

**Aktivitas Antioksidan, Total Fenolik, dan Total Flavonoid Madu *Apis mellifera* dari Hutan Akasia (*Accacia crassicarpa*) Riau, Indonesia dengan Beberapa Perlakuan Pengeringan**  
**(Antioxidant Activity, Total Phenolic and Total Flavonoid Activity of *Apis mellifera* Honey from *Accacia crassicarpa* Forest-Riau, Indonesia with Several Drying Treatments)**

Tri Hadi Handayani<sup>1</sup>, Muhamad Arif Budiman<sup>2</sup>, R. Lia Rahadian Amalia<sup>1</sup>, Avry Pribadi<sup>1</sup>, Rizki Rabeca Elfirta<sup>3</sup>, & Pamungkas Rizki Ferdian<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pusat Riset Zoologi Terapan, BRIN, <sup>2</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, <sup>3</sup>Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, BRIN

Email: trih008@brin.go.id; pamu003@brin.go.id

Memasukkan: Juli 2022, Diterima: Oktober 2022

#### ABSTRACT

Indonesian honey has high water content and often exceeds the limitation of standard quality appointed by national and international regulation. It is caused by the high humidity and the hygroscopic character of honey itself. Riau Province is one of the highest producers of honey, but the water content is high, about 23-27%. Heating can be used to decrease the water content, but it increases the risk of damage to honey's secondary metabolites and may lose the functional character of honey towards human health. There is limited research that observes the effect of heating on honey's secondary metabolites. Our research aimed to evaluate the effect of heating on *Apis mellifera* honey from acacia forest, Province of Riau, Indonesia towards the stability of honey's secondary metabolites including water content analysis, screening of secondary metabolites, determination of antioxidant activity, measurement of TPC and TFC. The results show that the heating of 50 °C for 5 days and the heating of 105 °C for 6 hours can decrease water content of honey without disturbing stability of honey's secondary metabolites. It is showed by the score of IC<sub>50</sub> of honey without heating (21103,74 µg/mL) is higher than the IC<sub>50</sub> of honey heated by 50 °C (16503,83 µg/mL) and heated by 105 °C (777,33 µg/mL). The low value of IC<sub>50</sub> indicates the high antioxidant activity, it is inline with TPC and TFC. The TPC and TFC without heating (TPC= 0,67 mgGAE/g; TFC=0,34 mgQE/g) is lower than sample heated by 50 °C (TPC=1,59 mgGAE/g; TFC=0,46 mgQE/g) and 105 °C (TPC=13,94 mgGAE/g; TFC=4,37 mgQE/g).

**Keywords:** *Apis mellifera*, acacia forest, Riau honey, water content, secondary metabolites

#### ABSTRAK

Madu Indonesia memiliki kadar air yang cukup tinggi dan seringkali melebihi batas maksimal standar kualitas madu berdasarkan regulasi nasional dan internasional. Hal ini disebabkan oleh kelembaban udara yang cukup tinggi dan karakter higroskopis madu. Provinsi Riau merupakan salah satu penghasil madu tertinggi di Indonesia, namun kadar airnya cukup tinggi yaitu pada rentang 23-27%. Salah satu upaya untuk mengurangi kadar air madu adalah dengan pemanasan, namun senyawa metabolit sekunder pada madu berisiko mengalami kerusakan dan berdampak pada penurunan sifat fungsional madu terhadap kesehatan. Penelitian terkait pengaruh pemanasan terhadap stabilitas senyawa metabolit sekunder pada madu belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh pemanasan terhadap stabilitas senyawa metabolit sekunder pada madu *Apis mellifera* hutan akasia dari Provinsi Riau, Indonesia, diantaranya analisis kadar air, penapisan senyawa metabolit sekunder, pengukuran aktivitas antioksidan, pengukuran TPC dan pengukuran TFC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan panas 50 °C selama 5 hari dan perlakuan panas 105 °C selama 6 jam dapat menurunkan kadar air madu tanpa mengganggu stabilitas senyawa metabolit sekunder pada madu. Hal ini ditunjukkan pada nilai IC<sub>50</sub> madu tanpa perlakuan (21103,74 µg/mL) yang lebih besar dari madu dengan perlakuan 50 °C (16503,83 µg/mL) dan 105 °C (777,33 µg/mL). Nilai IC<sub>50</sub> yang rendah menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi, sejalan dengan TPC dan TFC. Nilai TPC dan TFC sampel tanpa perlakuan (TPC= 0,67 mgGAE/g; TFC=0,34 mgQE/g) lebih rendah dari sampel dengan pemanasan 50 °C (TPC=1,59 mgGAE/g; TFC=0,46 mgQE/g) dan lebih rendah dari sampel dengan pemanasan 105 °C (TPC=13,94 mgGAE/g; TFC=4,37 mgQE/g)."

**Kata Kunci:** *Apis mellifera*, hutan akasia, madu Riau, kadar air, metabolit sekunder

## PENDAHULUAN

Madu merupakan salah satu bioproduk dari lebah yang telah lama dikenal oleh masyarakat. Lebah mengubah sakarida yang terdapat pada nektar menjadi madu melalui proses regurgitasi, evaporasi dan enzimatik. Enzim yang berperan dalam menghidrolisis sakarida menjadi monosakarida dalam proses pembentukan madu yaitu invertase dan amiloglukosidase (Alvarez-Suarez *et al.* 2010). Rasa manis dari madu diperoleh dari kandungan fruktosa (38–55%) dan glukosa (31%) yang terkandung didalam madu (Yiuchung *et al.* 2019). Madu diketahui mengandung lebih dari 200 komponen penyusun. komponen tersebut diantaranya enzim, flavonoid, asam fenolik, senyawa volatil, gula, protein (0.5%), air (17.5%), vitamin dan mineral. komponen utama penyusun madu yaitu air, glukosa, fruktosa, sukrosa, mineral dan protein. Madu mengandung senyawa antioksidan enzimatik, seperti glukosa oksidase dan katalase, dan senyawa non enzimatik seperti asam askorbat, flavonoid dan fenolik (Yiuchung *et al.* 2019; Ciulu *et al.* 2016; Cianciosi *et al.* 2018). Komposisi yang terkandung didalam madu tergantung dengan kondisi alam dan sumber nektar (Manyi-Loh *et al.* 2011).

Banyak spesies lebah yang menghasilkan madu, tetapi hanya beberapa spesies lebah yang telah dimanfaatkan dalam bidang industri kesehatan, salah satunya spesies lebah *Apis mellifera*. Lebah *A. mellifera* merupakan spesies lebah non lokal yang diimpor ke Indonesia karena sifatnya yang mudah dibudidayakan, produksi madu tinggi, dan tidak agresif (Sihombing 1994). Usaha budidaya madu lebah *A. mellifera* sudah tersebar ke berbagai daerah di Indonesia. Riau merupakan provinsi Indonesia yang memiliki beberapa daerah penghasil madu terutama madu bersumber dari hutan. Madu yang bersumber dari hutan memiliki kandungan nutrisi lebih baik dibandingkan madu yang dibiakkan (Syahriati *et al.* 2021). Madu hutan Riau memiliki keunggulan dibandingkan dengan madu hutan lainnya dikarenakan kondisi lingkungan fisik yang sesuai, diantaranya terdapat hutan akasia (*Accacia crassicarpa*) yang dapat memberikan pakan pada lebah sepanjang tahun. Riau yang merupakan dataran rendah memiliki beberapa bioregion yang

diduga dapat mempengaruhi karakteristik madu hutan. Karakteristik madu hutan dipengaruhi oleh lingkungan dimana nektar diperoleh (Pribadi dan Wiratmoko 2019). Berbagai manfaat madu pada bidang kesehatan diantaranya berperan sebagai antioksidan, antimikroba (Machado De-Melo *et al.* 2017; Osés *et al.* 2016), antihipertensi, imunomodulator dan anti inflamasi (Hiwatashi *et al.* 2010; Hussein *et al.* 2013). Penelitian yang dilakukan oleh Mavric *et al.* (2008) menunjukkan bahwa madu memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Aktivitas antibakteri disebabkan oleh kadar air yang rendah, tekanan osmotik yang tinggi dan pH rendah yang menghambat pertumbuhan bakteri. Selain itu, aktivitas antimikroba madu juga disebabkan oleh adanya beberapa senyawa fenolik seperti pinocembrin dan asam siringat.

