



## EKSPLORASI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MADU HUTAN ASAL PULAU TIMOR TERHADAP BAKTERI *Vibrio alginolyticus* SECARA IN VITRO

Yolanda Veronika Yuventa da Cunha<sup>1</sup>, Yuliana Salosso<sup>2</sup>, Franchy Christian Liufeto<sup>3</sup>

\*<sup>1</sup> : Mahasiswa, <sup>2</sup> Pembimbing I, <sup>3</sup> Pembimbing II\*

Fakultas Kelautan dan Perikanan, Jl. Adisucipto, Penfui 85001, KotakPos 1212, Tlp (0380)881589.  
\*ydcmalik@gmail.com\*

**Abstrak** - Madu bermanfaat bagi kesehatan, diantaranya sebagai zat antibakteri. Kandungan antibakteri yang terdapat dalam madu ini dapat digunakan untuk mengatasi masalah kesehatan ikan akibat bakteri. Kemampuan madu sebagai zat antibakteri ini dapat digunakan sebagai alternatif antibakteri yang ramah lingkungan untuk mengatasi masalah kesehatan ikan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui madu hutan pulau Timor yang paling baik digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *V.alginolyticus*, untuk mengetahui konsentrasi madu hutan terbaik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V.alginolyticus* dan untuk mengetahui kadar gula, kadar air serta pH dari madu hutan terbaik. Penelitian ini menggunakan 5 jenis madu hutan yang berasal dari Kefa, Soe, Naikliu, Amfoang dan Amfoang Selatan, yang kemudian di uji menggunakan uji cakram. Data hasil penelitian ini dianalisis dengan ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa madu yang paling baik digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *v.alginolyticus* adalah madu hutan kefa dengan konsentrasi terbaik 75%, pH sebesar 4,06, kadar gula sebanyak 72,60% dan kadar air sebanyak 26,65%.

**Kata kunci** : Madu Hutan, Zona Hambat, Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Honey bee is beneficial to health, including antibacterial substances. Antibacterial content found in honey bee can be used to treat fish health problems caused by bacteria. The ability of honey bee as an antibacterial substance can be used as an environmentally friendly antibacterial alternative to treat fish health problems. This research was conducted to find out the best forest Honey bee from Timor Island to inhibit the growth of bacteria *V. Alginolyticus*, to know the concentration of the finest forest honey bee that can inhibit the growth of bacteria *V. Alginolyticus* and to determine the sugar content, moisture content and pH of the best forest honey bee. The study was used 5 types of jungle honey bee derived from Kefa, Soe, Naikliu, Amfoang and South Amfoang, which was later tested using disc test. The data of the results was analyzed with ANOVA. The results showed that honey bee is best used to inhibit the growth of bacteria *V. Alginolyticus* is Kefa forest honey bee with a top concentration of 75%, pH of 4.06, sugar content as much as 72.60% and water content as much as 26.65%.

**Keywords**: Forest Honey bee, Obstacles Zone, *Vibrio alginolyticus* Bacteria



## PENDAHULUAN

Madu berkhasiat untuk menghasilkan energi, meningkatkan daya tahan tubuh dan meningkatkan stamina (Suranto, 2004). Madu mengandung suatu zat yang dapat mengurangi efek penuaan, memulihkan vitalitas dan menurunkan kolesterol. Selain tinggi vitamin, mineral dan antioksidan juga terdapat beberapa zat yang memiliki sifat antibiotik yang kuat serta membantu penyembuhan jaringan yang luka, mati dan bisul. Madu mempunyai konsentrasi gula yang tinggi dimana bakteri tidak dapat hidup dan berkembang. Selain itu, tingkat keasaman madu yang tinggi yaitu pH 3,65 akan mengurangi pertumbuhan dan daya hidup bakteri sehingga bakteri akan mati dan adanya senyawa radikal hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang bersifat dapat membunuh mikroorganisme patogen, serta adanya senyawa organik yang bersifat antibakteri yaitu, polifenol, flavonoid dan glikosida. Kandungan antibakteri yang terdapat dalam madu ini dapat digunakan untuk mengatasi masalah kesehatan ikan akibat bakteri.

