research & Extension Consortium. (2005). *Chemicals & drugs approved for legal use in honey bee colonies for the control of parasites and pests of honey bees*. <https://agdev.anr.udel.edu/maarec/wpcontent/uploads/2010/03/CHEMICA1.PDF>
- Mignani, A. G., Ciaccheri, L., Mencaglia, A. A., Sanzo, R. D., Carabetta, S., & Russo, M. (2016). Dispersive Raman spectroscopy for the nondestructive and rapid assessment of the quality of southern Italian honey types. *Journal of Lightwave Technology*, 34(20), 4479–4485. <https://doi.org/10.1109/JLT.2016.2580965>
- Miguel, M. G., Antunes, M. D., & Faleiro, M. L. (2017). Honey as a source of antioxidants: Its application in inflammatory diseases. *Integrative Medicine Insights*, 12, 1–15. <https://doi.org/10.1177/1178693717702447>
- Minaei, S., Shafiee, S., Polder, G., Moghadam-Charkari, N., Van Ruth, S., Barzegar, M., & Kuś, P. M. (2017). VIS/NIR imaging application for honey floral origin determination. *Infrared Physics & Technology*, 86, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2017.09.001>

- Mishra, S., Kamboj, U., Kaur, H., & Kapur, P. (2010). Detection of jaggery syrup in honey using near-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 61(3), 306–315. <https://doi.org/10.3109/09637480903332021>
- Misslera, J., Wiezorek, T., & Beckh, G. (2016). Mannose: A marker for adulteration with syrup or resin treatment of blossom honey. *Microchemical Journal*, 16, 17–20. <https://doi.org/10.1255/mrfs.4>
- Montaz, M., Bubli, S. Y., & Khan, M. S. (2023). Mechanisms and health aspects of food adulteration: A comprehensive review. *Foods*, 12(1), 199. <https://doi.org/10.3390/foods12010199>
- Moniruzzaman, M., Sulaiman, A. S., Khalil, I. M., & Gan, S. H. (2013). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of sourwood and other Malaysian honeys: a comparison with manuka honey. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-38>
- Montilla, A., Ruiz-Matute, A. I., Sanz, M. L., Martínez-Castro, I., & del Castillo, M. D. (2006). Diffructose anhydrides as quality markers of honey and coffee. *Food Research International*, 39(7), 801–806. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.03.002>
- Montowska, M., & Fornal, E. (2017). Label-free quantification of meat proteins for evaluation of species composition of processed meat products. *Food Chemistry*, 237, 1092–1100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.059>
- Moore, J. C., Spink, J., & Lipp, M. (2012). Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, 77(4), R118–R126. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02657.x>
- Morales, V., Corzo, N., & Sanz, M. L. (2008). HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food Chemistry*, 107(2), 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.050>
- Moškrič, A., Mole, K., & Prešern, J. (2021). EPIC markers of the genus *Apis* as diagnostic tools for detection of honey fraud. *Food Control*, 121, 107634. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107634>

- Muchtar, M., & Muchtar, R. A. (2024). *Perbandingan Metode Knn Dan Svm Dalam Klasifikasi Kematangan Buah Mangga Berdasarkan Citra Hsv Dan Fitur Statistik*. *Jurnal Informatika dan Teknik Elektro Terapan*, 12(2). DOI: 10.23960/jitet.v12i2.4010.
- Muhammad, D. I., Ermatita, E., & Falih, N. (2021). Penggunaan K-Nearest Neighbor (KNN) untuk mengklasifikasi citra belimbing berdasarkan fitur warna. *Informatik : Jurnal Ilmu Komputer*, 17(1), 9. <https://doi.org/10.52958/iftk.v17i1.2132>
- Nababan, A., & Jannah, M. (2023). Implementasi algoritma k-nearest neighbor dalam klasifikasi citra sayur. *Jurnal Sains Riset (JSR)*, 13(2), 640–648. <https://doi.org/10.47647/jsr.v10i12>.
- Naggar, A. Y., Codling, G., Giesy, J. P., & Safer, A. (2018). Beekeeping and the need for pollination from an agricultural perspective in Egypt. *Bee World*, 95(2), 107–112.
- Naila, A., Julika, W. N., Flint, S., Sulaiman, A. Z., Mohamed, A., & Ajit, A. (2021). Analysis of adulterants in international honey available in the Maldives. *ACS Food Science & Technology*, 1(xx), 1373–1380.
- Naila, A., Flint, S. H., Sulaiman, A. Z., Ajit, A., & Weeds, Z. (2018). Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants. *Food Control*, 90, 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.027>
- National Honey Board. (2003). *Honey health and therapeutic qualities*. USA: The National Honey Board.
- National Health Commission of the People's Republic of China. (2011). *GB 14963-2011, National Food Safety Standard Honey*. Beijing: China Standard Press. <http://www.gov.cn/fuwu/bzxxcx/bzh.htm>
- Nayik, G. A., Suhag, Y., Majid, I., & Nanda, V. (2018). Discrimination of high-altitude Indian honey by chemometric approach according to their antioxidant properties and macro minerals. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(2), 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.03.002>
- Nehal, N., Choudhary, B., Nagpure, A., & Gupta, R. K. (2021). DNA barcoding: A modern age tool for detection of adulteration in food. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(5), 767–791. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874279>

- Nespeca, M. G., Vieira, A. L., Júnior, D. S., Neto, J. A. G., & Ferreira, E. C. (2020). Detection and quantification of adulterants in honey by LIBS. *Food Chemistry*, 311, 125886. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125886>
- Nichitoi, M. M., Josceanu, A. M., Isopescu, R., Isopencu, G., & Lavric, V. (2019). Romanian propolis extracts: Characterization and statistical analysis and modelling. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 81(4), 149–162.
- Nisbet, C., Kazak, F., & Ardal, Y. (2018). Determination of quality criteria that allow differentiation between honey adulterated with sugar and pure honey. *Biological Trace Element Research*, 185(1), 226–233. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1249-1>
- Nishimoto, M., Kubota, M., Tsuji, M., Mori, H., Kimura, A., Matsui, H., & Chiba, S. (2001). Purification and substrate specificity of honeybee, *Apis mellifera* L., α -glucosidase III. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(7), 1610–1616.
- Noviyanto, A., & Abdulla, W. H. (2020). Honey botanical origin classification using hyperspectral imaging and machine learning. *Journal of Food Engineering*, 265, 109684. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109684>
- Noviyanto, A., & Abdulla, W. H. (2021). Signifying the information carrying bands of hyperspectral imaging for honey botanical origin classification. *Journal of Food Engineering*, 292, 110281. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110281>
- Nozal, M. J., Bernal, J. L., Toribio, L., Alamo, M., Diego, J. C., & Tapia, J. (2005). The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of identical geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3095–3100. <https://doi.org/10.1021/jf048000p>
- Oddo, L. P., & Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: Descriptive sheets. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S38–S81. <https://doi.org/10.1051/apido:2004020>
- Oddo, L. P., & Pulcini, P. (1999). A scientific note on the Phadebas method for honeys with low enzyme content. *Apidologie*, 30(4), 347–348.
- Official Methods of Analysis, 5th Revision. (1999). *Official Methods of Analysis* (16th ed., Method 998.12). AOAC International.