Dalam pengolahan pasca panen madu, kadar air madu harus berada di bawah limit batas yang telah ditetapkan oleh regulasi nasional (BSN 2004) yaitu dibawah 22% atau regulasi internasional yaitu dibawah 20% (Codex 2001). Kadar air yang rendah pada madu dapat menghambat proses fermentasi dan kristalisasi madu selama proses penyimpanan (Chen 2019). Proses pengurangan kadar air pada madu dapat dilakukan dengan pemanasan, namun perlu mempertimbangkan faktor suhu dan lama pemanasan agar tidak merusak komponen dalam madu (Nirwantoro dan Hermawati 2012). Akan tetapi, penelitian yang dilakukan oleh Turkmen *et al.* (2006) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari madu mengalami kenaikan seiring dengan kenaikan dari suhu pemanasan, sehingga perlakuan panas dalam pengurangan kadar air dapat dilakukan untuk menjaga kualitas madu tanpa merusak komponen bioaktif yang terkandung didalamnya. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh pemanasan terhadap stabilitas senyawa metabolit sekunder pada madu *A. mellifera* hutan akasia dari Provinsi Riau, Indonesia, diantaranya analisis kadar air, penapisan senyawa metabolit sekunder, pengukuran aktivitas antioksidan, pengukuran total kadar fenolik/ *total phenolic compound* (TPC) dan pengukuran kadar total flavonoid/ *total flavonoid compound* (TFC).

## BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini menggunakan bahan utama berupa madu lebah *A. mellifera* yang diambil dari hutan akasia (*Accacia crassicarpa*) di Provinsi Riau. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini meliputi HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ammonia, serbuk magnesium, amil alkohol, kloroform, FeCl<sub>3</sub>, pereaksi Meyer, pereaksi Wagner, DPPH, kuersetin, asam galat, AlCl<sub>3</sub>, methanol, pereaksi Folin-Ciocalteu, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dan kalium asetat.

Sampel merupakan madu lebah *A. mellifera* yang dternak oleh masyarakat lokal di habitat hutan akasia (*Accacia crassicarpa*). Lokasi pengambilan sampel berada di Desa Dayun, Kabupaten Siak, Provinsi Riau, Indonesia. Pengambilan sampel dilakukan sekitar bulan Mei 2022. Sarang lebah yang sudah siap dipanen diambil. Madu dipisahkan dari sarang lebah menggunakan mesin pemutar (*spinner*), dikumpulkan dan disimpan dalam wadah yang bersih dan kering.

Sampel madu yang sudah dikumpulkan dibagi menjadi 3 bagian. Bagian pertama merupakan sampel tanpa perlakuan pengeringan. Bagian kedua yaitu dengan cara dioven pada suhu 50 °C selama 5 hari yang bertujuan untuk mengurangi kadar air pada madu. Bagian ketiga yaitu dengan cara dioven pada suhu 105 °C selama 6 jam dengan tujuan untuk menghilangkan seluruh kadar air dalam sampel. Ketiga sampel kemudian dimasukkan masing-masing ke dalam wadah tertutup, kering, dan tidak tembus cahaya, kemudian disimpan dalam lemari pendingin pada suhu sekitar 4 °C sampai dilakukan analisis.

Pengukuran kadar air dilakukan triplo pada semua sampel dengan mengacu prosedur SNI 01-2891-1992. Sampel ditimbang dalam cawan porselen kering kemudian di oven pada suhu 105 °C selama 3 jam atau sampai bobotnya konstan. Selanjutnya sampel dimasukkan dalam desikator untuk menurunkan suhunya. Setelah itu, bobot akhir sampel dan kadar air ditimbang. Semua sampel diuji secara kualitatif terhadap kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Penapisan senyawa metabolit sekunder meliputi pengujian golongan alkaloid, fenolik-flavonoid, terpenoid, saponin, dan tannin.

Sebanyak 1 gram sampel ditambahkan dengan 8 mL HCl 1% kemudian diaduk sampai

larut dan di saring (Saeed *et al.* 2012). Sebanyak 1 mL filtrat ditambahkan pereaksi Meyer 1 mL. Terbentuknya endapan coklat mengindikasikan adanya alkaloid pada sampel (Anandi *et al.* 2021). Tabung reaksi yang berbeda, sebanyak 1 mL filtrat ditambahkan 1 mL pereaksi Wagner. Terbentuknya endapan putih kekuningan mengindikasikan adanya alkaloid pada sampel (Anandi *et al.* 2021).

Sebanyak 1 gram sampel dilarutkan dalam akuades 20 mL, lalu dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Filtrat dibagi dua dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Filtrat pertama ditambahkan dengan FeCl<sub>3</sub> 10%. Terbentuknya warna hijau, biru, atau hitam mengindikasikan adanya senyawa fenolik (Handayani *et al.* 2017). Filtrat kedua ditambahkan dengan 5 mL amil alkohol, 1 mL HCl pekat, dan bubuk magnesium. Terbentuknya lapisan warna mengindikasikan adanya senyawa flavonoid (Anandi *et al.* 2021; Agustikawati *et al.* 2017).

Sebanyak 0,5 g sampel dilarutkan dalam 2 mL kloroform. Kemudian larutan ditambahkan 3 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat (Saeed *et al.* 2012). Warna coklat kemerahan mengindikasikan adanya senyawa terpenoid (Saeed *et al.* 2012) sedangkan warna kehijauan mengindikasikan adanya senyawa steroid (Anandi *et al.* 2021).

Sebanyak 1 g sampel ditambahkan dengan 10 mL akuades lalu dikocok dengan kuat. Indikasi adanya senyawa saponin apabila terbentuk busa yang stabil (Savithamma *et al.* 2011; Kumari *et al.* 2017).

Sebanyak 1 g sampel dilarutkan dengan 20 mL akuades, kemudian dididihkan dan disaring. Sebanyak 2 mL filtrat ditambahkan dengan beberapa tetes FeCl<sub>3</sub> lalu diamati perubahan warna pada larutan. Adanya warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman mengindikasikan adanya tanin (Saeed *et al.* 2012).

Aktivitas penangkapan radikal bebas (*radical scavenging activity*) DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil*) digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan pada sampel. Penentuan aktivitas antioksidan mengikuti prosedur kerja Aryal *et al.* (2019). Sampel dilarutkan dengan metanol dengan rentang konsentrasi 0-30.000 µg/mL. Sebanyak 2 mL sampel dicampurkan dengan 2 mL DPPH 0,1 mM. Selanjutnya sampel diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap.

