

ISSN: 1410-3044 (Print)  
2302-4399 (Online)

*Jurnal*

TEKNOLOGI & INDUSTRI  
HASIL PERTANIAN

**Vol. 26 No. 2, September 2021**

# Investigasi pengaruh pengenceran sampel madu pada proses klasifikasi madu menggunakan *uv spectroscopy* dan kemometrika

*[Investigation on the influence of dilution of honey samples for honey classification using uv spectroscopy and chemometrics]*

Diding Suhandy<sup>1\*</sup>, Meinelwita Yulia<sup>2</sup>, Kusumiyati<sup>3</sup>, Siti Suharyatun<sup>1</sup> dan Sri Waluyo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Jurusan Teknik Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Jl. Prof. Dr. Soemantri Brojonegoro No. 1, Bandar Lampung, Lampung

<sup>2</sup> Jurusan Teknologi Pertanian, Politeknik Negeri Lampung, Jl. Soekarno Hatta No.10, Bandar Lampung, Lampung

<sup>3</sup> Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung Sumedang KM.21, Sumedang, Jawa Barat

\* Email korespondensi : [diding.sughandy@fp.unila.ac.id](mailto:diding.sughandy@fp.unila.ac.id)

Diterima: 11 Januari 2021, Disetujui: 5 Juli 2021, DOI: <http://dx.doi.org/10.23960/jthp.v26i2.72-82>

## ABSTRACT

One form of honey adulteration is label adulteration for some premium honey such as uniflora honey from the honeybee species *Trigona* sp. One of the analytical methods that are currently developing and have the potential to perform the classification of premium honey in Indonesia is the UV spectroscopy method. In this study, an investigation was carried out on the effect of dilution on the performance of UV spectroscopy in the process of classifying Indonesian honey with different honeybees. A total of 4 types of honey samples with 10 samples each were used in this study. The honey sample was then diluted using distilled water. Each type of honey was given two dilution treatments, namely 1:20 (volume:volume) dilution of 5 samples and 1:40 (volume:volume) dilution of 5 samples. Spectral data were taken using a UV-visible spectrometer with a wavelength of 190-1100 nm (Genesys™ 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA) using the transmittance mode. The results of spectra analysis generally show that the sample with a 1:20 dilution has a higher absorbance intensity for both the original and modified spectra. The PCA results for each dilution showed that the honey samples could be separated into four different clusters for both 1:20 and 1:40 dilutions. The results of PCA analysis using all samples showed that the honey samples were classified into eight different clusters showing a significant effect of differences in honey sample dilution on the classification process of honey samples based on differences in the types of honeybees.

*Keywords: classification, dilution, PCA, stingless honeybee, uv spectroscopy*

## ABSTRAK

Salah satu bentuk pemalsuan madu adalah pemalsuan label untuk beberapa madu premium seperti madu uniflora dari jenis lebah *Trigona* sp. Di antara beberapa metode analisis yang saat ini berkembang dan potensial untuk klasifikasi madu premium di Indonesia adalah metode *UV spectroscopy*. Pada penelitian ini dilakukan investigasi pengaruh pengenceran terhadap kinerja *UV spectroscopy* dalam proses klasifikasi madu Indonesia dengan jenis lebah berbeda. Sebanyak 4 jenis sampel madu dengan jumlah masing-masing 10 sampel digunakan dalam penelitian ini. Sampel madu kemudian diencerkan menggunakan air distilasi. Setiap jenis madu diberikan dua perlakuan pengenceran yaitu pengenceran 1:20 (volume:volume) sebanyak 5 sampel dan pengenceran 1:40 (volume:volume) sebanyak 5 sampel. Spektrometer *UV-visible* (Genesys™ 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA) digunakan untuk mengukur data spektra dengan menggunakan mode transmisi di panjang gelombang 190-1100 nm. Hasil analisis spektra secara umum menunjukkan sampel dengan pengenceran 1:20 memiliki intensitas absorbansi yang lebih tinggi baik untuk spektra original maupun spektra modifikasi. Hasil PCA (*principal component analysis*) untuk masing-masing pengenceran menunjukkan sampel madu dapat terpisah menjadi empat kluster berbeda baik untuk pengenceran 1:20 maupun pengenceran 1:40. Hasil analisis PCA menggunakan semua sampel menunjukkan sampel madu terklasifikasikan menjadi delapan kluster berbeda menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan dari perbedaan pengenceran sampel madu terhadap proses klasifikasi sampel madu berdasarkan perbedaan jenis lebahnya.

Kata kunci: klasifikasi, lebah tak bersengat, PCA, pengenceran, *uv-spectroscopy*

## Pendahuluan

Madu merupakan zat manis alami yang diproduksi oleh lebah madu dan biasa digunakan sebagai bahan pemanis (Spiteri et al., 2017). Madu memiliki kandungan gizi dan manfaat medis yang tinggi dan merupakan satu-satunya bahan pemanis alami yang dapat digunakan manusia secara langsung tanpa proses pengolahan sehingga saat ini merupakan salah satu produk pertanian penting dengan nilai ekonomi tinggi (El Sohaimy et al., 2015). Komponen utama madu adalah karbohidrat (70-80% w/w). Karbohidrat ini umumnya terdiri atas glukosa (~31% w/w), fruktosa (~38% w/w) dan air (10-20% w/w) (He et al., 2020). Secara umum kualitas madu sangat ditentukan oleh kondisi lingkungan lebah, iklim, intensitas interaksi peternak dengan lebah, metode panen madu dan penyimpanan madu (Wilczyńska & Zak, 2020). Secara khusus, komposisi kimia dan karakteristik sensorik madu seperti kandungan protein, karbohidrat, enzim, mineral dan kandungan asam organik lebih ditentukan oleh jenis nektar yang dikumpulkan oleh lebah (Da Silva et al., 2016; Gok et al., 2015). Saat ini berdasarkan asal nektar, madu dikelompokkan ke dalam madu uniflora (madu dengan dominasi satu jenis nektar bunga) dan multiflora (madu dengan banyak jenis nektar bunga) di mana secara umum madu uniflora memiliki harga lebih mahal dibandingkan madu multiflora (Sousa et al., 2014).