- Official Journal of the European Communities, 2001. LL 10/47-L 10/52.12.1.2002.
- Council Directive 2001/110/EC of December 2001 Relating to Honey.
- Oguchi, T., Onishi, M., Chikagawa, Y., Kodama, T., Suzuki, E., Kasahara, M., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, S., Hino, A., Furui, S., & Kitta, K. (2009). Investigation of residual DNAs in sugar from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 50(1), 41–46. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.50.41>
- Ohana, D., Dalebout, H., Marissen, R. J., Wulff, T., Bergquist, J., Deelder, A. M., et al. (2016). Identification of meat products by shotgun spectral matching. *Food Chemistry*, 203, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.138>
- Ohdan, K., Kuriki, T., Takata, H., Kaneko, H., & Okada, S. (2020). Introduction of raw starch-binding domains into *Bacillus subtilis* α -amylase by fusion with the starch-binding domain of *Bacillus cyclomaltodextrin* glucanotransferase. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 3058–3064.
- Oncescu, V., Mancuso, M., & Erickson, D. (2014). Cholesterol testing on a smartphone. *Lab on a Chip*, 14(4), 759–763. <https://doi.org/10.1039/c3lc51194d>
- Orduna, R., Husby, E., Yang, Y. E., Ghosh, D., & Beaudry, F. (2015). Assessment of meat authenticity using bioinformatics, targeted peptide biomarkers and high-resolution mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A – Chemical Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 32(10), 1709–1717. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1064173>
- Oroian, M., Ropciuc, S., & Paduret, S. (2018). Honey authentication using rheological and physicochemical properties. *Journal of Food Science and Technology*, 55(12), 4711–4718. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3415-4>
- Ortea, G., O'Connor, A., & Maquet, A. (2016). Review on proteomics for food authentication. *Journal of Proteomics*, 147, 212–225. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.033>
- Ouchemoukh, S., Schweitzer, P., Bachir Bey, M., Djoudad-Kadji, H., & Louaileche, H. (2010). HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chemistry*, 121(2), 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.062>

- Ozbalci, B., Boyaci, I. K., Topcu, A., Kadilar, C., & Tamer, U. (2013). Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks. *Food Chemistry*, 136, 1444–1452.
- Padovan, G. J., De Jong, D., Rodrigues, L. P., & Marchini, J. S. (2003). Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. *Food Chemistry*, 82(4), 633–636. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00007-8)
- Pajak, A. P., & Świąło, A. G. (2015). Directions of colour changes of nectar honeys depending on honey type and storage conditions. *Journal of Apicultural Science*, 59(2), 59–69. <https://doi.org/10.1515/JAS-2015-0019>
- Pandey, R., Paidi, S. K., Valdez, T. A., Zhang, C., Spegazzini, N., Dasari, R. R., & Barman, I. (2017). Noninvasive monitoring of blood glucose with Raman spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, 50, 264–272.
- Paradkar, M. M., & Irudayaraj, J. (2002). Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 76(2), 231–239. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00244-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00244-8)
- Parasuraman, S., Anish, R., & Balamurugan, S. (2015, September). An overview of liquid chromatography-mass spectroscopy instrumentation. **Pharmacognosy Reviews**, 8(16), 95–105. <https://doi.org/10.5530/phm.2014.2.2>
- Pasias, I. N., Kiriakou, I. K., & Proestos, C. (2017). HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration. *Food Chemistry*, 229, 425–431.
- Pauliuc, D., Dranca, F., & Oroian, M. (2020). Antioxidant activity, total phenolic content, individual phenolics and physicochemical parameters suitability for Romanian honey authentication. *Foods*, 9(3), 306. <https://doi.org/10.3390/foods9030306>
- Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Ariño, A., Juan, T., & Herrera, A. (1994). Quality evaluation of Spanish rosemary (*Rosmarinus officinulis*) honey. *Food Chemistry*, 51(2), 207–210. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90153-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90153-6)
- Peris, M., & Escuder-Gilabert, L. (2016). Electronic noses and tongues to assess food authenticity and adulteration. *Trends in Food*

- Science & Technology*, 58, 40–54.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.006>
- Permana, A. P., Ainiyah, K., & Holle, K. F. H. (2021). Analisis perbandingan algoritma decision tree, kNN, dan naive Bayes untuk prediksi kesuksesan start-up. *JISKA (Jurnal Informatika Sunan Kalijaga)*, 6(3), 178–188.
<https://doi.org/10.14421/jiska.2021.6.3.178-188>
- Pessoa, K. D., Suarez, W. T., dos Reis, M. F., de Oliveira Krambeck Franco, M., Moreira, R. P. L., & dos Santos, V. B. (2017). A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 310–316.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.056>
- Phillips, T., & Abdulla, W. (2023). A new honey adulteration detection approach using hyperspectral imaging and machine learning. *European Food Research and Technology*, 249(2), 259–272.
<https://doi.org/10.1007/s00217-022-04113-9>
- Piovesana, S., Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., La Barbera, G., Zenezini Chiozzi, R., & Laganà, A. (2016). Labeling and label free shotgun proteomics approaches to characterize muscle tissue from farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Chromatography A*, 1428, 193–201.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.049>
- Piotraszewska-Pająk, A., & Ciszak, S. (2001). The influence of botanical origin on sugar composition, acidity and colour of nectar honeys. In *Proceedings of the 13th IGWT Symposium, Commodity Science in Global Quality Perspective* (pp. 705–710). Maribor, Slovenia.
- Pita-Calvo, C., & Vázquez, M. (2017). Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 79–87.
- Primorac, L., Flanjak, I., Kenjeric, D., Bubalo, D., & Topolnjak, Z. (2011). Specific rotation and carbohydrate profile of Croatian unifloral honeys. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(5), 515–519.
<https://doi.org/10.17221/323/2011-CJFS>
- Puscas, A., Hosu, A., & Cimpoi, C. (2013). Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *Journal*