Timbulnya penyakit dalam suatu usaha budidaya ikan bisa disebabkan karena lingkungan, pakan dan organisme patogen yang menyerang biota budidaya yang salah satunya adalah bakteri (Erawati dan Marsoedi, 2004). Bakteri yang sering menyerang ikan air laut di tingkat pembenihan maupun pembesaran yang paling serius dan menyebabkan kematian adalah serangan bakteri *Vibrio alginolyticus*.

Untuk mengatasi permasalahan akibat terinfeksi bakteri, umumnya pembudidaya ikan lebih banyak menggunakan bahan kimia dan antibiotik. Namun, apabila bahan kimia dan antibiotik tersebut digunakan dalam dosis yang tidak tepat maka akan menimbulkan masalah baru seperti pencemaran lingkungan, matinya organisme lain yang bukan sasaran dan timbulnya organisme yang resisten terhadap bahan kimia dan antibiotik tersebut. Selain itu, harganya yang mahal dan kesulitan mendapatkan antibiotik menyebabkan masyarakat cenderung membiarkan ikan mati (Muniruzzaman and Chowdhury, 2004 : Indu *et al*,

2006 dalam Sarti, 2013). Oleh karena itu, diperlukan alternatif untuk mengatasi permasalahan akibat terinfeksi bakteri dengan menggunakan bahan alami yang lebih aman dan mudah didapatkan seperti madu.

## METODE PENELITIAN

### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan selama 1 bulan dari 15 Oktober 2018 – 15 November 2018. Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kupang.

### B. Prosedur Penelitian

#### 1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua peralatan yang akan digunakan dicuci sampai bersih dengan deterjen lalu dikeringkan atau diangin-anginkan dengan suhu ruangan. Alat-alat yang sudah kering kemudian dibungkus dengan kertas dan disterilisasi menggunakan oven dengan suhu  $121^{\circ}C$  selama 30 menit, sedangkan bahan disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu  $181^{\circ}C$  selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

#### 2. Pembuatan Media TSA Solid dan Semi Solid

Terlebih dahulu membuat media TSA (Trypticase Soy Agar) solid 2% dengan dengan cara menimbang media TSA sebanyak 10 g dan NaCl sebanyak 3,75 g. Kemudian media dituangkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi aquades sebanyak 250 ml yang sudah disterilkan. Setelah itu larutan dipanaskan pada hot plate hingga mendidih dan homogen, lalu media dimasukkan pada autoklaf hingga suhu mencapai  $121^{\circ}C$ . Setelah itu dimasukkan pada waterbath agar suhu media stabil yaitu  $50^{\circ}C - 60^{\circ}C$ . Selanjutnya media dituang ke dalam cawan petri sebanyak 20ml/cawan dan disimpan di dalam *Laminary Air flow* dengan posisi terbalik untuk menguapkan kadar air yang terkandung dalam media.



Setelah itu dilanjutkan dengan pembuatan media TSA semi solid 2%. Media TSA ditimbang sebanyak 1 g dan NaCl sebanyak 0,375 g. Kemudian media dituangkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi aquadesh sebanyak 50 ml yang sudah disterilkan. Selanjutnya proses pemanasan sampai dengan penstabilan suhu larutan sama dengan pemanasan media TSA solid 2%. Selanjutnya bakteri *V. alginolyticus* ditambahkan sebanyak satu ose ke dalam larutan media, lalu media digoyangkan hingga homogen. Selanjutnya media dituangkan ke dalam cawan petri yang berisi media TSA solid.