Setelah itu, sampel dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 517 nm. Persentase aktivitas antioksidan diukur dengan menghitung rasio antara selisih absorbansi blanko dan sampel dibandingkan dengan absorbansi blanko

Setelah aktivitas antioksidan didapatkan pada konsentrasi sampel secara berseri, nilai  $IC_{50}$  (*inhibition concentration of 50*, yaitu konsentrasi yang dapat menghambat 50 persen radikal bebas) dihitung dengan membuat persamaan regresi linier. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$ , semakin besar aktivitas antioksidan sampel.

Kadar total fenolik (TPC) pada sampel ditentukan dengan metode spektrofotometri dan mengacu pada Maeng *et al.* (2016). Kurva standar dibuat menggunakan asam galat pada rentang konsentrasi 0-200  $\mu\text{g/mL}$ . TPC dihitung dalam satuan setara miligram asam galat per gram sampel (*miligram gallic acid equivalent per gram sample* atau  $\text{mgGAE/g}$  sampel). Sebanyak 0,2 mL sampel (10  $\text{mg/mL}$ ) dicampurkan dengan 1,8 mL akuades dan 0,2 mL pereaksi Folin-Ciocalteu. Sampel kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 6 menit. Setelah itu, larutan sampel ditambahkan 2 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% (b/v) dan dihomogenkan. Kemudian larutan diinkubasi selama 90 menit lalu absorbansinya dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm.

Penentuan kadar total flavonoid (TFC) menggunakan metode Dowd secara spektrofotometri dan mengacu pada Aryal *et al.* (2019). Kurva standar menggunakan kuersetin dengan rentang konsentrasi 0-100  $\mu\text{g/mL}$ . TFC disajikan dalam miligram kuersetin per gram sampel (*miligram quercetin per gram sample* atau  $\text{mgQE/g}$  sampel). Larutan sampel 10  $\text{mg/mL}$  sebanyak 1 mL ditambahkan 0,2 mL  $\text{AlCl}_3$  10% (b/v) dalam methanol. Kemudian larutan sampel ditambahkan dengan 0,2 mL  $\text{CH}_3\text{COOK}$  1 M dan 5,6 mL akuades lalu dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit. Setelah itu, larutan sampel dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 415 nm.

Data kadar air dan penapisan senyawa aktif dianalisis dan disajikan secara deskriptif. Analisis regresi linier dilakukan untuk membuat kurva aktivitas antioksidan, kurva standar asam galat, dan kurva standar kuersetin. Data TPC, dan TFC

diolah menggunakan perangkat lunak SPSS 25 menggunakan uji ANOVA satu arah (*one way analysis of variance*) dengan tingkat kepercayaan 95%. Analisis lanjutan dengan tes Tukey ( $\alpha=0,05$ ) dilakukan apabila ditemukan perbedaan yang berbeda nyata antara kelompok perlakuan pada uji ANOVA. Analisis korelasi bivariat Pearson berdasarkan nilai koefisien korelasi  $R^2$  juga dilakukan untuk melihat hubungan kadar air,  $IC_{50}$  antioksidan, total fenolik, dan total flavonoid pada sampel (Moniruzzaman *et al.* 2013). Analisis korelasi menggunakan perangkat Microsoft Excel 2010.

## HASIL

Tabel 1 memperlihatkan bahwa perlakuan pengeringan dapat menurunkan kadar air pada sampel. Perlakuan pemanasan 105  $^{\circ}\text{C}$  selama 6 jam menguapkan air yang terkandung dalam madu secara sempurna sedangkan perlakuan pemanasan 50  $^{\circ}\text{C}$  selama 5 hari hanya menurunkan kadar air sekitar 9%.

Keberadaan senyawa metabolit sekunder pada sampel dilakukan secara kualitatif dengan mengamati sinyal berupa warna atau endapan yang diberikan setelah reaksi kimia dilakukan. Analisis penapisan senyawa aktif menunjukkan bahwa sampel dengan perlakuan pemanasan 50  $^{\circ}\text{C}$  selama 5 hari, dan pengeringan 105  $^{\circ}\text{C}$  selama 6 jam mengandung semua golongan senyawa metabolit sekunder yang diuji, yaitu alkaloid, fenolik, flavonoid, terpenoid, saponin, dan tannin. Pengujian senyawa tannin tidak memberikan sinyal positif pada sampel tanpa perlakuan pengeringan, namun positif terhadap pengujian golongan alkaloid, fenolik, flavonoid, terpenoid, dan saponin (Tabel 1).

### Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Senyawa DPPH digunakan sebagai sumber radikal bebas pada penentuan aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan diukur menggunakan beragam konsentrasi pada sampel. Sampel madu tanpa pengeringan dan sampel madu dengan pengeringan 50  $^{\circ}\text{C}$  selama 5 hari menggunakan rentang konsentrasi 0-15000  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan sampel dengan pengeringan 105  $^{\circ}\text{C}$  selama 6 jam menggunakan rentang konsentrasi 0-1250  $\mu\text{g/mL}$  (Gambar 1). Nilai aktivitas antioksidan

**Tabel 1.** Kadar Air dan Penapisan Senyawa Metabolit Sekunder Madu *A. mellifera*.

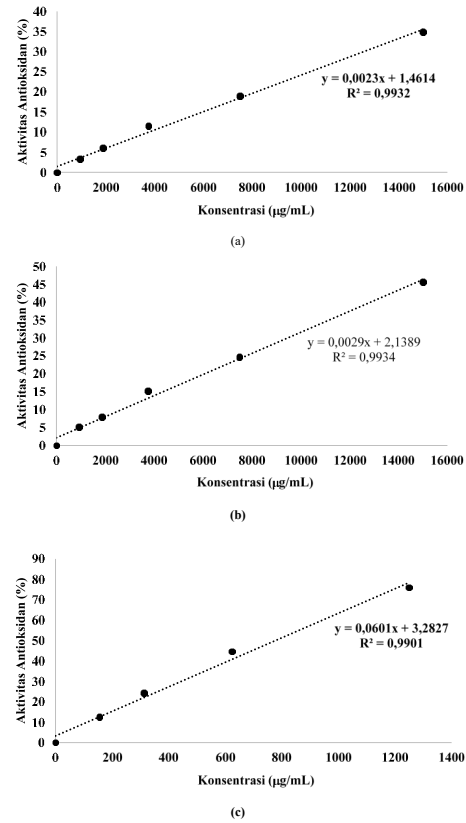
Jenis Pengujian	Sampel Madu (Pengeringan)		
	Tanpa	50 °C (5 hari)	105 °C (6 jam)
Kadar Air (%)	26,07	17,21	0
Alkaloid: Meyer	+	+	+
Alkaloid: Wagner	+	+	+
Fenolik	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Terpenoid	+	+	+
Saponin	+	+	+
Tanin	-	+	+

**Keterangan:** tanda positif (+) menunjukkan hasil pengujian terdapat senyawa metabolit sekunder sedangkan tanda negatif (-) menunjukkan hasil pengujian tidak terdapat senyawa metabolit sekunder.

dan konsentrasi dari ketiga sampel digunakan untuk membuat kurva regresi aktivitas antioksidan yang selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub> dari ketiga sampel. Nilai IC<sub>50</sub> adalah konsentrasi yang dapat menghambat 50% dari radikal bebas dalam pengujian. Persamaan regresi untuk sampel tanpa pengeringan adalah  $y(\text{aktivitas antioksidan (\%)}) = 0,0023x(\text{konsentrasi sampel}) + 1,4614$ , dengan nilai koefisien determinasi R<sup>2</sup> sebesar 99,32%. Persamaan regresi untuk sampel dengan pengeringan 50 °C selama 5 hari adalah  $y(\text{aktivitas antioksidan (\%)}) = 0,0029x(\text{konsentrasi}) + 2,1389$ , dengan nilai koefisien determinasi R<sup>2</sup> sebesar 99,34%. Persamaan regresi untuk sampel dengan pengeringan 105 °C selama 6 jam adalah  $y(\text{aktivitas antioksidan (\%)}) = 0,601x(\text{konsentrasi sampel}) + 3,2827$ , dengan nilai koefisien determinasi R<sup>2</sup> sebesar 99,01%. Berdasarkan persamaan regresi dari ketiga sampel, didapatkan nilai IC<sub>50</sub> secara berurutan dari sampel tanpa pengeringan, pengeringan 50 °C selama 5 hari, dan pengeringan 105 °C selama 6 jam yaitu 21103,74 µg/mL, 16503,83 µg/mL, dan 777,33 µg/mL (Tabel 2).