Secara umum berdasarkan jenis lebah, madu dihasilkan oleh dua jenis lebah yaitu kelompok lebah madu bersengat (*sting bee*) dan lebah madu tak bersengat (*stingless bee*). Contoh lebah madu bersengat yang banyak dibudidayakan di Indonesia adalah dari kelompok *Apis* spp. yaitu lebah *Apis dorsata*, *Apis mellifera* dan *Apis cerana*. Untuk lebah madu tidak bersengat yang umum dibudidayakan sebagai penghasil madu adalah lebah *Trigona* spp. atau madu klenceng. Setiap jenis lebah madu memiliki karakteristik sarang tersendiri yang menyebabkan keragaman mutu madu berdasarkan perbedaan jenis lebah (Zuccato et al., 2017). Saat ini beberapa madu uniflora dari lebah *Trigona* sp. dengan jumlah masih terbatas banyak digunakan di dalam proses pengobatan alami seperti untuk pengobatan penyakit tumor, radang, infeksi, batu ginjal dan mempercepat penyembuhan luka (Rao et al., 2016; Vit et al., 2012). Madu ini memiliki manfaat medis yang penting karena pada umumnya mengandung beberapa senyawa biologik aktif seperti senyawa polifenol, flavonoid, asam triterpenik (*triterpenic acids*), vitamin C dan beberapa senyawa polisakarida yang berperan sebagai senyawa anti-oksidan, anti-kanker, anti-diabetes dan anti-obesitas (Ali et al., 2020). Beberapa senyawa polifenol pada madu *Trigona* sp. dan diketahui memiliki efek anti-diabetes di antaranya adalah *quercetin*, *apigenin*, *luteolin*, *catechin*, *rutin*, dan *kaempferol* (Amin et al., 2018). *Trigona* sp. juga diketahui memiliki beberapa senyawa polifenol yang bermanfaat sebagai zat anti-kanker seperti *quercetin*, *apigenin*, *chrysin*, dan *luteolin* (Hossen et al., 2017). Madu uniflora *Trigona* sp ini juga diperdagangkan dengan harga yang sangat mahal dibandingkan madu dari lebah yang lain (Vit et al., 2012).

Secara umum pemalsuan madu dapat dilakukan dengan dua cara yaitu pertama adalah pengoplosan madu (*honey adulteration*) (madu asli dicampur dengan bahan bukan madu seperti sirup) dan kedua adalah pemalsuan label madu (*mislabeling*) pada kemasan. Salah satu bentuk pemalsuan madu yang saat ini sering terjadi adalah pemalsuan label untuk beberapa madu premium seperti madu uniflora dari jenis lebah *Trigona* sp. Untuk mencegah hal tersebut ada dua jenis metode analisis yang telah dievaluasi untuk uji keaslian beberapa madu premium. Pertama menggunakan metode analisis berbasis pengukuran data spektra seperti menggunakan *NIR spectroscopy* (Yang et al., 2020), *mid infrared spectroscopy* (Kasprzyk et al., 2018), *Raman spectroscopy* (Nickless et al., 2014), *nuclear magnetic resonance spectroscopy* (Spiteri et al., 2017) dan *fluorescence spectroscopy* (Ali et al., 2020; Lin et al., 2017). Kedua menggunakan metode analisis berbasis pengukuran data kromatografi seperti HS-SPME-GC/MS dan UHPLC-PDA-MS/MS yang telah digunakan untuk uji keaslian madu premium Manuka dari Selandia Baru (Beitlich et al., 2014). Secara umum kedua jenis metode analisis tersebut baik yang berbasis pengukuran data spektra maupun data kromatografi bekerja dengan cara mendeteksi perbedaan komposisi kimia pada

madu asli dan madu yang telah dioplos. Sebagai contoh, madu asli memiliki komposisi senyawa fruktosa dan glukosa dengan rasio yang unik untuk setiap madu. Pengoplosan madu asli dengan cara menambahkan gula buatan seperti *high fructose corn syrup* (HFCS) atau sirup jagung fruktosa tinggi telah mengubah rasio fruktosa dan glukosa pada madu sehingga dapat dibedakan antara madu asli dan madu yang telah dioplos. Metode analisis yang telah diujicobakan tersebut memiliki akurasi yang memadai untuk membedakan madu premium dan madu biasa. Hanya saja proses aplikasinya di Indonesia terkendala dengan masih mahal instrumentasi yang diperlukan dan keterbatasan sumber daya manusia terlatih untuk menjalankan analisis tersebut.

Salah satu metode analisis yang saat ini berkembang dan potensial untuk uji keaslian madu premium di Indonesia adalah metode *UV spectroscopy*. Saat ini di Indonesia, *UV spectroscopy* sudah digunakan untuk uji keaslian kopi (Suhandy & Yulia, 2017; Yulia & Suhandy, 2017) dan teh (Suhandy & Yulia, 2019a). Instrumentasi (spektrometer) UV secara umum memiliki beberapa kelebihan seperti lebih murah, *UV spectroscopy* juga relatif mudah menjalankannya dan termasuk analisis yang ramah lingkungan (bisa menggunakan pelarut air untuk persiapan sampelnya). Namun demikian, sebagian besar instrumentasi *UV spectroscopy* saat ini dibuat dalam mode pengambilan spektra transmisi yang memiliki kelemahan terutama saat pengukuran spektra sampel yang memiliki konsentrasi tinggi (larutan pekat) (Suhandy & Yulia, 2019b). Salah satu cara mengatasi hal ini adalah dengan melakukan proses pengenceran (*dilution*). Sampel madu yang terlalu pekat menghasilkan spektra yang sangat *noisy* di mana sebagian besar cahaya diserap oleh sampel dan sangat sedikit sekali yang diteruskan ke detektor. Pengenceran yang terlalu besar menyebabkan sampel madu menyerupai referensi (*reference*) dan spektra yang dihasilkan mengandung sedikit sekali informasi sampel karena sebagian besar cahaya diteruskan ke detektor. Sebagian besar sampel madu asal Indonesia adalah sampel yang pekat dan membutuhkan proses pengenceran yang tepat untuk dapat diambil data spektranya di daerah UV. Pada penelitian ini dilakukan investigasi pengaruh pengenceran sampel madu terhadap kinerja *UV spectroscopy* dalam proses klasifikasi madu Indonesia dari empat jenis lebah berbeda.

## Bahan dan metode

### Bahan dan alat

Sampel madu yang digunakan terdiri atas empat jenis madu dari empat jenis lebah yang berbeda yaitu *Apis cerana*, *Apis mellifera*, *Apis dorsata* dan *Trigona* sp. Seluruh sampel merupakan madu multiflora yang dipanen di tahun yang sama (2020) dan berasal dari 3 peternak madu berbeda di provinsi Lampung dan Jawa Tengah. Sebanyak 10 sampel digunakan untuk setiap jenis madu. Secara lengkap deskripsi sampel madu yang digunakan dapat dilihat di Tabel 1. Alat utama yang digunakan adalah spektrometer *UV-visible* (Genesys™ 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA).