### 3. Pengujian Antibakteri Madu Hutan Asal Pulau Timor

Madu hutan dari Pulau Timor ini akan diuji menggunakan uji cakram dengan konsentrasi yang sama yaitu 100%. Pengujian antibakteri madu hutan ini dilakukan dengan merendam kertas cakram pada appendorf yang telah diisi beberapa jenis madu dari Pulau Timor selama 15-20 menit, setelah itu kertas cakram diangkat menggunakan pinset dan diletakan pada cawan petri yang sudah disiapkan dan berisi bakteri *Vibrio alginolyticus*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam kemudian diamati pertumbuhannya hingga 48 jam.

### 4. Proses Pengenceran Madu Hutan Yang Terbaik Asal Pulau Timor

Setelah mendapatkan madu hutan Pulau Timor dengan zona hambat terbaik, maka dilakukan uji antibakteri lanjutan untuk mengetahui konsentrasi yang efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Madu hutan tersebut diencerkan menggunakan aquades hingga diperoleh konsentrasi 25%, 50% dan 75%.

Proses pengenceran madu hutan sebagai berikut, yaitu untuk konsentrasi 25% dibutuhkan madu 2,5 ml kemudian dicampur dengan aquadesh 7,5 ml, untuk konsentrasi 50% dibutuhkan madu 5 ml kemudian dicampur dengan aquadesh 5 ml, dan untuk konsentrasi 75% dibutuhkan madu 7,5 ml kemudian dicampur dengan aquadesh 2,5 ml.

### 5. Uji Antibakteri Dengan Metode Cakram Untuk Madu Hutan Yang Terbaik

Uji antibakteri madu hutan terbaik juga dilakukan menggunakan metode cakram, tetapi dengan perlakuan konsentrasi yang berbeda yaitu 25%, 50% dan 75%. Terlebih dahulu kertas cakram direndam selama 15 menit pada appendorf yang berisi madu hutan terbaik yang telah diencerkan dengan konsentrasi berbeda. Setelah itu kertas cakram diangkat menggunakan pinset dan diletakan pada cawan petri yang sudah disiapkan dan berisi bakteri *V. alginolyticus*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam kemudian diamati pertumbuhannya hingga 48 jam.

#### D. Rancangan Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari tiga perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan yang akan digunakan adalah sebagai berikut :

- Perlakuan A : Penggunaan madu hutan dengan konsentrasi 25%
- Perlakuan B : Penggunaan madu hutan dengan konsentrasi 50%
- Perlakuan C : Penggunaan madu hutan dengan konsentrasi 75%

#### E. Analisis Data

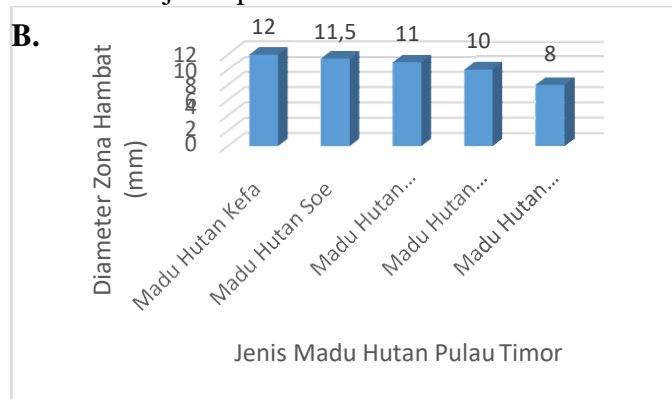
Untuk mengetahui pengaruh madu hutan terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* dilakukan analisis dengan menggunakan ANOVA dan bila berpengaruh nyata maka akan dilanjutkan Uji Beda Terkecil (BNT).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Aktivitas Antibakteri Madu Hutan Pulau Timor

Madu hutan pulau Timor yang digunakan dalam pengujian ini sebanyak 5 jenis yang berasal dari Kefa, Amfoang Selatan, Soe, Amfoang dan Naikliu. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui jenis madu hutan yang paling baik digunakan sebagai antibakteri untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Hasil pengukuran diameter zona hambat madu hutan

pulau Timor terhadap bakteri *V. alginolyticus* secara in vitro disajikan pada Gambar 1 berikut