**Kadar Total Fenolik (TPC)**

Penentuan TPC sampel dihitung berdasarkan kurva standar asam galat. Kurva standar asam galat memiliki persamaan regresi  $y(\text{absorbansi}) = 0,005x(\text{konsentrasi}) + 0,0048$  dengan koefisien



**Gambar 1.** Aktivitas Antioksidan Metode DPPH pada Berbagai Konsentrasi Sampel Madu *A. Mellifera* (a) Tanpa Perlakuan; (b) Pengeringan 50 °C Selama 5 Hari; dan (c) Pengeringan 105 °C Selama 6 Jam.

determinasi R<sup>2</sup> = 99,97% (Gambar 2a). TPC tertinggi ada pada perlakuan pengeringan 105 °C selama 6 jam yaitu 13,94 ± 0,55 mgGAE/g. TPC pada sampel madu tanpa pengeringan dan pengeringan 50 °C selama 5 hari yaitu 1,59 ± 0,06 mgGAE/g dan 0,67 ± 0,03 mgGAE/g (Tabel 2). TPC dari setiap perlakuan memiliki nilai rerata yang berbeda nyata pada uji ANOVA (p < 0,05) dan pada uji lanjut Tukey, nilai TPC pada semua perlakuan memiliki nilai yang berbeda nyata pada α= 5% (Tabel 2).

**Kadar Total Flavonoid (TFC)**

Kadar total flavonoid/ *total flavonoid compound* (TPC) ditentukan dengan cara memasukkan nilai absorbansi sampel pada persamaan regresi pada kurva standar kuersetin yaitu  $y = 0,0062x - 0,006$  dengan nilai koefisien determinasi R<sup>2</sup> = 99,94 (Gambar 2b). Hasil perhitungan TFC pada sampel tanpa perlakuan, dengan pemanasan 50 °C selama 5 hari, dan pemanasan 105 °C selama 6 jam secara berurutan

yaitu  $0,34 \pm 0,05$  mgGAE/g,  $0,46 \pm 0,08$  mgGAE/g, dan  $4,37 \pm 0,02$  mgGAE/g (Tabel 2). Sama seperti hasil TPC, TFC tertinggi ada pada perlakuan pemanasan pemanasan  $105^{\circ}\text{C}$  selama 6 jam dan paling rendah pada sampel tanpa perlakuan. Analisis data menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa TFC dari setiap perlakuan memiliki nilai yang berbeda nyata pada nilai  $\alpha = 5\%$ . Namun, pada uji lanjut Tukey, sampel tanpa perlakuan dan sampel dengan pemanasan  $50^{\circ}\text{C}$  selama 5 hari berada dalam subset yang sama yang artinya memiliki nilai yang tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Selain itu, hasil uji lanjut Tukey juga menunjukkan bahwa sampel dengan pemanasan  $105^{\circ}\text{C}$  selama 6 jam, memiliki TFC yang berbeda nyata dengan kedua kelompok lainnya.

**Korelasi Kadar Air, IC<sub>50</sub> Antioksidan, TPC, dan TFC**

Analisis korelasi Pearson terhadap kadar air, IC<sub>50</sub> antioksidan DPPH, TPC, dan TFC menunjukkan hubungan yang kuat karena semua nilai koefisien korelasi ( $R^2$ ) lebih besar dari 90% (Monirizzaman *et al.* 2013) (Tabel 3).

Berdasarkan hasil analisis korelasi, semakin rendah kadar air sampel berhubungan dengan peningkatan nilai aktivitas antioksidan (diindikasikan dengan nilai IC<sub>50</sub> yang semakin rendah) ( $R^2= 98,49\%$ ), peningkatan TPC ( $R^2=92,44\%$ ), dan peningkatan TFC (90,43%). Selain itu, peningkatan aktivitas antioksidan juga berhubungan erat dengan TPC ( $R^2= 97,61\%$ ) dan TFC ( $R^2= 96,38\%$ ) pada sampel.

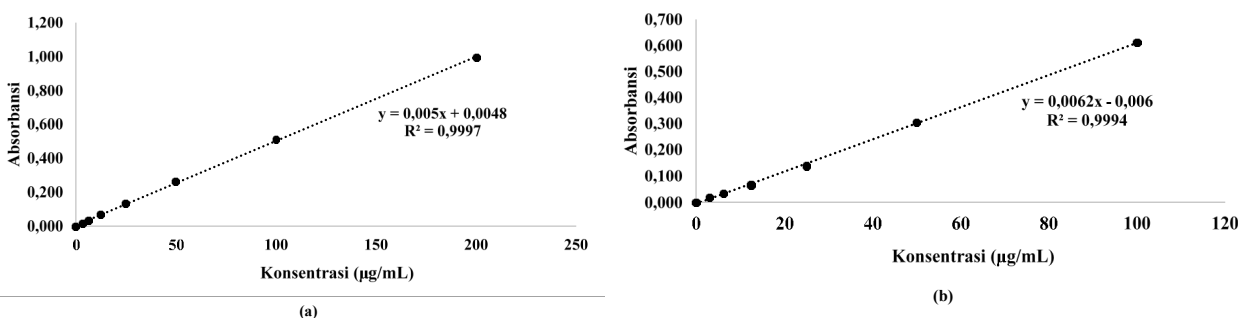
**PEMBAHASAN**

Kadar air dari madu Indonesia berkisar 22,9% (Nirwantoro dan Hermawati 2012). Kadar air pada madu dari berbagai negara tropis lainnya diantaranya madu dari Malaysia memiliki kadar air sebesar 14.86–17.53%, Bangladesh 12.79%-22.32%, Brazil 16,4%-19,4% dan India 17.20-21.60% (Islam *et al.* 2012; Moniruzzaman *et al.* 2013; Saxena *et al.* 2010; do Nascimento *et al.* 2018). Kadar air madu berdasarkan regulasi internasional harus kurang dari atau sama dengan 20% (Codex 2001). Regulasi dari Indonesia sendiri mengharuskan madu yang dipasarkan maksimal memiliki kadar air 22% (BSN 2004).