**Tabel 1.** Deskripsi sampel yang digunakan pada penelitian

| Nama Sampel    | Asal Daerah                  | Waktu Panen       | Jenis Lebah           | Jenis Sengat  | Jumlah sampel |
|----------------|------------------------------|-------------------|-----------------------|---------------|---------------|
| Madu Cerana    | Sukadana, Lampung Timur      | 25 September 2020 | <i>Apis cerana</i>    | Bersengat     | 10            |
| Madu Trigona   | Sukadana, Lampung Timur      | 10 Oktober 2020   | <i>Trigona</i> sp     | Tak Bersengat | 10            |
| Madu Mellifera | Batang, Jawa Tengah          | 15 September 2020 | <i>Apis mellifera</i> | Bersengat     | 10            |
| Madu Dorsata   | Baradatu, Way Kanan, Lampung | 3 September 2020  | <i>Apis dorsata</i>   | Bersengat     | 10            |

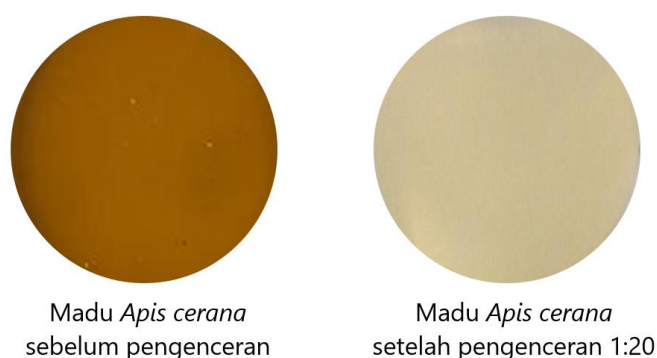
### Metode penelitian

Evaluasi pengaruh pengenceran terhadap proses klasifikasi sampel madu berdasarkan jenis lebahnya dilakukan dengan dua level analisis. Level pertama adalah analisis data spektra baik untuk spektra original

maupun spektra modifikasi dengan melihat pengaruh pengenceran terhadap intensitas absorbans yang dihasilkan. Level analisis kedua yaitu menggunakan PCA (*principal component analysis*). Hasil analisis PCA ditampilkan dalam bentuk nilai skor dan nilai *x-loadings*. Nilai skor PCA dapat menunjukkan seberapa dekat satu sampel dengan sampel yang lainnya dan menghasilkan klusterisasi sampel. Sampel yang berada dalam kluster yang sama dapat diidentifikasi sebagai sampel dengan karakteristik yang identik. Nilai *x-loadings* dapat memberikan informasi kontribusi setiap panjang gelombang yang terlibat dalam proses klusterisasi sampel (Jolliffe & Morgan, 1992).

### **Persiapan sampel madu dengan beda pengenceran**

Seluruh sampel madu dipanaskan menggunakan *water bath* selama 30 menit dengan suhu 60°C sebelum diencerkan (Frausto-Reyes et al., 2017). Hal ini dilakukan untuk meminimalkan kristalisasi yang terjadi pada sampel madu. Sampel madu kemudian dikeluarkan dari *water bath* dan dibiarkan di suhu ruang selama 30 menit kemudian diencerkan menggunakan air distilasi. Untuk pengukuran data UV-vis, salah satu kendala yang dihadapi saat persiapan sampel adalah sampel madu yang terlalu pekat karena menyebabkan sebagian besar cahaya akan diserap bahan dan hanya sedikit cahaya diteruskan ke detektor dan ini menyebabkan terjadinya banyak *noise* pada spektra. Beberapa rasio pengenceran telah diujicobakan saat pra penelitian yaitu dengan perbandingan sebagai berikut: 1:20, 1:25, 1:30, 1:35 dan 1:40. Pengenceran di bawah 1:20 menyebabkan *noise* pada spektra karena sampel madu masih terlalu pekat. Pengenceran di atas 1:40 berpotensi sampel madu tidak bisa dibedakan dengan sampel referensi yaitu air distilasi karena sampel yang sudah terlalu encer. Semakin besar rasio pengenceran menyebabkan warna sampel madu semakin cerah seperti dapat dilihat di Gambar 1. Warna sampel madu menjadi mirip warna air distilasi mulai terjadi saat pengenceran 1:25. Namun demikian, bentuk spektra untuk pengenceran 1:20 sampai 1:40 masih identik dengan *noise* minimal dan menunjukkan adanya informasi sampel madu yang masih mungkin terobservasi. Sehingga pada penelitian ini dilakukan evaluasi pengaruh 2 level pengenceran (pengenceran paling rendah dan pengenceran paling tinggi) yang masih mungkin diperoleh dengan *noise* yang minimal. Berdasarkan hal tersebut, setiap jenis madu diberikan dua perlakuan pengenceran yaitu pengenceran 1:20 (volume:volume) sebanyak 5 sampel dan pengenceran 1:40 (volume:volume) sebanyak 5 sampel. Setelah itu, hasil pengenceran diaduk selama 10 menit menggunakan pengaduk magnetik dengan kecepatan 1500 rpm (Ciblanc™, China).



Gambar 1. Perbandingan warna sampel madu sebelum dan setelah pengenceran.

### **Pengukuran spektra sampel madu**

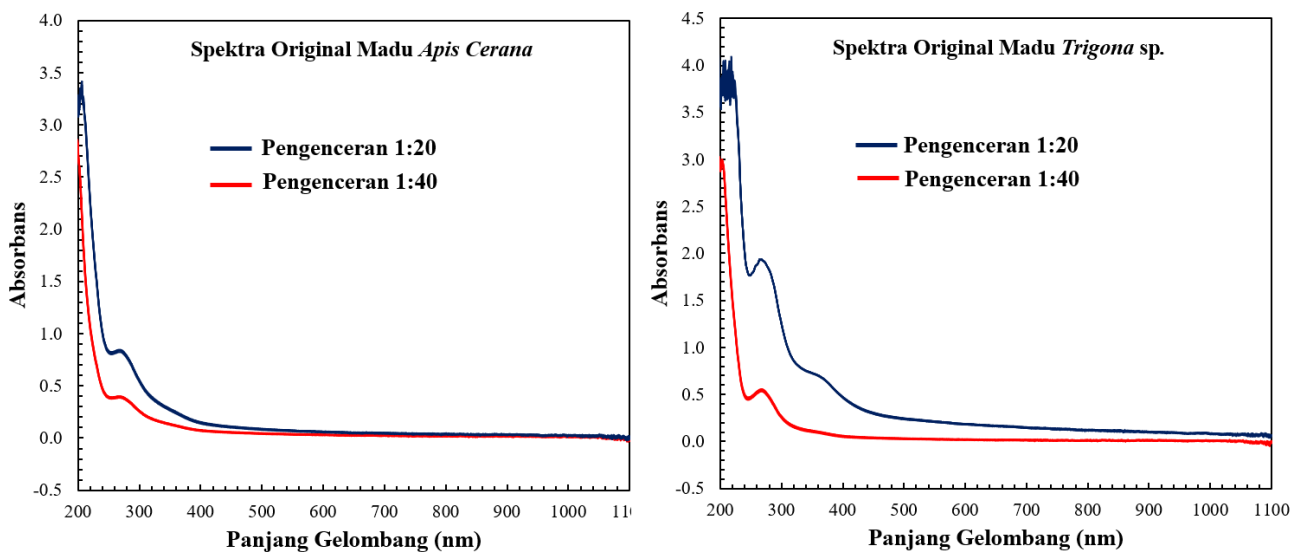
Pengukuran spektra dilakukan dengan meneteskan 3 mL sampel madu yang telah diencerkan dan diaduk ke dalam kuvet kuarsa berukuran 10 mm. Data spektra diukur atau dibaca menggunakan spektrometer *UV-visible* pada panjang gelombang 190-1100 nm (Genesys™ 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA) dengan menggunakan mode transmisi yaitu mengukur intensitas cahaya yang diteruskan ke detektor dengan cara membandingkan kondisi saat melewati sampel dan referensi. Data spektra disimpan

