

## Penentuan kandungan asid organik dalam madu kelulut daripada sumber bunga dan spesies yang berbeza

(Determination of organic acids in stingless bee honey from different floral sources and species)

Sharina Shamsudin, Jinap Selamat, Maimunah Sanny, Nuzul Noorahya Jambari, Shamsul Bahari Abd. Razak dan Alfi Khatib

### Pengenalan

Madu kelulut adalah sebatian semula jadi yang boleh didapati di kawasan tropika dan subtropika di seluruh dunia seperti di Australia, Amerika Selatan, Afrika dan Malaysia. Lebih daripada 500 spesies lebah kelulut (*Apidae: Hymenoptera: Meliponini*) telah direkodkan. Walau bagaimanapun, hanya dua genera iaitu *Melipona* dan *Trigona* yang lazimnya ditenak di seluruh dunia. Di Malaysia, terdapat 33 spesies lebah kelulut telah direkodkan. Hanya dua spesies dipelihara secara komersial untuk menghasilkan madu iaitu *Heterotrigona itama* (Gambar 1) dan *Geniotrigona thoracica* (Gambar 2). *H. itama* ialah spesies yang paling banyak dipelihara oleh penternak lebah berbanding dengan *G. thoracica*. Kedua-dua spesies ini berbeza dari segi warna dan saiznya. Saiz badan purata *H. itama* ialah  $4.7 \pm 1.55$  mm, manakala *G. thoracica* ialah  $7.44 \pm 2.05$  mm. *H. itama* berwarna hitam dengan sayap berwarna kelabu, manakala *G. thoracica* berwarna coklat dengan sayap berwarna coklat gelap dan putih di hujung.

Seperti madu lebah, madu kelulut adalah sebatian semula jadi kompleks yang mengandungi sekurang-kurangnya 200 komponen. Secara umum, komponen utama madu kelulut



Gambar 1. *Heterotrigona itama*



Gambar 2. *Geniotrigona thoracica*

ialah gula terutamanya monosakarida (fruktosa dan glukosa). Manakala komponen kedua yang paling tinggi ialah air/ kandungan kelembapan. Selain itu, ia juga mengandungi enzim, asid amino, protein, asid fenolik, flavonoid, asid organik, mineral dan vitamin dalam kuantiti yang sedikit. Kuantiti setiap komponen dalam madu berbeza-beza bergantung kepada sumber bunga, lokasi, iklim, masa penuaian madu, spesies dan kaedah pemprosesan madu.

Madu mengandungi asid organik sebanyak 0.5%. Walaupun amaunnya sedikit, ia memberi kesan yang penting pada ciri madu. Asid organik wujud dalam madu melalui tindak balas aerobik dan anaerobik semasa proses fermentasi yang boleh digunakan sebagai petunjuk kerosakan madu semasa penyimpanan, kesegaran dan ketulenan. Selain itu, ia juga bertanggungjawab ke atas ciri organoleptik madu seperti warna dan rasa. Tambahan pula, asid organik mempunyai kaitan dengan sifat fizikal dan sifat kimia madu seperti pH, keasidan dan konduktiviti elektrik. Kajian-kajian terdahulu juga telah melaporkan asid organik boleh mempengaruhi aktiviti antibakteria dan antioksidan madu. Adalah penting untuk mengkaji kandungan asid organik dalam madu kelulut. Tambahan pula, maklumat berkaitan kandungan asid organik dalam madu kelulut jarang dilaporkan. Oleh itu, objektif kajian ini adalah untuk menentukan kandungan asid organik dalam madu kelulut dan untuk menilai pengaruh sumber bunga dan spesies kelulut terhadap kandungan asid organik.