**Tabel 2.** Total Fenolik, Total Flavonoid, dan IC<sub>50</sub> Penangkapan Radikal Bebas DPPH Madu *A. mellifera*

Sampel	IC <sub>50</sub> Penangkapan Radikal Bebas DPPH (µg/mL)	TPC (mgGAE/g)	TFC (mgQE/g)
Madu tanpa pengeringan	21103,74	$0,67 \pm 0,03^a$	$0,34 \pm 0,05^a$
Madu pengeringan $50^{\circ}\text{C}$ selama 5 hari	16503,83	$1,59 \pm 0,06^b$	$0,46 \pm 0,08^a$
Madu pengeringan $105^{\circ}\text{C}$ selama 6 jam	777,33	$13,94 \pm 0,55^c$	$4,37 \pm 0,02^b$

**Keterangan:** Perbedaan huruf (<sup>a-c</sup>) pada kolom TPC dan TFC menunjukkan nilai yang berbeda nyata pada uji Tukey ( $p < 0,05$ ) dengan tingkat kepercayaan 95%.



**Gambar 2.** Kurva Standar: (a) Asam Galat dan (b) Kuersetin.

**Table 3.** Hasil Analisis Korelasi Pearson Bivariat pada Kadar Air, IC<sub>50</sub> Antioksidan DPPH, TPC dan TFC.

Parameter Uji Korelasi	Nilai R <sup>2</sup> (%)		
	Kadar Air	IC <sub>50</sub> Antioksidan	TPC
IC <sub>50</sub> Antioksidan	98,49		
TPC	92,44	97,61	
TFC	90,43	96,38	99,87

Kadar air madu harus di bawah limit dikarenakan kadar air yang rendah dapat menghambat proses fermentasi dan kristalisasi madu selama proses penyimpanan (Chen 2019). Kadar air pada sampel madu tanpa perlakuan pemanasan yaitu 26,07%. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa madu dari beberapa bioregion di Provinsi Riau memiliki kadar air 23,83%-26,7% (Pribadi dan Wiratmoko 2019). Madu dari beberapa negara tropis seperti Bangladesh, India, dan Indonesia, termasuk madu dari hutan Riau, memiliki kadar air relatif tinggi sehingga perlu upaya pengolahan pasca pemanenan untuk mengurangi kadar air, supaya kadar airnya memenuhi standar kualitas madu berdasarkan SNI dan Codex. Proses pengolahan pasca panen untuk mengurangi kadar air pada madu dapat dilakukan dengan pemanasan, namun perlu mempertimbangkan faktor suhu dan lama pemanasan supaya tidak merusak komponen dalam madu dan penggunaan energi untuk pemanasan dapat efisien (Nirwantoro dan Hermawati 2012). Kadar air pada pemanasan 105<sup>o</sup>C selama 6 jam dapat menurunkan kadar air sampai 0%, sedangkan pengeringan 50<sup>o</sup>C selama 5 hari hanya dapat menurunkan kadar air sampai 17,21%. Berdasarkan acuan dari Codex (2001) dan BSN (2004), kadar air pada perlakuan pemanasan 50<sup>o</sup>C selama 5 hari sudah memenuhi standar kualitas madu untuk dipasarkan. Pengeringan madu pada suhu 50<sup>o</sup>C merupakan pengeringan yang belum sempurna karena madu masih bersifat basah (Nirwantoro dan Hermawati 2012). Salah satu faktor yang perlu dipertimbangkan dalam pemilihan suhu saat proses penurunan kadar air pada madu adalah stabilitas bahan yang tersedia dalam madu seperti senyawa metabolit sekunder. Suhu tinggi dapat mengganggu stabilitas bahan dalam madu

(Nirwantoro dan Hermawati 2012).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa madu *A. mellifera* dari hutan akasia Kabupaten Siak, Provinsi Riau, Indonesia mengandung senyawa metabolit sekunder yang cukup beragam yaitu alkaloid, fenolik, flavonoid, terpenoid, saponin, dan tanin. Penelitian yang dilakukan oleh Yelin dan Kuntadi (2019) pada madu monoflora jawa (madu mangga, kapuk dan karet) dari lebah *A. mellifera* dan madu multiflora (madu hutan) dari lebah *A. dorsata* menunjukkan bahwa mengandung flavonoid dan saponin, tetapi negatif terhadap uji alkaloid, saponin, triterpenoid, dan tanin (Yelin dan Kuntadi 2019). Penelitian yang dilakukan oleh Rasyiid & Susandarini (2020) menunjukkan bahwa madu lebah *A. dorsata* dari Sulawesi Tengah mengandung alkaloid, fenolik, flavonoid, tannin, dan terpenoid. Setiap jenis madu mungkin memiliki kandungan metabolit sekunder yang berbeda yang disebabkan oleh perbedaan spesies lebah, sumber pakan, dan habitat. Keberagaman kandungan senyawa metabolit sekunder pada madu dapat dijadikan salah satu penciri suatu jenis madu.

Stres oksidatif terjadi ketika jumlah antioksidan lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah *reactive oxygen species* (ROS) di dalam tubuh. ROS merupakan produk samping respirasi oksidatif yang bersifat radikal bebas. ROS yang diproduksi berlebih didalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada lipid, protein, dan DNA. Kemudian, kerusakan yang disebabkan oleh ROS dapat menyebabkan munculnya berbagai jenis penyakit, diantaranya diabetes dan berbagai jenis kanker (Jubri *et al.* 2013). Kebutuhan antioksidan dapat dicukupi dengan mengkonsumsi bahan pangan yang kaya akan antioksidan. Madu merupakan salah satu bahan pangan yang kaya akan antioksidan. Sumber antioksidan pada madu dapat berupa antioksidan enzimatik dan antioksidan non-enzimatik. Antioksidan enzimatik pada madu diantaranya yaitu glucose oxidase, dan katalase, sedangkan antioksidan non enzimatik berupa senyawa metabolit sekunder seperti asam askorbat, senyawa fenolik, senyawa flavonoid, senyawa asam fenolik, senyawa turunan karotenoid, dan asam-asam organik (El-Senduny *et al.* 2021).

Aktivitas antioksidan berbanding terbalik dengan nilai  $IC_{50}$  antioksidan. Semakin kecil konsentrasi  $IC_{50}$  suatu sampel mengindikasikan tingginya aktivitas antioksidan sampel tersebut. Madu *A. mellifera* hutan akasia Riau tanpa perlakuan pengeringan memiliki aktivitas antioksidan ( $IC_{50}$  DPPH = 21103,74  $\mu\text{g/mL}$ ) yang jauh lebih besar dibandingkan dengan madu *A. mellifera* dari Brazil yang memiliki rentang  $IC_{50}$  DPPH 25450  $\mu\text{g/mL}$ -294260  $\mu\text{g/mL}$  (do Nascimento *et al.* 2018) dan madu *A. mellifera* akasia dari Malaysia yang memiliki nilai  $IC_{50}$  DPPH lebih dari 60000  $\mu\text{g/mL}$  (Moniruzzaman *et al.* 2013). Berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan, kadar air pada madu *A. mellifera* hutan akasia Riau (kadar air = 26,01%) memiliki kadar air paling rendah jika dibandingkan dengan madu *A. mellifera* asal Malaysia (kadar air = 15,16%) (Moniruzzaman *et al.* 2013) dan Brazil (kadar air 16,4%-19,4%) (do Nascimento *et al.* 2018). Perbedaan aktivitas antioksidan madu sampel dengan penelitian sebelumnya mungkin terjadi karena berasal dari wilayah geografis yang berbeda sehingga mengakibatkan perbedaan iklim dan habitat yang berpengaruh pada perbedaan metabolit sekunder pada sumber pakan lebah.

