

Aktivitas Antibakteri Madu Pahit Terhadap Bakteri Gram Negatif dan Gram Positif Serta Potensinya Dibandingkan Terhadap Antibiotik Kloramfenikol, Oksitetrasiklin dan Gentamisin

*Dwie Astrini, Marlia Singgih Wibowo, Ilma Nugrahani

Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10 Bandung 40132

Abstrak

Terdapat beberapa jenis madu pahit tersedia di perdagangan, namun informasi ilmiah mengenai khasiat madu pahit belum banyak diketahui. Secara tradisional madu pahit diduga memiliki efek antibakteri dan dapat menyembuhkan penyakit infeksi, sehingga madu sering digunakan saat pengobatan infeksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri madu pahit terhadap bakteri uji Gram negatif dan Gram positif serta mengetahui kesetaraan potensinya terhadap antibiotik kloramfenikol, gentamisin dan oksitetrasiklin. Uji yang dilakukan meliputi analisis fisikokimia (pH, keasaman, kadar air dan konduktivitas elektrik) dan uji aktivitas antibakteri. Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap 3 bakteri Gram negatif yaitu *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* serta 5 bakteri Gram positif yaitu *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, dan *Listeria monocytogenes*. Sampel madu yang digunakan terdiri dari 7 sampel madu pahit (A, B, C, D, E, F, dan G) dan 2 sampel madu manis (H dan I). Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bakterisid Minimum (KBM) diuji dengan menggunakan metode dilusi cair (*Broth Dilution Method*) dengan 10 konsentrasi (madu tanpa pengenceran, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, dan 10% b/v). Madu pahit yang memiliki aktivitas antibakteri paling baik kemudian dibandingkan potensinya terhadap antibiotik kloramfenikol, oksitetrasiklin, dan gentamisin menggunakan metode difusi agar. Ketujuh sampel madu pahit menunjukkan aktivitas antibakteri lebih tinggi terhadap bakteri uji Gram negatif dibandingkan terhadap Gram positif. Diameter hambat terhadap bakteri Gram negatif *Salmonella typhimurium* dan *Escherichia coli* masing-masing adalah antara 25,0 sampai 35,9 mm dan 26,2 sampai 35,0 mm. Kadar hambat minimum madu pahit terhadap bakteri uji berada dalam rentang 30-60% b/v sedangkan kadar bakterisid minimum berada dalam rentang 30-80% b/v. Dari hasil uji banding terhadap antibiotik diperoleh hasil bahwa 1 mL madu pahit C dan D masing-masing setara dengan 2,187 dan 1,838 mg kloramfenikol, 0,037 dan 0,032 mg oksitetrasiklin serta 0,013 dan 0,013 mg gentamisin.

Kata Kunci: madu pahit, efek antibakteri, kadar hambat minimum (KHM), kadar bakterisid minimum (KBM), antibiotik

Abstract

There are several types of "bitter honey" available in the market, however the scientific information about the efficacy of "bitter honey" is not widely known yet. Traditionally, "bitter honey" is known has antibacterial effects and can be used to support treatment of infection disease. Because of that, honey can be used during cure infection disease. The aim of this research are to determine the antibacterial activity of several bitter honey against some Gram negative and Gram positive bacteria and to evaluate the potency of the honey compared to antibiotics i.e chloramphenicol, oxytetracycline, and gentamycin. The analysis consist of physicochemical analysis (pH, acidity, water content, and electric conductivity) and antibacterial activity test. The antibacterial activity was analysed using three Gram negative bacteria (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) and five Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*). Samples of honey used in this research consist of seven samples of bitter honey (A, B, C, D, E, F, and G) and two samples of sweet honey (H and I). Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) have been tested using broth dilution method with 10 concentrations (honey without dilution, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, and 10% w/v). The "bitter honey" that showed the best antibacterial activity then tested for their potential activity against chloramphenicol, oxytetracycline and gentamicin. Seven samples of bitter honey showed higher level of activity against Gram negative than Gram positive bacteria tested. The diameter of inhibition against *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* were 25.0-35.9 mm and 26.2- 35.0 mm. The MIC of bitter honey against the tested bacteria were varies between 30-60% w/v and the MBC between 30- 80% b/v. Based on the result of comparative study to antibiotics, 1 mL of bitter honey C and D are equal to 2.187 and 1.838 mg of chloramphenicol, 0.037 and 0.032 mg of oxytetracycline and 0.013 and 0.013 mg of gentamycin.

Keywords: "bitter honey", antibacterial effect, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), antibiotics

Pendahuluan

Madu adalah cairan alami yang umumnya mempunyai rasa manis yang dihasilkan oleh lebah madu dari sari

bunga tanaman (floral nektar) atau bagian lain dari tanaman (ekstra floral nektar) atau ekskresi serangga (SNI 2004).

* Penulis korespondensi, e-mail: dwie.astrini@gmail.com

Madu merupakan sumber makanan yang baik. Madu mengandung air, glukosa, fruktosa, sukrosa, asam lemak, mineral, vitamin, asam organik dan berbagai enzim. Selain itu, madu juga mengandung zat yang berguna untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen baik Gram positif maupun Gram negatif penyebab penyakit infeksi (Hammad 2009).

Aktivitas antibakteri dari madu diketahui dari mekanisme yang dimiliki madu dalam melawan bakteri yaitu adanya tekanan osmotik yang tinggi, kadar air tidak lebih dari 20%, derajat keasaman yang rendah, adanya zat inhibin hidrogen peroksida dan faktor fitokimia (Molan 1992a).