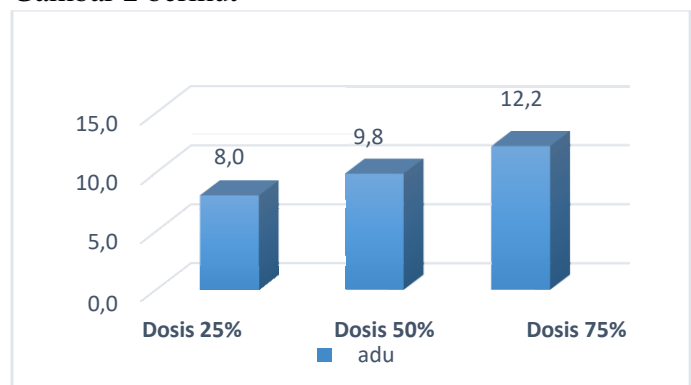
Gambar 1. Grafik pengukuran diameter zona hambat madu hutan asal pulau Timor terhadap bakteri *V. alginolyticus*

Gambar 1 menunjukkan bahwa kelima jenis madu hutan memiliki daya hambat yang berbeda terhadap bakteri *V. alginolyticus*. Jenis madu hutan Kefa memiliki daya hambat tertinggi yaitu 12 mm, selanjutnya jenis madu hutan Soe memiliki daya hambat 11,5 mm, jenis madu hutan Naikliu memiliki daya hambat 11 mm, jenis madu hutan Amfoang memiliki daya hambat 10 mm dan jenis madu hutan Amfoang Selatan memiliki daya hambat terendah yaitu 8 mm. Adanya perbedaan daya hambat kelima jenis madu terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* diduga karena adanya perbedaan kandungan nektar yang dihisap oleh lebah penghasil madu.

Selain faktor sumber tanaman, kondisi geografis serta keadaan iklim lingkungannya, lama penyimpanan madu juga berpengaruh terhadap kandungan komposisi madu. Lama penyimpanan ini berpengaruh pada kandungan gula yang terdapat di dalamnya. Hal ini sesuai dengan yang dikatakan oleh Ratnayani, *et al.*, (2008) yang mengatakan bahwa lama penyimpanan madu sangat berpengaruh terhadap komposisi akhir madu dan dapat meningkatkan proporsi disakarida selama waktu penyimpanan berlangsung. Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat, jenis madu hutan Kefa memiliki zona hambat terbaik yaitu 12 mm maka dilakukan uji lanjut pada madu hutan Kefa dengan konsentrasi yang berbeda.

## Hasil Pengujian Antibakteri Madu Hutan Kefa Pada Konsentrasi Berbeda

Berdasarkan hasil uji antibakteri beberapa madu hutan pulau Timor dengan konsentrasi 100% menunjukkan bahwa madu hutan dari Kefa memiliki daya hambat terbaik terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* yaitu 12 mm, maka dari itu dilakukan uji lanjutan dengan konsentrasi berbeda yaitu 25%, 50% dan 75%. Hasil rata-rata pengukuran diameter zona hambat madu hutan Kefa dengan konsentrasi berbeda disajikan pada Gambar 2 berikut



Gambar 2. Grafik rata-rata pengukuran diameter zona hambat madu hutan Kefa dengan konsentrasi berbeda terhadap bakteri *v. alginolyticus*.

Gambar 2 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 25% memiliki daya hambat sebesar 8 mm, pada konsentrasi 50% memiliki daya hambat sebesar 9,8 mm dan pada konsentrasi 75% memiliki daya hambat sebesar 12,2 mm. Hasil pengujian anova menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh sangat nyata terhadap bakteri *vibrio alginolyticus* dimana masing-masing konsentrasi memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*. Berdasarkan uji lanjutan Beda Nyata Terkecil menunjukkan bahwa pada perlakuan konsentrasi 75% berpengaruh nyata dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi 25% dan 50%. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa konsentrasi 75% merupakan konsentrasi terbaik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*.