- of Chromatography A*, 1272, 132–135.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.064>
- Pushparajah, T., & Nicholas, H. L. (2006). Adulteration of apple with pear juice: emphasis on major carbohydrates, proline, and arbutin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 4861–4867. <https://doi.org/10.1021/jf053177u>
- Ranneh, Y., Akim, A. M., Hamid, H. A., Khazaai, H., Fadel, A., Zakaria, Z. A., Albujja, M., & Bakar, M. F. A. (2021). Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03170-5>
- Ratsimba, V., García-Fernández, J. M., Defaye, J., Nigey, H., & Voilley, A. (1999). Qualitative and quantitative evaluation of mono- and disaccharides in D-fructose, D-glucose and sucrose caramels by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Di-D-fructose anhydrides as tracers of caramel authenticity. *Journal of Chromatography A*, 844(1-2), 283–293. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00406-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00406-8)
- Razavi, R., & Kenari, R. E. (2023). Ultraviolet-visible spectroscopy combined with machine learning as a rapid detection method to the predict adulteration of honey. *Heliyon*, 9(10), e20973. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20973>
- Reeve, A. (1992). Starch hydrolysis: Process and equipment. In F. W. Schenk & R. F. Hebeda (Eds.), *Starch hydrolysis products* (pp. 79–120). VCH Publishers Inc.
- Rehman, S., Khan, Z. F., & Maqbool, T. (2008). Physical and spectroscopic characterization of Pakistani honey. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 35(2), 199–204. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202008000200009>
- Ramirez-Cervantes, M. A., Gonzales-Novelo, S. A., & Sauri-Duch, E. (2000). Effect of the temporary thermic treatment of honey on variation of the quality of the same during storage. *Apiacta*, 35, 162–170.
- Rhee, Y., Shilliday, E. R., Matviychuk, Y., Nguyen, T., Robinson, N., Holland, D. J., Connolly, P. R. J., & Johns, M. L. (2023). Detection of honey adulteration using benchtop 1H NMR spectroscopy. *Analytical Methods*, 15(13), 1690–1699. <https://doi.org/10.1039/D2AY01757A>

- Ribeiro, R. D. O. R., Mársico, E. T., da Silva Carneiro, C., Monteiro, M. L. G., Júnior, C. C., & de Jesus, E. F. O. (2014). Detection of honey adulteration of high fructose corn syrup by Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF 1H NMR). *Journal of Food Engineering*, 135, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.03.023>
- Rinaudo, M. T., Ponzetto, C., Vidano, C., & Marletto, F. (1973). The origin of honey amylase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 46(2), 253–256.
- Rios-Corripio, M. A., Rojas-Lopez, M., & Delgado-Macuil, R. (2012). Analysis of adulteration in honey with standard sugar solutions and syrups using attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate methods. *CyTA - Journal of Food*, 10(2), 119–122.
- Rogers, K. M., Somerton, K., Rogers, P., & Cox, J. (2010). Eliminating false positive C4 sugar tests on New Zealand Manuka honey. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(16), 2370–2374.
- Ronkart, S. N., Blecker, C. S., Fourmanoir, H., Fougnyes, C., Deroanne, C., Van Herck, J. C., & Paquot, M. (2007). Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*, 604(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.09.035>
- Ropciuc, S., Dranca, F., Pauliuc, D., & Oroian, M. (2023). Honey authentication and adulteration detection using emission-excitation spectra combined with chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 293, 122459. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122459>
- Roussel, S., Bellon-Maurel, V., Roger, J. M., & Grenier, P. (2003). Authenticating white grape must variety with classification models based on aroma sensors, FT-IR and UV spectrometry. *Journal of Food Engineering*, 60(4), 407–419. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00098-3](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00098-3)
- Rubert, J., Lacina, O., Zachariasova, M., & Hajslova, J. (2016). Saffron authentication based on liquid chromatography high resolution tandem mass spectrometry and multivariate data analysis. *Food Chemistry*, 204, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.003>

- Ruiz-Garcia, L., Steinberger, G., & Rothmund, M. (2009). A model and prototype implementation for tracking and tracing agricultural batch products along the food chain. *Food Control*, 21(2), 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.12.003>
- Ruiz-Matute, A. I., Weiss, M., Sammataro, D., Finley, J., & Sanz, M. L. (2010a). Carbohydrate composition of high-fructose corn syrups (HFCS) used for bee feeding: Effect on honey composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7317–7322. <https://doi.org/10.1021/jf100650n>
- Ruiz-Matute, A. I., Rodriguez-Sanchez, S., Sanz, M. L., & Martinez-Castro, I. (2010b). Detection of adulterations of honey with high fructose syrups from inulin by GC analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(3), 273–276. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.06.011>
- Ruiz-Matute, A. I., Soria, A. C., Martínez-Castro, I., & Sanz, M. L. (2007a). A new methodology based on GC–MS to detect honey adulteration with commercial syrups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7264–7269. <https://doi.org/10.1021/jf071371n>
- Ruiz-Matute, A. I., Sanz, M. L., & Martinez-Castro, I. (2007b). Use of gas chromatography–mass spectrometry for identification of a new disaccharide in honey. *Journal of Chromatography A*, 1157(1-2), 480–483. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.044>
- Saa, D. L. T., Nissen, L., & Gianotti, A. (2019). Metabolomic approach to study the impact of flour type and fermentation process on volatile profile of bakery products. *Food Research International*, 119, 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.024>
- Saey, W., Do Trong, N. N., Van Beers, R., & Nicolaï, B. M. (2019). Multivariate calibration of spectroscopic sensors for postharvest quality evaluation: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 158, 110981. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110981>
- Sajali, N., Wong, S. C., Hanapi, U. K., Abu Bakar @ Jamaluddin, S., Tasrip, N. A., & Mohd Desa, M. N. (2018). The challenges of DNA extraction in different assorted food matrices: A review. *Journal of Food Science*, 83(10), 2409–2414. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14338>