### Penyediaan sampel

Enam sampel madu kelulut yang dihasilkan oleh dua spesies lebah kelulut digunakan dalam kajian ini. Sampel madu kelulut diperoleh dari tiga ladang kelulut yang terletak di Terengganu, Pahang dan Johor. Sampel dituai pada bulan Ogos 2016. Sampel madu yang diperoleh berasal daripada sumber bunga yang berlainan iaitu akasia (*Acacia mangium*), gelam (*Meleleuca cajaputi* Powell) dan belimbing (*Averrhoa carambola* L.) (Jadual 1). Madu lebah (*Apis mellifera*) daripada akasia digunakan sebagai perbandingan dalam kajian ini. Sampel disimpan di dalam bekas plastik kedap udara (gred makanan) dan disimpan pada suhu  $4 \pm 2$  °C sehingga analisis dijalankan.

Jadual 1. Deskripsi sumber bunga madu kelulut yang digunakan dalam kajian ini

Spesies	Lokasi	Sumber bunga	Nama saintifik
<i>Heterotrigona itama</i>	Terengganu	Gelam	<i>Meleleuca cajaputi</i> Powell
<i>Geniotrigona thoracica</i>	Johor	Akasia	<i>Acacia mangium</i>
	Pahang	Belimbing	<i>Averrhoa carambola</i> L.
<i>Apis mellifera</i> (sebagai perbandingan)	Johor	Akasia	<i>Acacia mangium</i>

### **Pengekstrakan asid organik**

Setiap sampel madu (1 g) dilarutkan dalam 10 mL air suling. Campuran ini dihomogenkan dengan menggunakan pengadun *vortex*. Nilai pH larutan madu diselaraskan kepada kira-kira 10.50 (pH 10.5) dengan menambah 0.1 M larutan natrium hidroksida (NaOH) dan kemudian diaduk selama 15 minit menggunakan pengaduk magnet. Selepas itu, pH diselaraskan kepada kira-kira 5.00 (pH 5) menggunakan 0.1 M larutan asid sulfurik ( $H_2SO_4$ ). Langkah ini digunakan untuk memastikan asid organik wujud dalam bentuk bukan ionik sebelum digunakan dalam pengekstrakan fasa pepejal atau *solid phase extraction* (SPE). Kemudian, campuran ini ditambahkan dengan air sehingga 20 mL dan digoncang. Seterusnya, 10 mL larutan cair ditapis melalui membran selulosa asetat 0.45  $\mu$ L. Prosedur SPE digunakan untuk mengekstrak asid organik daripada sampel madu. Kartrij pertukaran ion digunakan dan kartrij diaktifkan dengan 10 mL 0.1 M larutan NaOH (kadar perkulasi ialah 3 mL/minit). Kemudian, larutan madu 10 mL dilalukan melalui kartrij pada kadar aliran 1 mL/minit. Kemudian, 10 mL air dilalukan melalui kartrij (3 mL/minit). Asid organik diekstrak dengan 4 mL 0.1 M larutan  $H_2SO_4$  (1 mL/minit). Larutan disimpan pada suhu  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  sehingga analisis dijalankan.

### **Penentuan asid organik menggunakan kromatografi cecair**

Larutan asid organik dianalisis menggunakan teknik kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC) fasa terbalik dengan pengesan *photodiode array* dan isi padu suntikan ialah 20  $\mu$ L. Kolum pemisah fasa terbalik [Spherisorb® ODS 2, (4.6 mm  $\times$  250 mm  $\times$  5  $\mu$ m)] digunakan. Asid organik dipisahkan menggunakan pelarut asetonitril dengan *metaphosphoric acid* (pH 2.28) pada kadar aliran 1 mL/minit. Sembilan asid organik piawai (glukonik, tartarik, formik, asetik, sitrik, D-malik, suksinik, laktik dan fumarik) digunakan sebagai perbandingan untuk mengenal pasti asid organik dalam sampel madu. Kepekatan asid organik dalam sampel madu dikira dengan menggunakan persamaan yang diperolehi daripada keluk tentukan bagi setiap piawai asid organik. Analisis dijalankan sebanyak tiga replikasi bagi setiap sampel madu.