Zona hambat yang terbentuk di sekitar koloni bakteri menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan pada bakteri uji. Hal ini dikarenakan



ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri madu antara lain keasaman, tekanan osmotik dan hidrogen peroksida, dan ada juga faktor nonhidrogen peroksida yang dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri madu seperti asam fenolik dan flavonoid yang juga terdapat di dalam madu. Di dalam madu juga diindikasikan terdapat senyawa fenol yang bersifat antibakteri, yang mana mekanismenya ialah dengan cara meracuni protoplasma, merusak dan menembus dinding sel serta akan mengendapkan protein sel mikroba (Hariyati, 2010). Kandungan hidrogen peroksida yang terdapat dalam madu juga dapat membunuh bakteri, hidrogen peroksida bekerja secara reaktif merusak gugus fungsi biomolekul pada sel bakteri. Faktor lain yang dapat memberikan aktivitas antibakteri pada madu secara umum yaitu kadar gula tinggi. Kandungan gula yang tinggi dapat menyebabkan tekanan osmosis pada madu, yang dapat menyebabkan kematian makhluk bersel satu seperti bakteri (Chepulis, 2008).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis madu, maka diameter zona hambat yang terbentuk semakin luas. Pada konsentrasi 75% kandungan madu yang terdapat pada larutan lebih banyak dibandingkan pada konsentrasi 50% dan 25%. Hal ini berkaitan dengan efek osmotik, dimana air yang dihasilkan pada proses pengenceran digunakan bakteri untuk tetap bertumbuh dengan melakukan berbagai kegiatan metabolisme dan reaksi enzimatik. Sehingga tidak terjadi pengikatan air secara kimiawi dalam gula akibat konsentrasinya yang tidak seimbang.

### C. Hasil Pengujian Kadar Air, Kadar Gula dan Nilai pH Madu Hutan Kefa

Hasil pengujian kadar air, kadar gula dan nilai pH madu hutan Kefa dapat dilihat pada tabel 1 berikut

Tabel 2. Hasil pengujian kadar air, kadar gula dan nilai pH madu hutan Kefa

No	Jenis Madu	Uji Fitokimia		
		Kadar Air	Kadar	Nilai pH
1	Madu Hutan Kefa	26,65	72,60	4,06

		(%)	Gula (%)	
1	Madu Hutan Kefa	26,65	72,60	4,06

Sumber : Data Hasil Penelitian

#### 1. Kadar Air

Berdasarkan Tabel 2 diperoleh hasil bahwa kadar air madu hutan Kefa menunjukkan hasil sebesar 26,65 %. Kadar air madu dipengaruhi kelembapan lingkungan yang ada. Hal ini disebabkan karena madu mempunyai sifat higroskopis, yaitu mudah menyerap air. Semakin tinggi kelembapan lingkungan maka kadar air madu akan semakin tinggi pula. Jika kelembapan 51%, kadar air madu 16,1%. Jika kelembapan 81%, kadar air madu 33,4% (Sarwono, 2007). Tingginya kadar air madu dapat disebabkan oleh kelembapan relatif udara (RH) dan tingginya suhu udara disekitarnya. Bila kadar air bahan relatif lebih rendah dari RH udara sekitarnya, menyebabkan kadar air bahan menjadi lebih tinggi karena terjadi penyerapan uap air dari udara sekitar. Kadar air yang rendah akan menjaga madu dari kerusakan untuk jangka waktu yang relatif lama.

Baroni *et al.*, (2009) mengatakan bahwa kadar air madu dapat dipengaruhi juga oleh faktor iklim, penanganan pasca panen, jenis nektar yang dikumpulkan dan tingkat kematangan madu. Umur panen juga mempengaruhi komposisi air pada madu. Madu yang dipanen pada umur tua mempunyai kadar air lebih sedikit daripada madu yang dipanen pada umur yang lebih muda. Semakin lama madu dalam sarang lebah maka penguapan kadar air pada madu akan semakin sempurna.