- Samat, S., Enchang, F. K., Abd Razak, A., Hussein, F. N., & Ismail, W. I. W. (2018). Adulterated honey consumption can induce obesity, increase blood glucose level and demonstrate toxicity effects. *Sains Malaysiana*, 47(2), 353–365. <https://doi.org/10.17576/jsm-2018-4702-18>
- Sanz, M. L., Sanz, J., & Martínez-Castro, I. (2004). Gas chromatographic–mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. *Journal of Chromatography A*, 1059(1-2), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.053>
- Serazetdinova, L., Garratt, J., Baylis, A., Stergiadis, S., Collison, M., & Davis, S. (2019). How should we turn data into decisions in AgriFood? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(7), 3213–3219. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9545>
- Sassi, M., Arena, S., & Scaloni, A. (2015). MALDI-TOF-MS platform for integrated proteomic and peptidomic profiling of milk samples allows rapid detection of food adulterations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(24), 6157–6171. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02384>
- Sato, T., Katayama, K., Arai, T., Sako, T., & Tazaki, H. (2008). Simultaneous determination of serum mannose and glucose concentrations in dog serum using high performance liquid chromatography. *Research in Veterinary Science*, 84(1), 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.03.002>
- Sazvar, Z., Rahman, M., & Govindan, K. (2018). A sustainable supply chain for organic, conventional agro-food products: The role of demand substitution, climate change and public health. *Journal of Cleaner Production*, 194, 564–583.
- Schneider, A. (2011a). Asian honey, banned in Europe, is flooding U.S. grocery store shelves. Retrieved from <http://www.foodsafetynews.com/2011/08/honey-laundering/>
- Schneider, A. (2011b). Tests show that most store honey isn't honey. Retrieved from <http://www.foodsafetynews.com/2011/11/tests-show-moststore-honey-isnt-honey/>
- Se, K. W., Wahab, R. A., Syed Yaacob, S. N., & Ghoshal, S. K. (2019). Honey classification and adulteration detection using

- physicochemical properties, high performance liquid chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy with chemometric analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 80, 16–32. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.04.004>
- Se, K. W., Raja Ibrahim, R. K., Wahab, R. A., & Ghoshal, S. K. (2018a). Accurate evaluation of sugar contents in stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey using a swift scheme. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.006>
- Se, K. W., Ghoshal, S. K., Wahab, R. A., Raja Ibrahim, R. K., & Lani, M. N. (2018b). A simple approach for rapid detection and quantification of adulterants in stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey. *Food Research International*, 105, 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.057>
- Shafiee, S., Minaei, S., Moghaddam-Charkari, N., & Barzegar, M. (2014). Honey characterization using computer vision system and artificial neural networks. *Food Chemistry*, 159, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.136>
- Shafiee, S., Polder, G., Minaei, S., Moghadam-Charkari, N., Van Ruth, S., & Kuś, P. M. (2016). Detection of honey adulteration using hyperspectral imaging. *IFAC PapersOnLine*, 49(16), 311–314. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.10.057>
- Shao, Y., Shi, Y., Xuan, G., Li, Q., Wang, F., Shi, C., & Hu, Z. (2022). Hyperspectral imaging for non-destructive detection of honey adulteration. *Vibrational Spectroscopy*, 118, 103340. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2022.103340>
- Shrivastava, A. (2018). Adulteration Analysis of Honey (2014–2017). In *Adulteration Analysis of Some Foods and Drugs* (Vol. 1, pp. 65–79). Bentham Science Publishers. <https://doi.org/10.2174/9781681086750118010007>
- Shiddiq, M., Zulkarnain, Z., Asyana, V., & Aliyah, H. (2019). Identification of pure and adulterated honey using two spectroscopic methods. *Journal of Physics: Conference Series*, 1351(1), 012022. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1351/1/012022>
- Shiddiq, M. R., Salambue, Nadia, Z., Yasmin, F., Lismayeni, S., Fitridhani, H., & Adzani. (2018). *Journal of Physics: Conference Series*, 1120, 012053.

- Siddiqui, A. J., Musharraf, S. G., Choudhary, M. I., & Rahman, A. (2017). Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food Chemistry*, 217, 687–698. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.001>
- Siddiqui, I. R. (1970). The sugars of honey. *Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry*, 25, 285–309.
- Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O. C., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309–323.
- Simsek, A., Bilsel, M., & Goren, A. C. (2012). 13C/12C pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS. *Food Chemistry*, 130, 1115–1121.
- Singh, R. (2021). Current honey market in India - volume and value. *International Journal of Ayurveda and Pharma Research*, 9(8), 82–88. <https://doi.org/10.47070/ijapr.v9i8.2050>
- Singh, N., & Bath, P. K. (1997). Quality evaluation of different types of Indian honey. *Food Chemistry*, 58(1–2), 129–133.
- Sipahi, H., Aydoğan, G., Helvacioğlu, S., Charehsaz, M., Guzelmeric, E., & Aydin, A. (2017). Antioxidant, antiinflammatory and antimutagenic activities of various kinds of Turkish honey. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(1), 7.
- Sivakesava, S., & Irudayaraj, J. (2001). Prediction of inverted cane sugar adulteration of honey by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Sciences*, 66(7), 972–978.
- Sivakesava, S., & Irudayaraj, J. (2002). Classification of simple and complex sugar adulterants in honey by mid-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(4), 351–360.
- Smetanska, I., Alharthi, S. S., & Selim, K. A. (2021). Physicochemical, antioxidant capacity and color analysis of six honeys from different origin. *Journal of King Saud University – Science*, 33(5), Article 101447. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101447>
- Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2017a). Honey analysis: An overview of current and emerging techniques for the evaluation of authenticity, botanical origin and geographical origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1072–1100. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12300>

- Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2017b). A comprehensive review on the main honey authentication issues: Production and origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1072–1100.
- Soares, S., Grazina, L., Costa, J., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2018). Botanical authentication of lavender (*Lavandula* spp.) honey by a novel DNA-barcoding approach coupled to high resolution melting analysis. *Food Control*, 86, 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.046>
- Sobrinho-Gregorio, L., Vilanova, S., Prohens, J., & Escriche, I. (2019). Detection of honey adulteration by conventional and real-time PCR. *Food Control*, 95, 57–62. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.07.037>
- Sonka, M., Hlavac, V., & Boyle, R. (2014). *Image processing, analysis, and machine vision*. Cengage Learning.
- Spiteri, M., Jamin, E., Thomas, F., Rebours, A., Lees, M., Rogers, K. M., & Rutledge, D. N. (2015). Fast and global authenticity screening of honey using 1H-NMR profiling. *Food Chemistry*, 189, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.099>
- Stahl, A., & Schröder, U. (2017). Development of a MALDI-TOF MS-based protein fingerprint database of common food fish allowing fast and reliable identification of fraud and substitution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(30), 7519–7527. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02826>
- Standifer, L. N., Moeller, F. E., Kauffeld, N. M., Herbert, E. W. J., & Shimanuki, H. (1977). Supplemental feeding of honey bee colonies. Retrieved from <http://www.beesource.com/resources/usda/supplemental-feeding-of-honeybee-colonies/>
- Standar Nasional Indonesia. (2013). *Madu*. SNI 01-3545-2013. (Standar Nasional Indonesia).
- Stefas, D., Gyftokostas, N., Kourelas, P., Nanou, E., Tananaki, C., Kanelis, D., Liolios, V., Kokkinos, V., Bouras, C., & Couris, S. (2022). Honey discrimination based on the bee feeding by laser induced breakdown spectroscopy. *Food Control*, 134, Article 108770. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108770>