### **Kandungan asid organik dalam sampel madu kelulut**

Kandungan asid organik dalam enam sampel madu kelulut dan madu *Apis mellifera* ditunjukkan seperti dalam *Jadual 2*. Dalam kajian ini, sembilan asid organik dianalisis dalam setiap sampel madu. Walau bagaimanapun, hanya empat asid organik (glukonik, laktik, asetik dan sitrik) yang dikesan dalam semua sampel madu yang dikaji. Asid formik dan asid D-malik tidak dikesan dalam semua sampel madu daripada spesies *G. thoracica*. Manakala, bagi madu daripada spesies *H. itama*, asid formik hanya dikesan dalam madu akasia dan D-malik dikesan dalam madu akasia dan gelam.

Jadual 2. Kepekatan asid organik (g/kg madu) madu kelulut daripada sumber bunga yang berbeza

Parameter	<i>Geniotrigona thoracica</i>		<i>Apis mellifera</i>		<i>Heterotrigona itama</i>		<i>Apis mellifera</i>	
	Akasia	Belimbing	Gelam	Akasia	Belimbing	Gelam		
Glukonik	0.48 <sup>Cb</sup> ± 0.005	0.07 <sup>Db</sup> ± 0.03	0.55 <sup>Bb</sup> ± 0.02	0.68 <sup>A</sup> ± 0.03	0.90 <sup>Ba</sup> ± 0.02	0.39 <sup>Ca</sup> ± 0.08	1.48 <sup>Aa</sup> ± 0.22	0.68 <sup>B</sup> ± 0.03
Tartarik	0.04 <sup>Bb</sup> ± 0.007	ND	0.002 <sup>Cb</sup> ± 0.003	0.15 <sup>A</sup> ± 0.01	0.06 <sup>Bb</sup> ± 0.006	0.03 <sup>Cb</sup> ± 0.01	0.002 <sup>Db</sup> ± 0.003	0.15 <sup>A</sup> ± 0.00
Formik	ND	ND	ND	ND	0.004 ± 0.006	ND	ND	ND
D-malik	ND	ND	ND	0.48 <sup>A</sup> ± 0.03	0.03 <sup>B</sup> ± 0.01	ND	0.03 <sup>B</sup> ± 0.01	0.48 <sup>A</sup> ± 0.03
Laktik	0.20 <sup>Aa</sup> ± 0.08	0.29 <sup>Aa</sup> ± 0.07	0.17 <sup>Aa</sup> ± 0.05	ND	0.15 <sup>Ba</sup> ± 0.05	0.52 <sup>Aa</sup> ± 0.12	0.18 <sup>Ba</sup> ± 0.02	ND
Asetik	0.09 <sup>Bb</sup> ± 0.002	0.08 <sup>Ba</sup> ± 0.02	0.06 <sup>Ba</sup> ± 0.02	0.39 <sup>A</sup> ± 0.03	0.30 <sup>Ba</sup> ± 0.06	0.06 <sup>Ba</sup> ± 0.02	0.01 <sup>Ba</sup> ± 0.001	0.39 <sup>A</sup> ± 0.03
Sitrik	0.04 <sup>Ba</sup> ± 0.002	0.05 <sup>Ba</sup> ± 0.004	0.03 <sup>Bb</sup> ± 0.003	0.42 <sup>A</sup> ± 0.27	0.04 <sup>Ba</sup> ± 0.002	0.06 <sup>Ba</sup> ± 0.005	0.09 <sup>Ba</sup> ± 0.19	0.42 <sup>A</sup> ± 0.27
Suksinik	0.52 <sup>Aa</sup> ± 0.08	0.07 <sup>Bb</sup> ± 0.10	ND	ND	0.32 <sup>Ab</sup> ± 0.03	0.38 <sup>Aa</sup> ± 0.10	0.34 <sup>Aa</sup> ± 0.01	ND

Bacaan asid organik adalah purata bagi tiga replikasi ± sisihan piawai.