Aktivitas antioksidan juga dianalisis pada sampel madu yang diberi perlakuan pengeringan 50 °C selama 5 hari dan 105°C selama 6 jam. Aktivitas antioksidan sampel madu dengan pengeringan 105 °C selama 6 jam ( $IC_{50}$  = 777,33  $\mu\text{g/mL}$ ) lebih besar dari sampel madu dengan pengeringan 50 °C selama 5 hari ( $IC_{50}$  = 16503,83  $\mu\text{g/mL}$ ), lebih besar dari sampel madu tanpa pengeringan. Hal ini mungkin disebabkan oleh kandungan kadar air pada sampel madu dengan pengeringan 105 °C selama 6 jam paling rendah dibandingkan kadar air sampel madu dengan pengeringan 50 °C selama 5 hari dan sampel madu tanpa pengeringan. Rendahnya kadar air membuat madu semakin terkonsentrat sehingga konsentrasi metabolit sekunder pada sampel semakin tinggi. Paling tingginya aktivitas antioksidan pada sampel dengan perlakuan panas tinggi 105°C dibandingkan perlakuan panas 50 °C dan tanpa perlakuan, mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sekunder pada madu *A. mellifera* hutan akasia Riau relatif tidak rusak dan stabil terhadap perlakuan panas. Penelitian yang dilakukan oleh

Turkmen *et al.* (2006) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada madu mengalami peningkatan seiring dengan kenaikan suhu pemanasan. Perlakuan pengeringan dengan suhu tinggi pada madu *A. mellifera* hutan akasia Riau dapat dilakukan untuk mengurangi kadar air karena tidak mengurangi aktivitas antioksidan madu sehingga karakter fungsionalnya sebagai sumber antioksidan tetap terjaga.

Penentuan TPC dan TFC menjadi bagian dari analisis sampel yang berhubungan dengan aktivitas antioksidan. Sampel yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi biasanya memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder golongan fenolik dengan kadar yang relatif tinggi. Pengukuran TPC pada penelitian ini dilakukan pada sampel madu tanpa perlakuan, dengan perlakuan pemanasan 50 °C selama 5 hari, dan dengan perlakuan pemanasan 105 °C selama 6 jam. TPC madu *A. mellifera* dari hutan akasia Riau tanpa perlakuan pemanasan pada penelitian ini ( $0,67 \pm 0,03$  mgGAE/g) memiliki kisaran yang sama dengan madu *A. mellifera* dari Brazil (0,26-1,00 mgGAE/g) (do Nascimento *et al.* 2018) dan lebih besar dari madu *A. mellifera* akasia dari Malaysia (0,187 mgGAE/g) (Monirizzaman *et al.* 2013). Namun, TPC madu *A. mellifera* dari Brazil dan Malaysia jauh lebih rendah jika dibandingkan dengan madu *A. mellifera* akasia Riau pasca perlakuan pemanasan 50 °C ( $1,59 \pm 0,06$  mgGAE/g) yang memiliki kadar air yang mirip dengan kadar air madu dari Malaysia dan Brazil. TPC pada sampel madu *A. mellifera* dari hutan akasia Riau pasca perlakuan pemanasan 105 °C selama 6 jam menunjukkan TPC tertinggi yang mencapai  $13,94 \pm 0,55$  mgGAE/g.

Uji ANOVA dan uji lanjut Tukey ( $\alpha= 0,05$ ) menunjukkan TPC madu *A. mellifera* hutan akasia Riau tanpa perlakuan pemanasan secara berbeda nyata lebih rendah dibandingkan sampel madu dengan perlakuan pemanasan 50 °C selama 5 hari ( $p<0,05$ ) dan secara berbeda nyata lebih rendah dari sampel madu dengan perlakuan pemanasan 105 °C selama 6 jam ( $p<0,05$ ). Hal ini dapat terjadi karena perlakuan pemanasan membuat senyawa metabolit sekunder dalam madu lebih pekat karena perlakuan pemanasan dapat menurunkan kadar air pada sampel. Selain itu, tingginya TPC pada sampel dapat juga



disebabkan oleh karakter senyawa-senyawa fenolik pada sampel yang relatif tahan terhadap suhu tinggi. Hal ini didukung oleh semakin meningkatnya aktivitas antioksidan pada sampel walaupun sampel diberikan perlakuan suhu yang tinggi. Aktivitas antioksidan berhubungan erat dengan TPC (Moniruzzaman *et al.* 2013). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa senyawa fenolik yang diekstraksi pada suhu tinggi menggunakan *microwave* dihasilkan nilai total fenolik yang lebih tinggi dibandingkan dengan nilai total fenolik pada sampel yang diekstraksi dengan metode konvensional (Bhuyan *et al.* 2015; Ince *et al.* 2013; Sánchez-Camargo *et al.* 2021).

TFC madu *A. mellifera* habitat hutan akasia Riau tanpa perlakuan pemanasan (0,34 mgQE/g) jauh lebih tinggi dibanding madu *A. mellifera* dari Brazil (0 - 0,026 mgQE/g) (do Nascimento *et al.* 2018) dan Malaysia (0,022 mgQE/g) (Moniruzzaman *et al.* 2013). Hal ini dapat terjadi karena adanya perbedaan geografis dan iklim yang berdampak pada perbedaan habitat. Sejalan dengan TPC dan aktivitas antioksidan, TFC pada perlakuan pemanasan 105 °C selama 6 jam secara berbeda nyata lebih tinggi ( $p < 0,05$ ) dari TFC sampel madu pada perlakuan pemanasan 50 °C selama 5 hari dan lebih rendah dari TFC sampel madu tanpa perlakuan. Sama seperti penjelasan pada TPC, TFC pada sampel juga berhubungan dengan aktivitas antioksidan sampel. Tingginya TFC yang seiring dengan meningkatnya suhu perlakuan mengindikasikan bahwa senyawa flavonoid pada sampel relatif stabil pada perlakuan panas. Perlakuan panas juga membuat sampel lebih pekat karena panas dapat menguapkan air pada sampel. Hal ini dapat disebabkan oleh terkonsentrasinya senyawa metabolit sekunder pada perlakuan pemanasan akibat terjadinya penurunan kadar air. Selain itu, peningkatan TPC yang seiring dengan peningkatan suhu pada sampel mengindikasikan bahwa senyawa fenolik pada sampel relatif tahan terhadap suhu tinggi.

Senyawa fenolik yang terdapat didalam madu terbagi menjadi dua kelompok besar, yaitu asam fenolik dan flavonoid. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ciulu *et al.* (2016), senyawa asam fenolik yang paling umum ditemukan di madu yaitu asam galat, asam kafeat, asam siringatd, metil siringat, 4-hydroxybenzoic

acid, asam protokatekuat, asam vanilat, asam mandelat, asam fenil asetat, asam homogentisik, asam fenilpropanoat, asam sinamat, asam p-kumarik, asam ferulat, asam rosmarinat, asam klorogenat (Ciulu *et al.* 2016). Cianciosi *et al.* 2018 melaporkan bahwa madu mengandung senyawa flavonoid diantaranya kuersetin, kaemferol, krisin, pinokembrin, pinobanksin, galangin, katekin, genistein, isorhamnetin, luteolin, mirisetin dan rutin (Cianciosi *et al.* 2018). Selain memiliki aktivitas antioksidan, senyawa fenolik dan flavonoid pada madu juga memiliki banyak manfaat untuk kesehatan, diantaranya bersifat antibakteri (Moniruzzaman *et al.* 2014), dapat menghambat SARS-CoV-2 (Ferdian *et al.* 2021), menghambat agregasi trombosit (Guerrero *et al.* 2005), dapat menurunkan tekanan darah dan memperbaiki sel endothelium (Olas 2020; Sánchez *et al.* 2006), antikanker (Cianciosi *et al.* 2018; Aliyu *et al.* 2013), dan berbagai manfaat kesehatan lainnya.