- Stephan, A., Bucking, M., & Steinhart, H. (2000). Novel analytical tools for food flavours. *Food Research International*, 33(3-4), 199–209.
- Stinson, E. E., Subers, M. H., Petty, J., & White Jr, J. W. (1960). The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 89(1), 6–12.
- Stober, P., Martin, G., & Peppard, T. L. (1998). Quantitation of the undeclared addition of industrially produced sugar syrups to fruit by juices capillary gas chromatography. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 9, 309–315.
- Subari, N., Saleh, J. M., & Shakaff, A. Y. M. (2012). A hybrid sensing approach for pure and adulterated honey classification. *Sensors*, 12(10), 14022–14040.
- Sugar, J., & Bour, P. (2016). Quantitative analysis of sugar composition in honey using 532-nm excitation Raman and Raman optical activity spectra. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47(12), 1298–1303.
- Swallow, K. W., & Low, N. H. (1990). Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid-chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(9), 1828–1832.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermat, T., Corthier, G., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2007). Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, 35(3), Article e14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl938>
- Tafere, D. A. (2021). Chemical composition and uses of honey: A review. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 4, 194–201.
- Takahashi, Y., Yoshida, I., Yokozeki, T., Igarashi, T., & Fujita, K. (2023). Investigation of foreign amylase adulteration in honey distributed in Japan by rapid and improved native PAGE activity staining method. *Journal of Applied Glycoscience*, 70(3), 67–73. https://doi.org/10.5458/jag.jag.IAG-2023_0002
- Tan, Y., Tong, Z., Yang, Q., Sun, Y., Jin, X., Peng, C., et al. (2017). Proteomic analysis of phytase transgenic and non-transgenic

- maize seeds. *Scientific Reports*, 7(1), 9246.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09557-8>
- Tantillo, G., Marchetti, P., Mottola, A., Terio, V., Di Pinto, A., & Martella, V. (2015). Occurrence of mislabelling in prepared fishery products in Southern Italy. *Italian Journal of Food Safety*, 4(3).
<https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.5358>
- Terrab, M. J., Diez, C. A., & Andres, C. (2004). Physicochemical parameters and pollen analysis of Moroccan honeydew honeys. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(2), 167–176.
- Teye, E., Amuah, C. L. Y., Lamptey, F. P., Obeng, F., & Nyorkeh, R. (2024). Artificial intelligence for honey integrity in Ghana: A feasibility study on the use of smartphone images coupled with multivariate algorithms. *Smart Agricultural Technology*, 8, 100453. <https://doi.org/10.1016/j.atech.2024.100453>
- Tibbott, B. K., Wong, D. W. S., & Robertson, G. H. (2002). Studies on the C-terminal region of barley α -amylase 1 with emphasis on raw starch-binding. *Biologia Bratislava*, 57(3), 229–238.
- Tibola, C. S., da Silva, S. A., Dossa, A. A., & Patrício, D. I. (2018). Economically motivated food fraud and adulteration in Brazil: Incidents and alternatives to minimize occurrence. *Journal of Food Science*, 83(8), 2028–2038.
- Tiwari, K., Tudu, B., Bandyopadhyay, R., & Chatterjee, A. (2013). Identification of mono-floral honey using voltammetric electronic tongue. *Journal of Food Engineering*, 117(2), 205–210.
- Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O. S., Tastemur, B., Sagdic, O., ... & Kayacier, A. (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*, 46, 124–131.
- Tosun, M. (2013). Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis method. *Food Chemistry*, 138(2), 1629–1632.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.068>
- Trifković, J., Andrić, F., Ristivojević, P., Guzelmeric, E., & Yesilada, E. (2017). Analytical methods in tracing honey authenticity. *Journal of AOAC International*, 100(4), 827–839.
<https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0142>

- Truong, A.-T., Kim, S., & Yoon, B. (2022). Determination of honey adulterated with corn syrup by quantitative amplification of maize residual DNA using ultra-rapid real-time PCR. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(2), 774–781. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11411>
- Tsagkaris, A. S., Koulis, G. A., Danezis, G. P., Martakos, I., Dasenaki, M., Georgiou, C. A., & Thomaidis, N. S. (2021). Honey authenticity: Analytical techniques, state of the art and challenges. *RSC Advances*, 11(19), 11273–11294. <https://doi.org/10.1039/D1RA00069A>
- Tuberoso, C. I. G., Jerković, I., Sarais, G., Congiu, F., Marijanović, Z., & Kuš, P. M. (2014). Color evaluation of seventeen European unifloral honey types by means of spectrophotometrically determined CIE LCab*h(ab)[°] chromaticity coordinates. *Food Chemistry*, 145, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.032>
- Tura, A. G., & Seboka, B. D. (2020). Review on honey adulteration and detection of adulterants in honey. *International Journal of Gastroenterology*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.11648/j.ijg.20200401.11>
- U.S. Department of Health and Human Services. (2007). *Statement by Murray M. Lumpkin M.D., Deputy Commissioner International and Special Programs on Safety of Chinese Imports: Oversight and analysis of the federal response* [Testimony before the Commerce, Science, and Transportation Committee, U.S. Senate]. <http://www.hhs.gov/asl/testify/2007/07/t20070718a.htm>
- Ulloa, P. A., Guerra, R., Cavaco, A. M., de Costa, A. M. R., Figueira, A. C., & Brigas, A. F. (2013). Determination of the botanical origin of honey by sensor fusion of impedance e-tongue and optical spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture*, 94, 1–11.
- United States 111th Congress. (2011). *FDA Food Safety Modernization Act* (Public Law 111-353). <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-111publ353/pdf/PLAW-111publ353.pdf>
- United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. (2013). *Honey bees and colony collapse disorder*.