ND: Tidak dapat dikesan

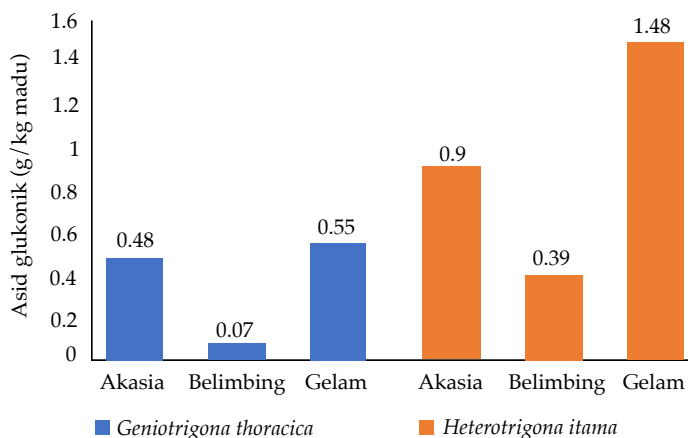
Bacaan dengan huruf besar yang berlainan dalam baris yang sama adalah berbeza secara signifikan ( $p < 0.05$ ) antara madu daripada sumber bunga yang berbeza yang dihasilkan oleh spesies lebah kelulut yang sama.

Bacaan dengan huruf kecil yang berlainan dalam baris yang sama adalah berbeza secara signifikan ( $p < 0.05$ ) antara madu yang dihasilkan oleh spesies lebah kelulut yang berlainan daripada sumber bunga yang sama.

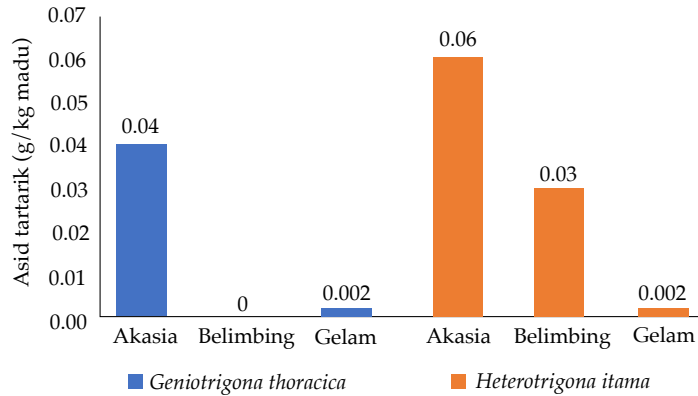
Asid glukonik ialah asid organik utama dalam semua sampel madu kelulut kecuali madu akasia dan belimbing daripada spesies *G. thoracica* dan madu belimbing daripada spesies *H. itama* dengan kandungan 0.07 – 1.48 g/kg madu (*Rajah 1*). Madu akasia dan belimbing daripada *G. thoracica* masing-masing mengandungi asid suksinik dan laktik yang paling tinggi berbanding dengan asid glukonik. Begitu juga madu belimbing daripada *H. itama* mengandungi asid laktik yang paling tinggi. Madu yang dihasilkan oleh *H. itama* menunjukkan jumlah asid glukonik lebih tinggi daripada madu yang dihasilkan oleh *G. thoracica*. Perbezaan ketara dapat diperhatikan dalam kandungan asid glukonik antara madu yang diperolehi daripada sumber bunga yang berlainan bagi kedua-dua spesies. Madu gelam daripada kedua-dua spesies mempunyai kandungan asid glukonik yang lebih tinggi berbanding dengan madu akasia dan belimbing.