dalam format file .csv dan diubah ke dalam format file .xls kemudian diimpor ke pengolah data the Unscrambler versi 9.8 (CAMO, Oslo, Norwegia) untuk analisis selanjutnya.

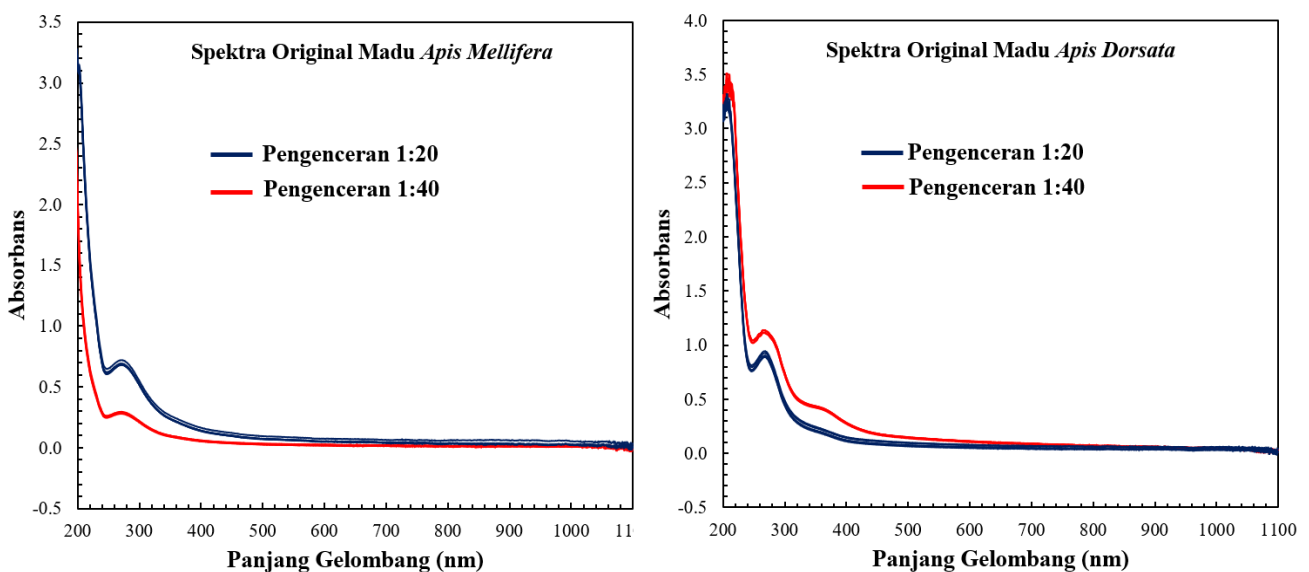
## Hasil dan pembahasan

### *Analisis spektra original madu dengan beda pengenceran*

Spektra original untuk madu *Apis cerana* dan *Trigona* sp. dengan beda pengenceran di interval 190-1100 nm dapat dilihat di Gambar 2. Secara umum spektra dengan *noise* tinggi dapat dilihat di panjang gelombang 190-250 nm (area panjang gelombang cahaya ultra violet) khususnya di spektra madu *Trigona* sp. yang dikenal juga sebagai *noise* frekuensi tinggi (*high frequency noise*). Spektra madu dengan pengenceran 1:20 memiliki informasi sampel yang lebih banyak dengan intensitas absorbans yang lebih tinggi baik untuk madu *Apis cerana* maupun madu *Trigona* sp. Hanya saja spektra kedua jenis madu tidak terlihat berbeda di panjang gelombang cahaya tampak dan infra merah dekat (*visible* dan *near infrared*) di interval 400-1100 nm.



Gambar 2. Spektra original sampel madu *Apis cerana* dan *Trigona* sp. dengan beda pengenceran di interval 190-1100 nm.

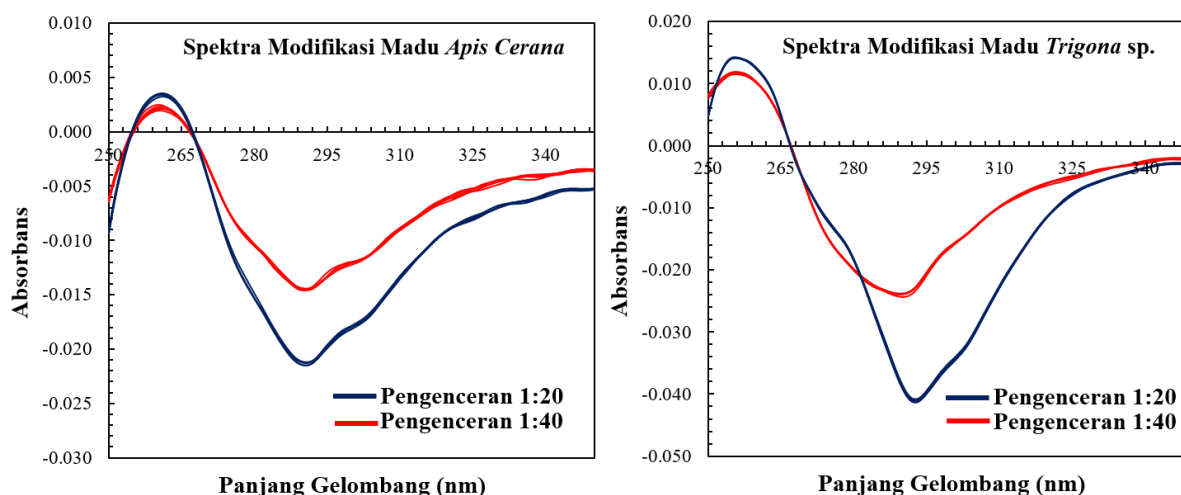


Gambar 3. Spektra original sampel madu *Apis mellifera* dan *Apis dorsata* dengan beda pengenceran di interval 190-1100 nm.