- Retrieved from
<http://www.ars.usda.gov/News/docs.htm?docid=15572#history>
- United States Department of Agriculture Economic Research Service. (2013a). *National nutrient database for standard reference, Release 26*. Retrieved from
<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>
- United States Department of Agriculture Economic Research Service. (2013b). *Sugar and sweeteners outlook*. Retrieved from
<http://www.ers.usda.gov/publications/sssm-sugar-and-sweeteners-outlook/sssm296.aspx#.UhvKW3Eesg>
- United States Department of Agriculture Economic Research Service. (2013c). *Sugar and sweeteners yearbook tables*. Retrieved from
<http://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables.aspx#.UVX2E1dy024>
- United States Department of Justice. (1995). *Five persons indicted in honey adulteration conspiracy*. Retrieved from
http://www.justice.gov/opa/pr/Pre_96/January95/47.txt.html
 1
- United States District Court Northern District of Illinois - Eastern Division. (2009). *United States of America v. Alexander Wolff, Jurgen Becker, Tom Weickert, Marcel Belten, Yi Liu, Sven Gehricke, Thomas Marten, Thomas Gerkmann, Stefanie Giesselbach, Magnus von Buddenbrock, Gong Jie Chen (a/k/a "George Gao" and "George Chen"), Alfred L. Wolff GMBH, Alfred L. Wolff Honey GMBH, Alfred L. Wolff, Inc., Alfred L. Wolff (Beijing) Trade Co. Ltd., China, Alfred L. Wolff Company Ltd., Hong Kong, China, and QHD Sanhai Honey Co., Ltd.* (08 CR 417).
- United States Food and Drug Administration. (2011a). *Pathway to global product safety and quality*. Retrieved from
<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofGlobalRegulatoryOperationsandPolicy/GlobalProductPathway/default.htm>
- United States Food and Drug Administration. (2011b). *Public meeting on economically motivated adulteration*. Retrieved from
<http://www.fda.gov/NewsEvents/MeetingsConferencesWorkshops/ucm163619.htm>

- United States Food and Drug Administration. (2013a). *Food Safety Modernization Act: Imports*. Retrieved from <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/ucm257980.htm>
- United States Food and Drug Administration. (2013b). *Import Alert 36-01*. Retrieved from http://www.accessdata.fda.gov/CMS/IA/importalert_108.html
- United States Food and Drug Administration. (2013c). *Import Alert 36-03*. Retrieved from http://www.accessdata.fda.gov/CMS/IA/importalert_110.html
- United States Food and Drug Administration. (2013d). *Current good manufacturing practice and hazard analysis and risk-based preventive controls for human food*. Retrieved from <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=FDA-2011-N-0920-0001>
- United States International Trade Commission. (2013). *Honey from Argentina and China* (Investigation nos. 701-TA-402 and 731-TA-892-893; Publication no. 3369). Government Printing Office. Retrieved May 9, 2013, from http://www.usitc.gov/publications/701_731/pub3369.pdf
- United States Food and Drug Administration. (2012a). *Codex Alimentarius International Food Standards*. Retrieved December 3, 2012, from <http://www.codexalimentarius.org>
- United States International Trade Commission. (2012b). *USITC makes determination in five-year (Sunset) review concerning honey from China*. Retrieved from http://www.usitc.gov/press_room/news_release/2012/er1119kk1.htm
- United States International Trade Commission. (1994). *Honey from the People's Republic of China* (Investigation no. 731-TA-722, preliminary). Government Printing Office.
- Upadhyay, R., Sehway, S., & Mishra, H. N. (2017). Electronic nose guided determination of frying disposal time of sunflower oil using fuzzy logic analysis. *Food Chemistry*, 221, 379–385.
- Val, A., Huidobro, J. F., Sánchez, M. P., Muniategui, S., Fernández-Muiño, M. A., & Sancho, M. T. (1998). Enzymatic determination of galactose and lactose in honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1381–1385.

- Valentini, A., Miquel, C., & Taberlet, P. (2010). DNA barcoding for honey biodiversity. *Diversity*, 2(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/d2040610>
- Van Laere, A., & Van den Ende, W. (2002). Inulin metabolism in dicots: Chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment*, 25(7), 803–813.
- Veena, K. S., Sameena, M. T., Padmakumari, A. K. P., Srinivasa, G. T. K., Nishanth, K. S., & Reshma, M. V. (2018). Development and validation of HPLC method for determination of sugars in palm sap, palm syrup, sugarcane jaggery and palm jaggery. *International Food Research Journal*, 25(2), 649–654.
- Veloso, A. C. A., Sousa, M. E. B., Dias, L. G., & Peres, A. M. (2018). *Honey Evaluation Using Electronic Tongues: An Overview. Chemosensors*, 6, 0028.
- Vidal, N., Barbosa, H., Jacob, S., & Arruda, M. (2015). Comparative study of transgenic and non-transgenic maize (*Zea mays*) flours commercialized in Brazil, focussing on proteomic analyses. *Food Chemistry*, 180, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.051>
- Vit, P. (2013). *Melipona favosa* pot honey from Venezuela. In P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. Roubik (Eds.), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees* (pp. 363–374). Springer
- Voldřich, M., Rajchl, A., Čížková, H., & Cuhra, P. (2009). Detection of foreign enzyme addition into the adulterated honey. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(Supplement), S280–S282.
- Walker, M. J., Cowen, S., Gray, K., Hancock, P., & Burns, D. T. (2022). Honey authenticity: The opacity of analytical reports—Part 2, forensic evaluative reporting as a potential solution. *NPJ Science of Food*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41538-022-00127-5>
- Wang, W., Yang, B., Wang, J., Feng, X., Feng, C., Zhao, T., Shen, L., Wang, Q., Wu, Z., Zhang, S., & Ma, Z. (2020). Molecular and toxicity analyses of white granulated sugar and other processing products derived from transgenic sugarcane. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.596918>