Asid tartarik pula ditemui dalam semua sampel madu kelulut kecuali madu belimbing (*G. thoracica*) dengan jumlah kandungan 0.002 – 0.06 g/kg madu (*Rajah 2*). Perbezaan kandungan asid tartarik yang ketara dapat diperhatikan dalam semua sampel madu daripada sumber bunga berbeza bagi kedua-dua spesies. Selain asid tartarik, asid suksinik juga dikesan dalam madu kelulut dengan kandungan 0.07 – 0.52 g/kg madu (*Rajah 3*). Madu akasia daripada spesies *G. thoracica* mempunyai kandungan asid suksinik yang paling tinggi. Walau bagaimanapun, madu gelam daripada spesies *G. thoracica* tidak mengandungi asid suksinik. Semua sampel madu daripada spesies *G. thoracica* menunjukkan perbezaan kandungan asid suksinik yang ketara antara madu daripada sumber bunga berbeza. Manakala tiada perbezaan ketara diperhatikan antara sampel madu daripada spesies *H. itama*.

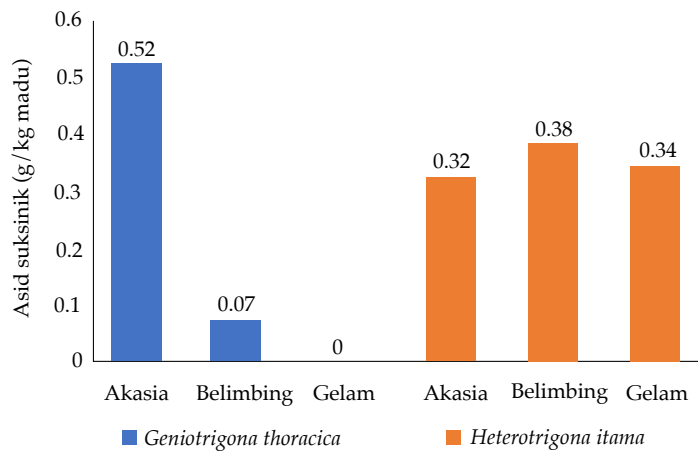
Asid laktik, asid asetik dan asid sitrik juga dikesan dalam semua sampel madu. Walau bagaimanapun, tiada perbezaan



*Rajah 1. Kandungan asid glukonik dalam sampel madu kelulut daripada sumber bunga berbeza*



Rajah 2. Kandungan asid tartarik dalam sampel madu kelulut daripada sampel bunga berbeza



Rajah 3. Kandungan asid suksinik dalam sampel madu kelulut daripada sampel bunga berbeza

ketara diperhatikan dalam kandungan asid asetik dan sitrik antara sampel madu daripada sumber bunga berbeza bagi kedua-dua spesies. Sampel madu (*H. itama*) daripada sumber bunga berbeza menunjukkan perbezaan yang ketara dalam kandungan asid laktik. Manakala tiada perbezaan ketara diperhatikan bagi sampel madu daripada spesies *G. thoracica*.

Secara keseluruhan, data menunjukkan terdapat perbezaan kandungan dan jenis asid organik dalam semua sampel madu yang dikaji. Perbezaan ini mungkin disebabkan oleh faktor sumber bunga dan spesies kelulut yang berbeza.

### Kesimpulan

Data menunjukkan madu kelulut sebagai sumber semula jadi asid organik. Asid glukonik merupakan asid organik utama dalam semua sampel madu kelulut dan kandungannya lebih tinggi berbanding dengan asid organik yang lain kecuali dalam madu

akasia dan belimbing daripada *G. thoracica* dan madu belimbing daripada *H. itama*. Hasil kajian juga menunjukkan bahawa jenis dan kandungan asid organik dalam madu kelulut dipengaruhi secara signifikan oleh spesies dan sumber bunga. Diharapkan data asid organik yang diperolehi dapat menyumbang sebagai maklumat tambahan kepada data madu kelulut sedia ada dan boleh digunakan sebagai rujukan.