Hasil yang sama diperoleh untuk madu *Apis mellifera*. Spektra sampel madu *Apis mellifera* untuk pengenceran 1:20 memiliki intensitas absorbans yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel madu dengan pengenceran 1:40 (Gambar 3). Namun demikian, untuk spektra madu *Apis dorsata* hasil yang berbeda diperoleh di mana sampel madu dengan pengenceran 1:40 memiliki nilai intensitas absorbans yang lebih tinggi dibandingkan spektra sampel madu dengan pengenceran 1:20. Untuk saat ini belum dapat disimpulkan alasan utama mengapa pola intensitas absorbans untuk *Apis dorsata* berbeda dengan madu jenis lain dari *Apis mellifera*, *Apis cerana* dan *Trigona* sp. Salah satunya adalah keterbatasan data yang dimiliki saat ini. Penggunaan jumlah sampel yang terbatas yaitu 5 sampel setiap pengenceran, menghasilkan data yang tidak memadai untuk menyimpulkan penyebab pola yang berbeda tersebut. Oleh karena itu diperlukan pengambilan data yang lebih banyak khususnya untuk sampel *Apis dorsata* sehingga dapat diketahui lebih jauh penyebab terjadinya perbedaan pola intensitas absorbans. Secara umum hasil yang diperoleh menunjukkan secara spektroskopi, perbedaan pengenceran menyebabkan perbedaan dalam intensitas absorbans yang dihasilkan. Sehingga pengenceran pada proses persiapan madu untuk pengukuran *UV spectroscopy* dapat menjadi salah satu variabel yang harus diperhatikan dalam pengukuran spektra sampel madu. Namun demikian, analisis spektra original memiliki kelemahan di mana perbedaan intensitas absorbans yang terjadi bisa juga diakibatkan oleh faktor lain yang tidak berhubungan dengan kondisi pengenceran seperti perbedaan *baseline* spektra dan lainnya. Untuk itulah analisis spektra dilanjutkan dengan analisis spektra modifikasi untuk memberikan konfirmasi pengaruh faktor pengenceran terhadap kualitas spektra madu yang dihasilkan.

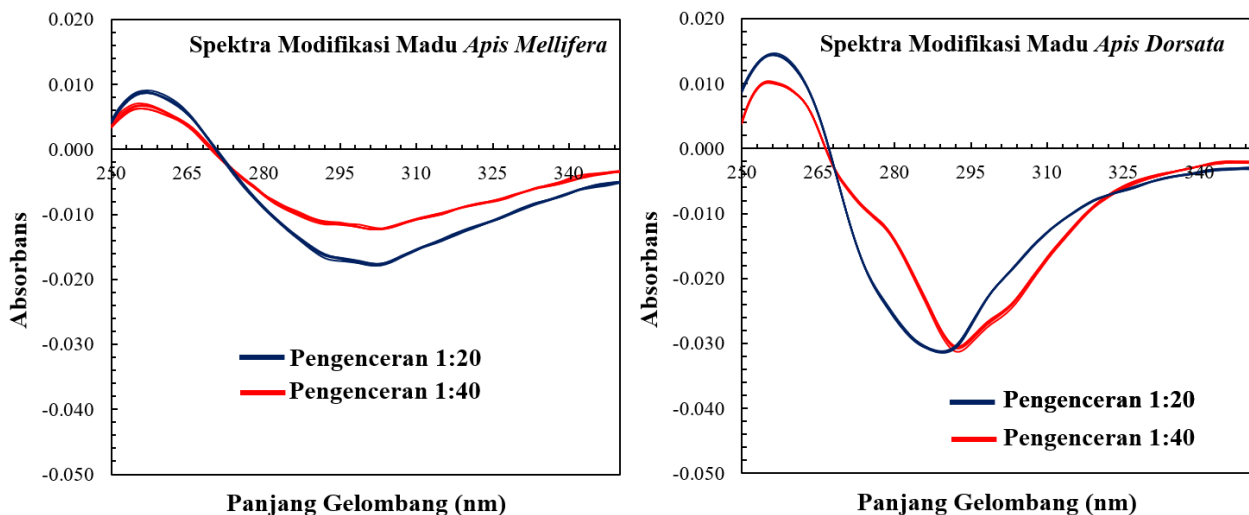
#### **Analisis spektra modifikasi madu dengan beda pengenceran**

Spektra modifikasi diperoleh dengan menggunakan tiga algoritma yaitu: *moving average smoothing* dengan 7 segmen (MAS), *standard normal variate* (SNV) dan *Savitzky-Golay first derivation* dengan jumlah segmen 7 dan ordo 2 (SG 1d). Tujuan dilakukan modifikasi data spektra original menggunakan ketiga algoritma tersebut adalah untuk meminimalkan adanya *noise* yang tidak berhubungan langsung dengan kondisi beda pengenceran sampel. Sebagai contoh, MAS biasa digunakan untuk menghilangkan adanya *high frequency noise* (Suhandy & Yulia, 2020). SNV dan SG 1d dapat digunakan untuk menghilangkan adanya perbedaan *baseline* pada data spektra (Suhandy & Yulia, 2020). Spektra modifikasi sampel madu *Apis cerana* dan *Trigona* sp. ditunjukkan di Gambar 4. Seperti yang terlihat di Gambar 4, spektra sampel madu dengan pengenceran 1:20 memiliki intensitas absorbans yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel pengenceran 1:40. Terdapat satu puncak positif di panjang gelombang sekitar 260 nm dan satu puncak negatif di panjang gelombang sekitar 290 nm untuk kedua sampel madu *Apis cerana* dan *Trigona* sp. yang menunjukkan perbedaan intensitas absorbans yang diakibatkan oleh perbedaan pengenceran.



**Gambar 4.** Spektra modifikasi sampel madu *Apis cerana* dan *Trigona* sp. dengan beda pengenceran di interval 250-350 nm.