- Wang, S., Guo, Q., Wang, L., Lin, L., Shi, H., Cao, H., & Cao, B. (2015). Detection of honey adulteration with starch syrup by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 172, 669–674.
- Wang, J., Xue, X., Du, X., Cheng, N., Chen, L., & Zhao, J. (2014). Identification of Acacia honey adulteration with Rape honey using liquid chromatography–electrochemical detection and chemometrics. *Food Analytical Methods*, 7(8), 2003–2012.
- Wang, J., Kliks, M. M., Jun, S., Jackson, M., & Li, Q. X. (2010). Rapid analysis of glucose, fructose, sucrose and maltose in honeys from different geographic regions using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Food Science*, 75(7), C208–C214
- Ward, Ronald W., & Boynton, B. (2009). *U.S. honey supply chain: Structural change, promotions and the China connection*. *International Journal on Food System Dynamics*, 1(1), 13–25.
- Wardani, N. W. (2020). Penerapan data mining dalam analytic CRM. *Yayasan Kita Menulis*.
<https://www.researchgate.net/publication/351776255>
- Wei, J., Yang, L., Luo, M., Wang, Y., & Li, P. (2019). Nanozyme-assisted technique for dual mode detection of organophosphorus pesticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 179, 17–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.041>
- White, J. W. (1992). Internal standard stable carbon isotope ratio method for determination of C-4 plant sugars in honey: Collaborative study, and evaluation of improved protein preparation procedure. *Journal of AOAC International*, 75(3), 543–548. <https://doi.org/10.1093/jaoac/75.3.543>
- White, J. W., & Winters, K. (1989). Honey protein as internal standard for stable carbon isotope ratio detection of adulteration honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 72(6), 907–911.
- White, J. W., Jr. (1980). Detection of honey adulteration by carbohydrate analysis. *Journal of AOAC International*, 63(1), 11–18.
- White, J. W., Jr. (1978). Methods for determining carbohydrates, hydroxymethylfurfural, and proline in honey: Collaborative

- study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62(3), 515–526.
- White, J. W., & Doner, L. W. (1978). Mass spectrometric detection of high fructose corn syrup in honey by use of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio: Collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 61(4), 746–750.
- White, J. W., Jr. (1964). Diastase in honey: The Schade method. *Journal of AOAC International*, 47(3), 486–488.
- White, J. W. Jr., Riethof, M. L., Subers, M. H., & Kushnir, I. (1962). Composition of American honeys (Tech. Bulletin No. 1261). United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- Wielogorska, E., Chevallier, O., Black, C., Galvin-King, P., Delêtre, M., Kelleher, C. T., Haughey, S. A., & Elliott, C. T. (2018). Development of a comprehensive analytical platform for the detection and quantitation of food fraud using a biomarker approach: The oregano adulteration case study. *Food Chemistry*, 239, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.083>
- Wikipedia. (2008). *Wikipedia*. Retrieved April 2008, from <http://en.wikipedia.org>
- Wilde, A. S., Haughey, S. A., Galvin-King, P., & Elliott, C. T. (2019). The feasibility of applying NIR and FT-IR fingerprinting to detect adulteration in black pepper. *Food Control*, 100, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.039>
- Wilson, A. D., & Baietto, M. (2011). Advances in electronic-nose technologies developed for biomedical applications. *Sensors*, 11(1), 1105–1176.
- Wirta, H., Abrego, N., Miller, K., Roslin, T., & Vesterinen, E. (2021). DNA traces the origin of honey by identifying plants, bacteria and fungi. *Scientific Reports*, 11(1), 4798. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84174-0>
- Wisconsin Legislative Documents. (2011). Rulemaking notices. Retrieved January 10, 2012, from https://docs.legis.wisconsin.gov/code/register/2011/666b/rulemaking_notices/1/1
- Wu, L., Du, B., Vander Heyden, Y., Chen, L., Zhao, L., Wang, M., & Xue, X. (2017a). Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey – A challenge. *TrAC Trends in Analytical*

- Wu, Y., Yang, Y., Liu, M., Wang, B., Li, M., & Chen, Y. (2017). Molecular tracing of the origin of six different plant species in bee honey using real-time PCR. *Journal of AOAC International*, 100(3), 744–752. <https://doi.org/10.5740/JAOACINT.16-0265>
- Wu, P., He, Y., Wang, H., & Yan, X. (2010). Conjugation of glucose oxidase onto Mn-doped ZnS quantum dots for phosphorescent sensing of glucose in biological fluids. *Analytical Chemistry*, 82(4), 1427–1433. <https://doi.org/10.1021/ac902531g>
- Xiao, Y., Xu, L., & Qi, L. (2017). Electrochemiluminescence bipolar electrode array for the multiplexed detection of glucose, lactate and choline based on a versatile enzymatic approach. *Talanta*, 165, 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.019>
- Xiujie, Z., Wujun, J., Wentao, X., Xiaying, L., Ying, S., Sha, L., & Hongsheng, O. (2019). Comparison of five endogenous reference genes for specific PCR detection and quantification of rice. *Rice Science*, 26(4), 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2019.04.005>
- Xue, X., Wang, Q., Li, Y., Wu, L., Chen, L., Zhao, J., & Liu, F. (2013). 2-Acetylfuran-3-Glucopyranoside as a novel marker for the detection of honey adulterated with rice syrup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(31), 7488–7493. <https://doi.org/10.1021/jf401912u>
- Yaacob, S. N. S., Huyop, F., Ibrahim, R. K. R., & Wahab, R. A. (2018). Identification of *Lactobacillus* spp. and *Fructobacillus* spp. isolated from fresh *Heterotrigona itama* honey and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. *Journal of Apicultural Research*, 57(3), 395–405.
- Yan, S., Sun, M., Wang, X., Shan, J., & Xue, X. (2022). A novel, rapid screening technique for sugar syrup adulteration in honey using fluorescence spectroscopy. *Foods*, 11(15), 2316. <https://doi.org/10.3390/foods11152316>
- Yang, M., Gao, Y., Liu, Y., Fan, X., Zhao, K., & Zhao, S. (2018). [Judul artikel tidak disebutkan]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20, 685–693.