Air bebas terukur atau aw dibutuhkan oleh bakteri untuk bertumbuh dengan cara melakukan transpor nutrisi, membuang sisa metabolit, mengeluarkan reaksi enzimatik, mensintesis bahan-bahan sel dan melakukan reaksi biokimia yang lain (Ray, 1996 dalam Niga 2015). Semua kegiatan tersebut memerlukan air, jika air mengalami kristalisasi maka air tersebut tidak dapat digunakan oleh bakteri. Ketika aw menurun sampai tingkat minimum sel bakteri tetap hidup untuk sementara,



tetapi jika air akan menurun drastis bakteri akan kehilangan kemampuan hidupnya. Kehilangan air akan membuat bakteri mengalami *osmotic shock* dan *plasmolysis*, yang dimana dalam keadaan tersebut bakteri tidak dapat bertumbuh.

## 2. Kadar Gula

Berdasarkan Tabel 2 diperoleh hasil bahwa kadar gula madu hutan Kefa menunjukkan hasil sebesar 72,60 %. Tingginya kandungan gula akan menyebabkan madu menjadi pekat atau kental, sehingga membuat madu memiliki sifat higroskopis. Sifat higroskopis pada madu ini memungkinkan terjadinya dehidrasi mikroba yang mengakibatkan keadaan inaktif bahkan tanpa air mikroba tidak dapat bereplikasi atau bertahan hidup. Sifat higroskopis ini ditentukan oleh fruktosa. Hal ini dikarenakan fruktosa bersifat lebih mudah larut dibandingkan glukosa (Buba *et al.*, 2013).

Kandungan gula yang tinggi juga akan mempengaruhi rasa dan umur simpan madu (National Honey bee Board, 2003). Rasa manis pada madu ditentukan oleh rasio karbohidrat yang terkandungnya. Madu yang memiliki kandungan fruktosa lebih tinggi umumnya memiliki rasa lebih manis. Umur simpan madu dipengaruhi oleh kandungan gula. Kandungan gula pada madu menyebabkan madu memiliki sifat osmotik, sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Tekanan osmosis pada madu lebih besar dari 2.000 miliosmols. Selain itu juga, madu yang memiliki kandungan gula yang tinggi akan berwarna lebih gelap karena mengandung fenolik yang tinggi dibandingkan yang berwarna terang (Eleazu *et al.*, 2013).

## 3. Nilai pH

Berdasarkan Tabel 2 diperoleh hasil bahwa kandungan pH madu hutan Kefa menunjukkan hasil sebesar 4,06. Madu umumnya memiliki karakter yang cukup asam (pH 3,2 – 4,5) sehingga dapat menghambat pertumbuhan beberapa bakteri yang mempunyai pH minimum pertumbuhan sekitar 5,5 - 9. pH madu yang relatif asam dan kandungan protein yang rendah dapat membatasi jumlah air

yang tersedia untuk pertumbuhan mikroba dan dapat menghalangi pertumbuhan bakteri.

Madu yang memiliki pH rendah dapat mencegah pertumbuhan bakteri penyebab kerusakan. Selain itu, pH madu juga mempengaruhi flavor dan aroma (Khalil *et al.*, 2012). Oleh karena itu, pH madu yang rendah berpengaruh besar terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel bakteri dimana ketika pH turun sampai batas terendah pertumbuhan bakteri, tidak hanya sel bakteri yang akan berhenti pertumbuhannya tapi bakteri juga akan kehilangan kemampuan kehidupannya. Keasaman yang tinggi dapat berpengaruh pada komponen sel dan memberikan pengaruh yang merugikan terhadap struktur sel. Dengan keasaman yang tinggi, jumlah konsentrasi ion hidrogen juga akan meningkat, dimana hal ini akan mengganggu gradien transmembran proton dari sel bakteri (Mundo *et al.*, 2004).