### **Bibliografi**

- Mato, I., Huidobro, J.F., Simal-Lozano, J. dan Sancho, M.T. (2006). Analytical methods for the determination of organic acids in honey. *Critical reviews in analytical chemistry* 36: 3 – 11
- Sua´rez-Luquea, S., Matoa, I., Huidobroa, J.F., Simal-Lozanoa, J. dan Sancho, T. (2002). Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 955(2): 207 – 214
- Sancho, M.T., Mato, I., Huidobro, J.F., Fernandez-Muino, M.A. dan Pascual-Mate, A. (2013). Nonaromatic organic acids in honeys. Dalam: *Pot-honey: A legacy of stingless bee*, Edisi Pertama, (Patricia, V., Silvia, R.M.P. dan David, R., ed.) m.s. 447 – 457. London, New York: Springer
- Michener, C.D. (2013). The Meliponini. Dalam: *Pot-honey: A legacy of stingless bee*, Edisi Pertama, (Patricia, V., Silvia, R.M.P. dan David, R., ed.) m.s. 3 (Patricia, V., Silvia, R.M.P. dan David, R., ed.) m.s. 17. London, New York: Springer
- Norowi, M.H., Mohd, F., Sajap, A.S., Rosliza, J. dan Suri, R. (2010). Conservation and sustainable utilization of stingless bees for pollination services in agricultural ecosystems in Malaysia. *Proceedings of International Seminar on Enhancement of Functional Biodiversity Relevant to Sustainable Food Production*, m.s. 1 – 11

### **Ringkasan**

Madu kelulut merupakan sebatian semula jadi yang mengandungi lebih daripada 200 komponen termasuklah asid organik. Asid organik boleh mempengaruhi ciri organoleptik, fizikal, kimia, aktiviti antibakteria dan aktiviti antioksidan madu. Oleh itu, dalam kajian ini, enam sampel madu kelulut daripada tiga sumber bunga berbeza (akasia, belimbing dan gelam) yang dihasilkan oleh *Heterotrigona itama* dan *Geniotrigona thoracica* dikaji untuk menentukan kandungan asid organik serta untuk menilai pengaruh sumber bunga dan spesies ke atas kandungan asid organik. Empat asid organik (glukonik, laktik, asetik dan sitrik) berjaya dikesan dalam semua sampel madu kelulut. Asid glukonik (0.07 – 1.48 g/kg madu) dikesan paling tinggi dalam semua sampel madu kelulut berbanding dengan asid organik yang lain kecuali dalam madu akasia dan belimbing daripada *G. thoracica* dan madu belimbing daripada *H. itama*. Jenis dan kandungan asid organik dalam madu berbeza bergantung kepada sumber bunga dan spesies kelulut.

### **Summary**

Stingless bee honey is a natural substance and it contains more than 200 components including organic acids. Organic acids can affect organoleptic properties, physical properties, chemical properties, antibacterial activity and antioxidant activity of honey. Six samples of stingless bee honey from three different floral sources (acacia, starfruit and gelam) produced by *Heterotrigona itama* and *Geniotrigona thoracica* were studied to determine the organic acid content and to assess the effect of floral sources and species on organic acid content. Four organic acids (gluconic, lactic, acetic and citric) were successfully detected in all stingless bee honey samples. Gluconic acid (0.07 – 1.48 g/kg of honey) was found to be highest in all stingless bee honey samples compared to other organic acids except in acacia and starfruit honey from *G. thoracica* and starfruit honey from *H. itama*. The type and content of organic acids in honey varied depending on the floral source and the species of the bees.

### **Pengarang**

Sharina Shamsudin  
Pusat Penyelidikan Sains dan Teknologi Makanan  
Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM  
43400 Serdang, Selangor, Malaysia  
E-mel: sharina@mardi.gov.my

Prof. Dr. Jinap Selamat, Prof. Madya Dr. Maimunah Sanny dan Dr. Nuzul Noorahya Jambari  
Fakulti Sains dan Teknologi Makanan  
Universiti Putra Malaysia (UPM)  
43400 Serdang, Selangor, Malaysia

Shamsul Bahari Abd. Razak  
Pusat Pengajian Sains dan Teknologi Makanan  
Universiti Malaysia Terengganu (UMT)  
21030 Kuala Terengganu

Prof. Madya Dr. Alfi khatib  
Fakulti Farmasi  
Universiti Islam Antarabangsa Malaysia  
Kuantan 25200, Pahang, Malaysia