Plot spektra modifikasi sampel madu *Apis mellifera* dan *Apis dorsata* ditunjukkan di Gambar 5. Hasil yang sama juga terlihat untuk kedua sampel madu tersebut. Secara umum spektra sampel madu dengan pengenceran 1:20 lebih tinggi dibandingkan pengenceran 1:40. Puncak gelombang positif dengan intensitas absorbans tinggi juga masih diidentifikasi di sekitar panjang gelombang 260 nm untuk *Apis mellifera* dan *Apis dorsata*. Untuk puncak negatif, spektra sampel madu *Apis mellifera* sedikit bergeser ke frekuensi yang lebih rendah yaitu sekitar panjang gelombang 300 nm. Dari hasil analisis spektra modifikasi ini maka dapat dipastikan adanya pengaruh yang sangat signifikan dari proses persiapan sampel yaitu tahap pengenceran sampel madu saat proses pengambilan data spektra *UV spectroscopy* untuk uji keaslian madu Indonesia.



Gambar 5. Spektra modifikasi sampel madu *Apis mellifera* dan *Apis dorsata* dengan beda pengenceran di interval 250-350 nm.

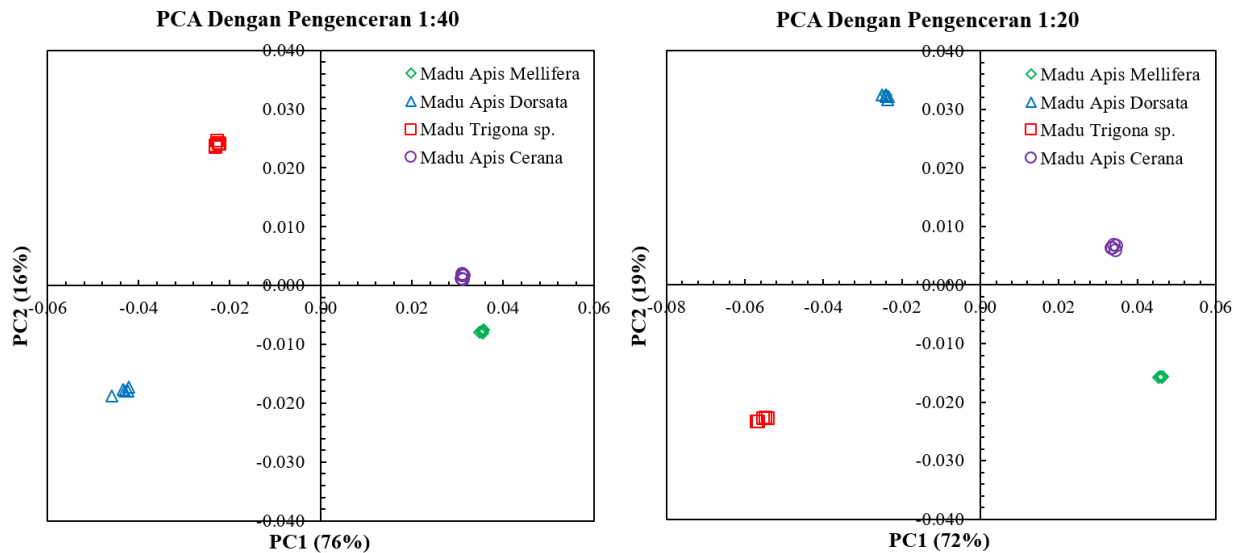
### Hasil PCA

Identifikasi pengaruh beda pengenceran pada kualitas spektra sampel madu, selain dengan menggunakan visualisasi intensitas absorbans maka dapat juga dilakukan dengan cara uji klusterisasi menggunakan analisis PCA. Pada dasarnya sampel dengan pengukuran spektra tertentu yang terletak dalam satu kluster di dalam PCA bisa dianggap memiliki kesamaan (*similarity*) secara spektroskopi. Artinya jika sampel dengan beda pengenceran terletak dalam kluster yang sama menunjukkan secara spektroskopi, beda pengenceran tidak berpengaruh terhadap data spektra yang dihasilkan. Sebaliknya jika sampel dengan beda pengenceran terletak dalam kluster yang berbeda menunjukkan secara spektroskopi, beda pengenceran memiliki pengaruh terhadap data spektra yang dihasilkan.

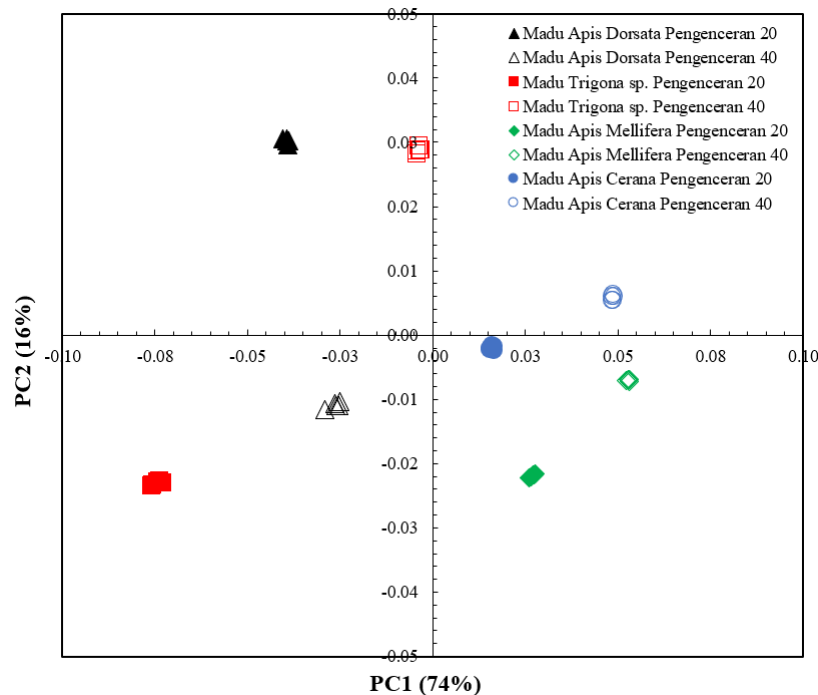
Gambar 6 menunjukkan hasil analisis PCA (dalam bentuk plot nilai skor dua PC pertama) untuk sampel madu dengan pengenceran 1:20 dan 1:40 menggunakan spektra modifikasi di interval 250-350 nm. Dengan menggunakan data sampel dengan kondisi pengenceran yang sama maka sampel berhasil dikelompokkan berdasarkan jenis lebahnya. Penentuan jumlah minimal PC yang terlibat dalam analisis PCA ditentukan berdasarkan kriteria nilai *cumulative percent variance* (CVP) yaitu sebesar lebih dari 70-85% (CVP > 70-85%) (Hu et al., 2018; Hu et al., 2019). Untuk pengenceran 1:20 misalnya dengan PC1=72% dan PC2=19% dengan CVP sebesar 91%, empat jenis sampel madu dari empat jenis lebah dapat dikelompokkan ke dalam 4 kluster yang berbeda. Madu *Apis dorsata* dan *Trigona* sp. terletak di PC1 negatif sedangkan madu *Apis cerana* dan *Apis mellifera* terletak di PC1 positif. Untuk pengenceran 1:40, hasil yang sama juga berhasil diperoleh di mana 4 jenis sampel madu dapat dikelompokkan ke dalam 4 kluster berbeda sesuai dengan jenis lebahnya. Hanya saja apabila dibandingkan antara pengenceran 1:20 dan 1:40 maka klusterisasi sampel madu di pengenceran 1:20 terlihat lebih baik di mana jarak antar kluster terlihat lebih besar dibandingkan dengan klusterisasi pada pengenceran 1:40. Madu *Trigona* sp. sebagai madu dari