Analisis korelasi Pearson telah banyak dilaporkan pada penelitian sebelumnya antara aktivitas antioksidan dengan TPC dan TFC, yang menyebutkan bahwa aktivitas antioksidan berkorelasi kuat dengan TPC dan TFC (Moniruzzaman *et al.* 2013; Krpan *et al.* 2009; de-Miguel *et al.* 2014; Aryal *et al.* 2019; Saeed *et al.* 2012). Uji korelasi terhadap dua variabel dapat dikatakan memiliki hubungan yang kuat jika nilai koefisien korelasi  $R^2$  lebih dari 75%. Hasil uji korelasi Pearson dalam penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan berhubungan kuat dengan TPC ( $R^2=97,61\%$ ) dan TFC ( $R^2=96,38\%$ ) pada semua perlakuan. Korelasi yang kuat ini mengindikasikan bahwa peningkatan aktivitas antioksidan (dengan nilai  $IC_{50}$  yang semakin rendah) sejalan dengan peningkatan TPC dan TPC pada sampel madu. Selain dipengaruhi oleh TPC dan TFC, aktivitas antioksidan juga mungkin meningkat pada sampel madu dengan perlakuan pemanasan karena terbentuknya senyawa baru hasil reaksi Maillard yang memiliki aktivitas antioksidan (Manzoco *et al.* 2001). Madu mengandung gula dan protein sehingga reaksi Maillard dapat terjadi ketika diberi perlakuan panas.

Pada penelitian ini juga dilakukan analisis korelasi Pearson antara kadar air dengan aktivitas antioksidan, TPC, dan TFC. Analisis

korelasi menunjukkan bahwa kadar air dalam penelitian ini memiliki hubungan yang erat dengan aktivitas antioksidan ( $R^2=98,49\%$ ), TPC ( $R^2=92,44\%$ ), dan TFC ( $R^2=90,43\%$ ). Variabel kadar air pada penelitian ini digunakan sebagai pengaruh dari perlakuan pemanasan. Sampel tanpa perlakuan pemanasan memiliki kadar air yang lebih tinggi dari sampel dengan pemanasan  $50\text{ }^\circ\text{C}$  dan lebih tinggi dari sampel dengan pemanasan  $105\text{ }^\circ\text{C}$ . Beberapa penelitian menyebutkan bahwa aktivitas antioksidan madu pada pemanasan dapat meningkat atau menurun. Hal ini bergantung pada kandungan zat dalam madu tersebut (Šarić *et al.* 2013).

Senyawa metabolit sekunder biasanya dapat rusak oleh perlakuan pemanasan. Kerusakan ini dapat diindikasikan dengan penurunan aktivitas antioksidan (kenaikan nilai  $IC_{50}$  antioksidan), dan perubahan sinyal positif pada penapisan senyawa metabolit sekunder. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemanasan cenderung tidak merusak senyawa metabolit sekunder pada madu karena sampel dengan perlakuan pemanasan tidak mengalami penurunan aktivitas antioksidan, TPC dan TFC, serta tidak berubahnya sinyal positif pada penapisan senyawa metabolit sekunder. Meningkatnya aktivitas antioksidan, TPC, dan TFC pada sampel madu yang dipanaskan dapat terjadi karena adanya pemekatan sampel seiring dengan berkurangnya kadar air serta stabilnya senyawa metabolit sekunder pada madu terhadap perlakuan panas (termostabil). Peningkatan aktivitas antioksidan juga dapat disebabkan oleh adanya senyawa baru hasil reaksi Maillard pada pemanasan madu.

## KESIMPULAN

Madu *A. mellifera* yang dipanen dari hutan akasia dari Desa Dayuh, Kabupaten Siak, Provinsi Riau Indonesia mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, fenolik, flavonoid, terpenoid, saponin, dan tannin yang dapat dijadikan penciri dari madu jenis ini. Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa perlakuan pemanasan pada sampel madu cenderung tidak mempengaruhi stabilitas senyawa metabolit sekunder (termostabil) karena tidak ditemukannya penurunan aktivitas antioksidan,

TPC, dan TFC. Peningkatan aktivitas antioksidan, TPC, dan TFC pada sampel madu dengan perlakuan panas disebabkan oleh pemekatan sampel seiring dengan berkurangnya kadar air.

## KONTRIBUSI PENULIS

Para penulis naskah ini memiliki kontribusi yang sama dalam pembuatan naskah. PRF dan THH membuat konsep dan kerangka penelitian. AP mengumpulkan dan preparasi sampel dari lapangan. THH, MAB, RLRA, RRE, dan PRF melakukan analisis laboratorium. Semua penulis bersama-sama melakukan pengolahan data dan penulisan naskah.

## DAFTAR PUSTAKA

- [BSN] Badan Standar Nasional. 1992. SNI 01-2891-1992. Cara Uji Makanan dan Minuman. Badan Standarisasi Nasional.
- [BSN] Badan Standar Nasional. 2004. SNI 01-3545-2004. Madu. Badan Standarisasi Nasional.
- Agustikawati, N., Andayani, Y., Suhendra, D. 2017. Uji aktivitas antioksidan dan penapisan fitokimia dari ekstrak daun pakoasi dan kluwih sebagai sumber antioksidan alami. *JPPIPA*. 3(2): 60-67.
- Aliyu, M., Odunola, O.A., Farooq, A.D., Rasheed, H., MESAİK, A.M., Choudhary, M.I., Channa, I.S., Khan, S.A., Erukainure, O.L. 2013. Molecular mechanism of antiproliferation potential of Acacia honey on NCI-H460 cell line. *Nutrition and Cancer*, 65(2), pp.296-304.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., Battino, M. 2010. Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 3(1): 15–23.
- Anandi, F., Ferdian, P.R., Pratiwi, J., Amalia, R.L.R., Haerul, Fitriana, N., Nurinsiyah, A.S. 2021. Penapisan senyawa aktif dan uji toksisitas  $LC_{50}$  lendir dua spesies keong darat: *Hemiplecta humphreysiana* Lea, 1849 dan *Amphydromus palaceus* Mousson, 1849 sebagai sediaan nutrikosmesetikal potensial. *Zoo Indonesia*.