- Yang, D., & Ying, Y. (2011). Applications of Raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 46(7), 539–560.
- Yilmaz, M. T., Tatlisu, N. B., Toker, O. S., Karaman, S., Dertli, E., Sagdic, O., & Arici, M. (2014). Steady, dynamic and creep rheological analysis as a novel approach to detect honey adulteration by fructose and saccharose syrups: Correlations with HPLC-RID results. *Food Research International*, 64, 634–646. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.009>
- Yong, C. H., Muhammad, S. A., Nasir, F. I., Mustafa, M. Z., Ibrahim, B., Kelly, S. D., & Seow, E. K. (2022). Detecting adulteration of stingless bee honey using untargeted ¹H NMR metabolomics with chemometrics. *Food Chemistry*, 368, 130808. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130808>
- Yu, W., Zou, W., Dhital, S., Wu, P., Gidley, M. J., Fox, G. P., & Gilbert, R. G. (2018). The adsorption of α -amylase on barley proteins affects the in vitro digestion of starch in barley flour. *Food Chemistry*, 241, 493–501.
- Yücel, Y., & Sultanoglu, P. (2013). Characterization of honeys from Hatay region by their physicochemical properties combined with chemometrics. *Food Bioscience*, 1(1), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.01.002>
- Zábrodská, B., & Vorlová, L. (2014). Adulteration of honey and available methods for detection—a review. *Acta Veterinaria Brno*, 83(S1), S85–S92. <https://doi.org/10.2754/avb201483S10S85>
- Zakaria, A., Shakaff, A. Y. M., Masnan, M. J., Ahmad, M. N., Adom, A. H., Jaafar, M. N., Ghani, S. A., Abdullah, A. H., Aziz, A. H. A., Kamarudin, L. M., Subari, N., & Fikri, N. A. (2011). A biomimetic sensor for the classification of honeys of different floral origin and the detection of adulteration. *Sensors*, 11(8), 7799–7822.
- Zdiniaková, T., Loerchner, C., De, R. O., Dimitrova, T., Kaklamanos, G., Breidbach, A., Respaldiza, H. M. A., Vaz, S. I. M., Paiano, V., Ulberth, F., & Maquet, A. (2023). EU Coordinated action to deter certain fraudulent practices in the honey sector. *JRC Publications Repository*. <https://doi.org/10.2760/184511>
- Zhang, X. H., Gu, H. W., Liu, R. J., Qing, X. D., & Nie, J. F. (2023). A comprehensive review of the current trends and recent

- advancements on the authenticity of honey. *Food Chemistry: X*, 19, 100850. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100850>
- Zhang, X.-H., Qing, X.-D., Mu, S.-T., Wang, D., Zheng, J.-J., Zhou, S.-J., ... Liu, Z. (2021a). Authentication of honey of different nectar sources and antioxidant property evaluation by phenolic composition analysis with chemometrics. *Food Control*, 124, Article 107900. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107900>
- Zhang, X.-H., Wang, D., Guo, W.-Y., et al. (2021b). Rapid identification of adulterated honey according to the targeted analysis of phenolic compounds using chemometrics. *European Food Research and Technology*, 247, 1975–1985. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03764-4>
- Zhang, Y., Li, X., Li, H., Song, M., Feng, L., & Guan, Y. (2014). Postage stamp-sized array sensor for the sensitive screening test of heavy-metal ions. *The Analyst*, 139(19), 4887–4893. <https://doi.org/10.1039/c4an01022a>
- Zheng, L., Cai, G., Wang, S., Liao, M., Li, Y., & Lin, J. (2019). A microfluidic colorimetric biosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 using gold nanoparticle aggregation and smartphone imaging. *Biosensors & Bioelectronics*, 124-125, 143-149.
- Zhu, X., Li, S., Shan, Y., Zhang, Z., Li, G., Su, D., & Liu, F. (2010). Detection of adulterants such as sweeteners materials in honey using near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Food Engineering*, 101(1), 92–97.
- Zuccato, V., Finotello, C., Menegazzo, I., Peccolo, G., & Schievano, E. (2017). Entomological authentication of stingless bee honey by H-NMR-based metabolomics approach. *Food Control*, 82, 145–153.

TENTANG PENULIS



La Ode Sumarlin, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta dilahirkan di Desa Liya Kabupaten Wakatobi, Kecamatan Wangi-Wangi pada 18 September 1975. Anak keenam dari enam bersaudara ini menamatkan studi sarjana (S-1) pada Jurusan Kimia Institut Pertanian Bogor (IPB) tahun 1998. Tahun 2004 menamatkan Program Magister Sains dari Program Ilmu Biokimia IPB. Pada Bulan September tahun 2012, penulis mendapat kesempatan untuk melanjutkan pendidikan S-3 Program Doktor pada Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, dengan mayor ilmu-ilmu faal dan khasiat obat, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor dan lulus Mei tahun 2017. Pada tahun 2024 menjadi Guru Besar Tetap bidang Ilmu Biokimia di Program Studi Kimia UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

Selama tahun 2000 sampai 2012 penulis telah memiliki pengalaman bekerja sebagai pengajar di beberapa universitas, di antaranya Universitas Muhammadiyah Sukabumi (UMMI), Fakultas Keperawatan Universitas Indonesia Jakarta, dan saat ini sebagai pengajar tetap di Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta. Penulis juga memiliki pengalaman di bidang manajemen sebagai Ketua Pusat Penjaminan Mutu FST UIN Jakarta, serta Koordinator Bidang Data dan Sistem Informasi Pusat Audit Lembaga Penjaminan Mutu UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.

Selama ini penulis dan tim telah menghasilkan beberapa karya ilmiah yang telah dipublikasikan pada jurnal nasional dan internasional. Selain itu telah ditulis juga buku yang bertema madu antara lain : Madu untuk Kesehatan Manusia: Kajian Sains dan Teknologi, Efek Imunomodulator dalam Senyawa Aktif Madu, dan Antivirus Senyawa Bioaktif Madu terhadap virus Covid-19.

Penulis dapat dihubungi melalui surel: laode.sumarlin@uinjkt.ac.id.



Etyn Yunita adalah dosen dan peneliti di Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta dengan latar belakang pendidikan di bidang Biologi Konservasi, yang ia tempuh di FMIPA Universitas Indonesia. Sebelumnya penulis memperluas wawasannya di bidang Ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak melalui studi di Fakultas Peternakan IPB. Perpaduan keilmuan ini membentuk pandangan holistiknya

terhadap keterkaitan antara alam, pangan, dan keberlanjutan.

Sebagai auditor halal di Lembaga Pemeriksa Halal (LPH) UIN, penulis turut terlibat dalam pengawasan keaslian dan mutu produk pangan, termasuk madu—komoditas yang tidak hanya bernilai gizi, tetapi juga budaya. Keterlibatannya di Belitong UNESCO Global Geopark dan Jaringan Geopark Indonesia menegaskan komitmennya terhadap pelestarian keanekaragaman hayati dan penguatan pengetahuan lokal.

Penulis memiliki perhatian khusus terhadap lebah, madu, dan masyarakat penghasil madu yang menjaga pengetahuan tradisional secara turun-temurun, mulai dari teknik pembuatan sarang alami hingga cara memanen yang lestari. Buku Membedah Keaslian Madu: Fakta Ilmiah di Balik Pemalsuan Madu & Cara Sains Melindungi Konsumen lahir dari kepedulian tersebut—sebagai upaya ilmiah sekaligus advokasi untuk melindungi keaslian madu dan menjaga keberlanjutan warisan alam serta budaya yang menyertainya. Penulis dapat dihubungi di alamat surel: etyn@uinjkt.ac.id