lebah tak bersengat juga terlihat lebih bisa dibedakan dengan tiga madu dari lebah bersengat yaitu *Apis dorsata*, *Apis mellifera* dan *Apis cerana*. Hal ini berkorelasi dengan intensitas absorbans pada spektra dengan pengenceran 1:20 yang lebih tinggi. Ini menunjukkan spektra dengan pengenceran 1:20 memiliki lebih banyak informasi sampel yang berhasil dikumpulkan sehingga lebih unggul dalam proses klusterisasi sampel.



**Gambar 6.** Plot nilai skor hasil analisis PCA untuk pengenceran 1:20 dan 1:40 menggunakan spektra modifikasi di interval 250-350 nm.

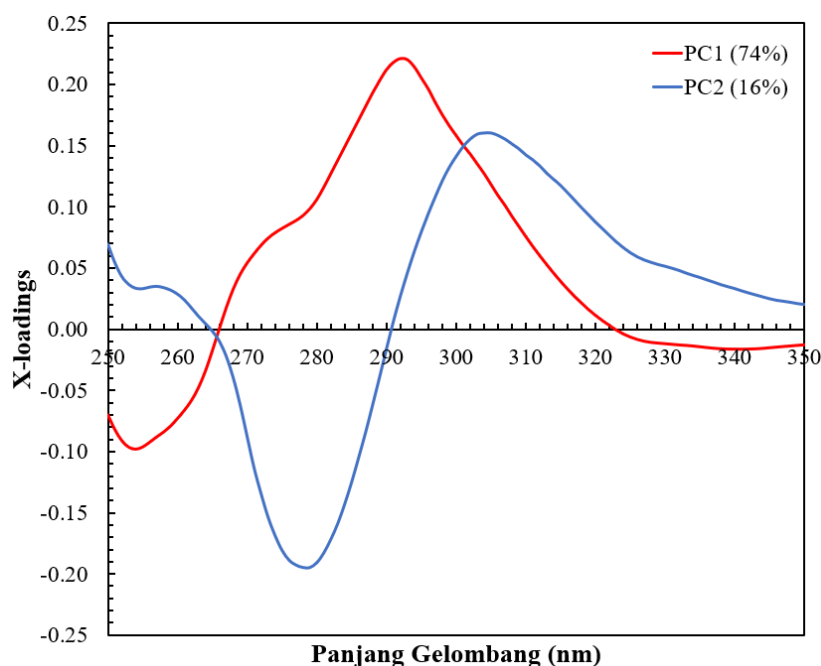


**Gambar 7.** Hasil analisis PCA dalam bentuk plot skor PC1xPC2 untuk seluruh sampel menggunakan spektra modifikasi di interval 250-350 nm.

PCA juga dihitung untuk seluruh sampel (gabungan pengenceran 1:20 dan 1:40) untuk mengevaluasi pengaruh pengenceran terhadap proses pemisahan sampel madu dari empat jenis lebah berbeda. Hasilnya ditunjukkan di Gambar 7 dengan nilai PC1=74% dan PC2=16% (CPV=90%). Dapat dilihat bahwa sampel madu kemudian terkelompokkan menjadi 8 kluster berdasarkan beda pengenceran dan beda jenis lebah. Sebagai contoh, sampel madu *Apis dorsata* untuk pengenceran 1:20 dan pengenceran 1:40 terpisah cukup sangat jauh. Meskipun keduanya memiliki nilai PC1 negatif tapi dari nilai skor PC2, kedua sampel berbeda di mana madu *Apis dorsata* dengan pengenceran 1:20 berada di PC2 positif ( $PC2 > 0$ ) dan madu

*Apis dorsata* dengan pengenceran 1:40 berada di PC2 negatif ( $PC2 < 0$ ). Hasil yang sama juga teridentifikasi untuk sampel madu *Apis cerana* dan madu *Apis mellifera*. Hasil ini menunjukkan pengaruh pengenceran sampel madu terhadap kualitas data spektra sangat signifikan. Perbedaan data spektra ini pada akhirnya sangat mempengaruhi keberhasilan proses uji keaslian sampel madu berdasarkan jenis lebahnya.

Plot nilai *x-loadings* hasil analisis PCA ditampilkan di Gambar 8 untuk mengidentifikasi variabel panjang gelombang yang paling kontributif terhadap proses pemisahan sampel madu berdasarkan beda pengenceran dan jenis lebah. Pada PC1 terdapat satu puncak positif dengan nilai *x-loading* tinggi yaitu di panjang gelombang 295 nm. Pada PC2 terdapat satu puncak positif dan satu puncak negatif dengan nilai *x-loading* tinggi yaitu di panjang gelombang 275 nm dan 305 nm. Panjang gelombang dengan *x-loadings* tinggi tersebut berkorelasi dengan absorbansi beberapa senyawa penting madu seperti senyawa *benzoic*, *salicylic* dan *aryl-alyphatic acids* (Dimitrova et al., 2007).



Gambar 8. Plot nilai *x-loadings* hasil analisis PCA untuk seluruh sampel menggunakan spektra modifikasi di interval 250-350 nm.

## Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan pengaruh pengenceran yang signifikan terhadap intensitas absorbans sampel madu. Fenomena ini secara umum terlihat di seluruh sampel madu dari empat jenis madu yang digunakan. Perbedaan intensitas absorbans dari dua macam pengenceran juga teridentifikasi baik untuk spektra original maupun spektra modifikasi di mana pengenceran 1:20 menghasilkan intensitas absorbans lebih tinggi. Hasil analisis juga mengkonfirmasi adanya pengaruh pengenceran terhadap kualitas spektra yang dihasilkan. Untuk sampel madu dengan pengenceran seragam, *UV spectroscopy* berhasil mengklasifikasi sampel madu sesuai dengan jenis lebahnya baik untuk pengenceran 1:20 maupun pengenceran 1:40. Namun, *UV spectroscopy* gagal mengelompokkan sampel madu sesuai dengan jenis lebahnya ketika sampel madu dengan dua pengenceran digabung. Hasil penelitian ini juga menunjukkan pengenceran 1:20 dapat direkomendasikan untuk pengukuran spektra sampel madu untuk empat jenis madu di Indonesia yaitu *Apis cerana*, *Apis mellifera*, *Apis dorsata* dan *Trigona sp.*

## Ucapan terima kasih

Riset ini sepenuhnya didanai oleh Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi/ Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Republik Indonesia melalui hibah penelitian terapan 2020-2022. Tim penulis juga mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu pelaksanaan

penelitian terapan ini khususnya kepada seluruh mahasiswa tim riset madu Jurusan Teknik Pertanian Universitas Lampung (Binti Khoiriyah, Nurul Uswatun Khasanah dan Sarah Desiana Br Ginting).

## Daftar pustaka

- Ali, H., Khan, S., Ullah, R., & Khan, B. (2020). Fluorescence fingerprints of Sidr honey in comparison with uni/polyfloral honey samples. *European Food Research and Technology*, 246(9), 1829–1837. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03536-6>.
- Amin, F. A. Z., Sabri, S., Mohammad, S. M., Ismail, M., Chan, K. W., Ismail, N., Norhaizan, M. E., & Zawawi, N. (2018). Therapeutic properties of stingless bee honey in comparison with european bee honey. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6179596>
- Beitlich, N., Koelling-Speer, I., Oelschlaegel, S., & Speer, K. (2014). Differentiation of manuka honey from kanuka honey and from jelly bush honey using HS-SPME-GC/MS and UHPLC-PDA-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(27), 6435–6444. <https://doi.org/10.1021/jf501818f>
- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., 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>
- Dimitrova, B., Gevrenova, R., & Anklam, E. (2007). Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 18(1), 24–32. <https://doi.org/10.1002/pca.948>
- El Sohaimy, S. A., Masry, S. H. D., & Shehata, M. G. (2015). Physicochemical characteristics of honey from different origins. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2015.10.015>
- Frausto-Reyes, C., Casillas-Peñuelas, R., Quintanar-Stephano, J. L., Macías-López, E., Bujdud-Pérez, J. M., & Medina-Ramírez, I. (2017). Spectroscopic study of honey from *Apis mellifera* from different regions in Mexico. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 178, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.02.009>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.040>
- He, C., Liu, Y., Liu, H., Zheng, X., Shen, G., & Feng, J. (2020). Compositional identification and authentication of Chinese honeys by <sup>1</sup>H NMR combined with multivariate analysis. *Food Research International*, 130, 108936. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108936>
- 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.2017.07.002>
- Hu, L., Ma, S., & Yin, C. (2018). Discrimination of geographical origin and detection of adulteration of kudzu root by fluorescence spectroscopy coupled with multi-way pattern recognition. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 193, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.011>
- Hu, L., Yin, C., Ma, S., & Liu, Z. (2019). Vis-NIR spectroscopy Combined with Wavelengths Selection by PSO Optimization Algorithm for Simultaneous Determination of Four Quality Parameters and Classification of Soy Sauce. *Food Analytical Methods*, 12(3), 633–643. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-01407-1>
- Joliffe, I. T., & Morgan, B. (1992). Principal component analysis and exploratory factor analysis. *Statistical Methods in Medical Research*, 1(1), 69–95. <https://doi.org/10.1177/096228029200100105>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.015>

- Lin, B., Loomes, K. M., Prijic, G., Schlothauer, R., & Stephens, J. M. (2017). Lepteridine as a unique fluorescent marker for the authentication of manuka honey. *Food Chemistry*, 225, 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.099>
- Nickless, E. M., Holroyd, S. E., Stephens, J. M., Gordon, K. C., & Wargent, J. J. (2014). Analytical FT-Raman spectroscopy to chemotype *Leptospermum scoparium* and generate predictive models for screening for dihydroxyacetone levels in floral nectar. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(10), 890–894. <https://doi.org/10.1002/jrs.4576>
- Rao, P. V., Krishnan, K. T., Salleh, N., & Gan, S. H. (2016). Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(5), 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.bjrp.2016.01.012>
- Sousa, M. E. B. C., Dias, L. G., Veloso, A. C. A., Estevinho, L., Peres, A. M., & Machado, A. A. S. C. (2014). Practical procedure for discriminating monofloral honey with a broad pollen profile variability using an electronic tongue. *Talanta*, 128, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.05.004>
- Spiteri, M., Rogers, K. M., Jamin, E., Thomas, F., Guyader, S., Lees, M., & Rutledge, D. N. (2017). Combination of <sup>1</sup>H NMR and chemometrics to discriminate manuka honey from other floral honey types from Oceania. *Food Chemistry*, 217, 766–772. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.027>
- Suhandy, D., & Yulia, M. (2017). Peaberry coffee discrimination using UV-visible spectroscopy combined with SIMCA and PLS-DA. *International Journal of Food Properties*, 20(March), S331–S339. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1296861>
- Suhandy, D., & Yulia, M. (2019a). Potential application of UV-visible spectroscopy and PLS-DA method to discriminate Indonesian CTC black tea according to grade levels. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 258(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/258/1/012042>
- Suhandy, D., & Yulia, M. (2019b). *Pengantar Ilmu Spektroskopi untuk Pertanian* (1st ed.). Graha Ilmu.
- Suhandy, D., & Yulia, M. (2020). *Teknologi Near Infrared Spectroscopy Portabel Untuk Kuantifikasi Atribut Mutu Buah-Buahan* (1st ed.). Graha Ilmu.
- Vit, P., Roubik, D. W., & Pedro, S. R. M. (2012). Pot-Honey: A legacy of stingless bees. In *Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees* (pp. 1–654). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7>
- Wilczyńska, A., & Žak, N. (2020). The use of fluorescence spectrometry to determine the botanical origin of filtered honeys. *Molecules*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/molecules25061350>
- Yang, X., Guang, P., Xu, G., Zhu, S., Chen, Z., & Huang, F. (2020). Manuka honey adulteration detection based on near-infrared spectroscopy combined with aquaphotomics. *Lwt*, 132, 109837. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109837>
- Yulia, M., & Suhandy, D. (2017). Indonesian palm civet coffee discrimination using UV-visible spectroscopy and several chemometrics methods. *Journal of Physics: Conference Series*, 835(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/835/1/012010>
- Zuccato, V., Finotello, C., Menegazzo, I., Peccolo, G., & Schievano, E. (2017). Entomological authentication of stingless bee honey by <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics approach. *Food Control*, 82, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.06.024>