- 30(2): 106-116.
- Aryal, S., Baniya, M.K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., Koirala, N. 2019. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from western NO (12): 9514–32.
- Bhuyan, D.J., Vuong, Q.V., Chalmers, A.C., van Altena, I.A. 2015. Microwave-assisted extraction of *Eucalyptus robusta* leaf for the optimal yield of total phenolic compounds. *Industrial Crops and Products* 69: 290–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.044>.
- Chen, C. 2019. Relationship between water activity and moisture content in floral honey. *Foods* 8(1).
- Cheung, Y., Meenu, M., Yu, X., Xu, B. 2019. Phenolic acids and flavonoids profiles of commercial honey from different floral sources and geographic sources. *International Journal of Food Properties* 22(1): 290–308.
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T.Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo-Rodríguez, P., Manna, P.P., Zhang, J., Bravo Lamas, L., Martínez Flórez, S., Agudo Toyos, P. and Quiles, J.L., 2018. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules*, 23(9), p.2322.
- Ciulu, M., Spano, N., Pilo, M. I., Sanna, G. 2016. Recent advances in the analysis of phenolic compounds in unifloral honeys. *Molecules* 21(4).
- Codex Alimentarius Commission, “Revised Codex Standard for Honey Codex Stan 12-1981, Rev. 1 (1987), Rev. 2 (2001),” Codex Standard, Vol. 12. 1981, pp. 1-7. 9pal. *Plants*. 8 (96): 1-12. <http://dx.doi.org/10.3390/plants8040096>.
- de-Miguel, S., Pukkala, T., Yeşil, A., 2014. Integrating pine honeydew honey production into forest management optimization. *European Journal of Forest Research*, 133(3), pp.423-432.
- do Nascimento, K.S., Sattler, J.A.G., Macedo, L.F.L., González, C.V.S., de Melo, I.L.P., da Silva Araújo, E., Granato, D., Sattler, A., de Almeida-Muradian, L.B. 2018. Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. *LWT*, 91, pp.85-94.
- El-Senduny, F. F., Hegazi, N.M., Abd Elghani, G.E., Farag, M.A. 2021. Manuka honey, a unique mono-floral honey. a comprehensive review of its bioactives, metabolism, action mechanisms, and therapeutic merits. *Food Bioscience* 42 (December 2020): 101038. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101038>
- Ferdian, P. R., Elfirta, R. R., Ikhwan, A. Z. N., Kasirah, K., Haerul, H., Sutardi, D., & Ruhiat, G. Ferdian, P.R., Elfirta, R.R., Ikhwan, A.Z.N., Kasirah, K., Haerul, H., Sutardi, D. and Ruhiat, G., 2021. Studi in silico senyawa fenolik madu sebagai kandidat inhibitor Mpro SARS-CoV-2. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. 31(3), pp.213-232.
- Guerrero, J. A. et al. 2005. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3(2): 369–76.
- Handayani, S., Wirasutisna, K.R., Insanu, M. 2017. Penapisan fitokimia dan karakterisasi simplisia daun jambu mawar (*Syzygium jambos* Alston). *JF FIK UINAM*. 5(3): 174-183.
- Hiwatashi, K., Narisawa, A., Hokari, M. and Toeda, K., 2010. Antihypertensive effect of honey-based beverage containing fermented rice bran in spontaneously hypertensive rats. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 57(1):.40-43.
- Hussein, S.Z., Mohd Yusoff, K., Makpol, S. and Mohd Yusof, Y.A., 2013. Gelam honey attenuates carrageenan-induced rat paw inflammation via NF-κB pathway. *PLoS One*, 8(8), p.e72365.
- Ince, A.E., Sahin, S., Şümmü, S.G. 2013. Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 37(1): 69–75.
- Islam, A., Khalil, I., Islam, N., Moniruzzaman, M., Mottalib, SA. Sulaiman, SH. Gan.

2012. Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12.
- Jubri, Z., NBA. Rahim, GJ. Aan.. 2013. Manuka honey protects middle-aged rats from oxidative damage. *Clinics* 68(11): 1446–54.
- Krpan, M., Marković, K., Šarić, G., Skoko, B., Hruškar, M., Vahčić, N. 2009. Antioxidant activities and total phenolics of acacia honey. *Czech journal of food sciences*, 27 (Special Issue 1), pp. Antioxidant-Activities.
- Kumari, P., Kumari, C., Singh, P.S. 2017. Phytochemical screening of selected medicinal plants for secondary metabolites. *International Journal Life. Science Research*. 3(4): 1151-1157.
- Machado De-Melo, A.A., Almeida-Muradian, L.B.D., Sancho, M.T., Pascual-Maté, A., 2018. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), pp.5-37.
- Maeng, J.H., Shahbaz, H.M., Ameer, K., Jo, Y., Kwon, J.H. 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from *Coriolus versicolor* mushroom using response surface methodology. *Journal of Food Process Engineering*. 2016: 1-8. doi:10.1111/jfpe.12421.
- Manyi-Loh, C.E., Ndip, R.N., Clarke, A.M. 2011. Volatile compounds in honey: a review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *International Journal of Molecular Sciences* 12
- Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M.C., Lerici, C.R. 2001. Review on non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends in Food Science & Technology*. 11 (2001): 340-346.
- Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., Henle, T. 2008. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant anti-bacterial constituent of manuka (*Leptospermum Scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition and Food Research* 52(4): 483–89.
- Moniruzzaman, M., Khalil, M.I., Sulaiman, S.A., Gan, S.H. 2014. Identification of phenolic acids and flavonoids in monofloral honey from Bangladesh by high performance liquid chromatography: determination of antioxidant capacity. *BioMed Research International* 2014.
- Moniruzzaman, M., Khalil, M.I., Sulaiman, S.A., Gan, S.H. 2013. “Physicochemical and Antioxidant Properties of Malaysian Honeys Produced By.” *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13(43): 1–12.
- Nirwantoro, D.N., Hermawati, E., 2012. Optimasi pembuatan serbuk madu dengan menggunakan metoda pengeringan vakum. In *Industrial Research Workshop and National Seminar*.
- Olas, B. 2020. “Honey and Its Phenolic Compounds as an Effective Natural Medicine for Cardiovascular Diseases in Humans?” *Nutrients* 12(2): 1–14.
- Osés, S.M., Pascual-Maté, A., de la Fuente, D., de Pablo, A., Fernández-Muiño, M.A. and Sancho, M.T., 2016. Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*. 78: 29-33.
- Pribadi, A. and Wiratmoko, M.E., 2019. Karakter madu lebah hutan (*Apis dorsata* Fabr.) dari berbagai bioregion di Riau. *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 37(3), pp.184-196.
- Rasyiid, M. and Susandarini, R., 2020. Pollen diversity and secondary metabolites in honey produced by *Apis dorsata* binghami from Central Sulawesi, Indonesia. *J Pharmacogn Phytochem*. 9(2), pp.2305-2309.
- Saeed, N., Khan, M.R., Shabbir, M. 2012. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12: 221. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/12/221>.
- Sánchez, Manuel et al. 2006. “Quercetin Downregulates NADPH Oxidase, Increases ENOS Activity and Prevents Endothelial Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats.” *Journal of Hypertension* 24(1): 75–84.

- Sánchez-Camargo, Ad. P., Vivas, D.B., Puello, L.M.B., Correa, H.A.M, Alfonso, F.P., Cifuentes, A., Ferreira, S.R.S., Gutierrez, L.F. 2021. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant and anti-proliferative activities from supercritical CO<sub>2</sub> pre-extracted mango peel as valorization strategy. *Lwt* 137 (June).
- Šarić, G., Marković, K., Vukičević, D., Lež, E., Hruškar, M. and Vahčić, N., 2013. Changes of antioxidant activity in honey after heat treatment. *Czech Journal of Food Sciences*, 31(6), pp.601-606.
- Saxena, S., Gautam, S., Sharma, A. 2010. Physical, biochemical and antioxidant properties of some indian honeys. *Food Chemistry*.118(2):391–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.001>.
- Sihombing, D.T.H, 1994. Ilmu Ternak Lebah Madu, Gadjah Mada University Press.
- Syahriati, UA, N. F., Latifah, H., Nirwana. 2021. Physicochemical and color characteristic of the Bawakaraeng Forest Honey, South Sulawesi. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 886, No. 1, p. 012057). IOP Publishing.
- Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E. S., Velioglu, Y. S. 2006. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, 95(4), 653-657.
- Yelin, A., Kuntadi. 2019. Phytochemical identification of honey from several regions in Java and Sumbawa. *AIP Conference Proceedings* 2120(July): 3–8.