## PENUTUP

### A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Jenis madu hutan pulau Timor yang paling baik untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio alginolyticus* adalah jenis madu hutan Kefa dengan rata-rata zona hambat 12 mm.
2. Konsentrasi madu hutan Kefa 75% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* dengan zona hambat 12,2 mm.
3. Kandungan pH, kadar gula dan kadar air dari madu hutan Kefa yaitu pH sebesar 4,06, kadar gula sebanyak 72,60% dan kadar air sebanyak 26,65%.

### B. Saran

Untuk melihat pengaruh langsung dari madu, maka saran dari penelitian ini yaitu agar dapat dilakukan penelitian lanjutan dengan mengaplikasikan secara langsung pada ikan yang terserang bakteri *Vibrio alginolyticus* dengan metode pengobatan yang tepat.



## DAFTAR PUSTAKA

- Baroni, M.V., Arrua, C., Nores, M.L., Fayé, P., Díaz, M.D.P., Chiabrando, G.A. dan Wunderlin, D.A. 2009. *Composition of honey bee from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South Provenance by chemometrics*. Food Chemistry 114(1): 727–733.
- Buba, Fatimah, Gidado, A. dan Shugaba, A. 2013. *Analysis of biochemical composition of honey bee sampel from NortEast Nigeria*. Journal of Biochemistry and Analytical Biochemistry 2(3): 1–7.
- Chepulis L., 2008. *Healing Honey bee: A Natural Remidy for Better Health and Wellness*, Universal-Publishers, USA
- Eleazu, C.O., Iroaganachi, M.A., Eleazu, K.C. dan Okoronkwo, J.O. 2013. *Determination of the physicochemical composition microbial quality and free radical scavenging activities of some commercially sold honey bee samples in Aba Nigeria. The effect of varying colours*. International Journal of Biomedical Research 4(1): 32–41.
- Erawati, C.L. dan Marsoedi. 2004. Pengaruh Pemberian Kasar daun Pepaya Dengan Dosis Yang Berbeda Terhadap Ikan Mas (*Cyprinus caprio*) Yang Terinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Jurnal Penelitian Perikanan Volume 7 Nomor 2. Universitas Brawijaya, Malang.
- Hariyati LP., 2010. Aktivitas Antibakteri Berbagai Jenis Madu Terhadap Mikroba Pembusuk (*Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070), Skripsi, UNS:8
- Khalil M.I., Moniruzzaman, M., Boukraa, L., Benhanifia, M., Islam, M.A., Islam, M.N., Sulaiman, S.A. dan Gan, S.H. 2012. *Physicochemical and antioxidant properties of algerian honey bee*. *Molecules* 17(9): 11199–11215
- Mundo, M.A., Olga, I., Padilla-Zakour, and R.W. Worobo. 2004. *Growth Inhibition of Food Pathogens and Food Spoilage Organisms by Selected Raw Honey bees*. International Journal of Microbiology 97 : 1-8.
- National Honey bee Board. 2003. *Honey bee-Health and Therapeutic Qualities. The National Honey bee Board*. USA. <http://www.jorgensensapiary.com/pdf/compedium.pdf>.
- Niga, M. I. B. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Beberapa Jenis Madu di Nusa Tenggara Timur terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophilia* dan *Vibrio alginolyticus*. Universitas Nusa Cendana.
- Ratnayani, K., et al. 2008. Penentuan Kadar Glukosa dan Fruktosa pada Madu Randu dan Madu Kelengkeng dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. ISSN 1907-9850. Jurnal Kimia 2 (2), Juli 2008 : 7-86.
- Sarti, Theresia. 2013. Uji Aktifitas Antibakteri Perasan Daun Miana (*Coleus blumei*, *Benth*) Dicampur Madu Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophilla* Secara In Vitro. Kupang. Universitas Nusa Cendana.
- Sarwono, B., 2007, Lebah Madu. Jakarta Selatan: AgroMedia Pustaka
- Suranto, Adji. 2004. Khasiat dan Manfaat Madu Herbal. Jakarta Agromedia Pustaka.