Madu pahit merupakan salah satu jenis madu yang diperoleh dari lebah yang menghisap nektar bunga pahit sehingga menghasilkan cita rasa yang pahit. Pohon-pohon penghasil nektar pahit diantaranya adalah bakal kuncup bunga mahoni dan bunga pelawan. Terdapat beberapa jenis madu pahit yang tersedia dipasaran namun informasi ilmiah mengenai khasiat madu pahit tersebut belum banyak diketahui. Secara tradisional madu pahit diduga memiliki efek antibakteri.

Percobaan

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 7 sampel madu pahit yang terdiri dari: 2 sampel madu pahit pelawan yang berasal dari pasaran yang terdapat di provinsi Bangka Belitung (A dan B), 2 sampel madu pahit pelawan yang berasal dari pengumpul madu di provinsi Bangka Belitung (C dan D), 3 sampel madu pahit yang berasal dari pasaran yang terdapat di kota Bandung (E, F, dan G), 1 sampel madu manis lokal (madu rambutan) (H), dan 1 sampel madu manis impor (I). Bakteri uji yang digunakan berasal dari koleksi laboratorium mikrobiologi BBPOM di Bandung yang terdiri dari 3 bakteri Gram negatif (*Salmonella typhimurium* ATCC 12028, *Escherichia coli* ATCC 9001, dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) serta 5 bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25953, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778, dan *Listeria monocytogenes* ATCC 7644). Bahan baku pembanding antibiotik yang digunakan adalah kloramfenikol (BPFI), oksitetrasiklin (BPFI) dan gentamisin (BPFI) serta beberapa media untuk pengujian antibakteri diantaranya adalah: *Nutrient agar* (NA) (Merck), *Brain heart Infusion Broth* (BHIB) (Oxoid), *Mueller Hinton Broth* (MHB) (Oxoid), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Oxoid), antibiotik medium 1 (Oxoid), antibiotik medium 2 (Merck), *Plate Count Agar* (Merck), larutan NaCl

fisiologis, larutan standard 0,5 McFarland (bioMerieux) dan aqua destilasi steril.

Alat

Otoklaf (Hirayama), inkubator (Mettmert), oven (Binder), *laminar air flow* (Esco), *antibiotic zone reader* (Trinity), pH meter (Mettler Toledo), timbangan (Mettler Toledo), pengukur konduktivitas (Orion 3 Star), *hotplate* (Cimarec), *vortex* (Falc), cawan petri, gelas ukur, tabung reaksi, erlenmeyer, pipet ukur, mikro pipet, bunsen, Ose dan perforator.

Analisis Sifat Fisikokimia Madu

pH

Pengukuran pH madu dilakukan dengan menggunakan alat pH meter Mettler Toledo. Alat dikalibrasi dengan menggunakan larutan standar pH 4,00 dan 7,00.

Keasaman

Sampel madu ditimbang sebanyak 10,0 g kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan dilarutkan dengan 75 mL air suling. Ditambahkan indikator PP 4-5 tetes. Sampel dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai titik akhir yang tetap selama 10 detik. Jumlah volume NaOH dicatat. Keasaman dalam madu dihitung sebagai berikut (SNI 01-3545-2004):

$$\text{Keasaman (mL N NaOH/kg)} = (a \times b)/c \times 1000$$

- a = volume NaOH 0,1 N yang digunakan dalam titrasi, mL
- b = normalitas NaOH 0,1 N
- c = bobot contoh, gram

Kadar air

Pembacaan nilai indeks bias sampel pada suhu 20°C dilakukan dengan menggunakan refraktrometer. Kandungan air dalam sampel madu diperoleh dengan membandingkan nilai indeks bias dan kadar air pada tabel (SNI 01-3545-2004).

Konduktivitas elektrik

Konduktivitas elektrik diukur menggunakan konduktivitas meter Orion 3 Star (Thermo Scientific). Larutan 20% b/v madu diukur konduktivitasnya, hasil dinyatakan dalam milliSiemens per sentimeter (mS/cm) (International Honey Commission 2002).

Uji Aktivitas Antibakteri

Identifikasi Bakteri Uji

Masing-masing bakteri yang terdapat dalam *beads* dibiakan dalam media BHIB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Biakan bakteri kemudian diinokulasi menggunakan Ose steril ke media selektif yang sesuai dan diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni spesifik yang tumbuh disubkultur pada media *nutrient agar* dan diinkubasi

selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian dilakukan identifikasi bakteri menggunakan kit API System (*Analytical Profile Index*). Setelah masa inkubasi, kit API dibaca dan data yang diperoleh diolah dengan menggunakan *software* API.

Penyiapan Inokulum

Biakan bakteri dalam media *nutrient agar* diinokulasikan menggunakan Ose steril kedalam media BHIB. Diinkubasikan selama 2-5 jam pada suhu 37°C sampai tampak pertumbuhan bakteri. Kemudian dibuat suspensi bakteri dalam larutan NaCl fisiologis steril sampai kekeruhan sama dengan standard 0,5 McFarland yang setara dengan konsentrasi bakteri $1,5 \times 10^8$ kol/mL (McFarland Standard bioMerieux). Untuk memastikan jumlah bakteri yang digunakan dalam pembuatan inokulum dilakukan perhitungan bakteri menggunakan media *Plate Count Agar* (PCA) dengan cara tuang.

Penetapan Diameter Hambat Terhadap Sampel Madu

Metode yang digunakan adalah metode difusi agar dengan menggunakan media *Mueller Hinton Agar*. Media *Mueller Hinton Agar* dituang kedalam cawan Petri sebanyak 25 mL. Tiap cawan diinokulasi dengan 100 μ L inokulum bakteri yang kekeruhannya setara dengan standar 0,5 McFarland. Setelah agar mengeras dibuat 3-6 sumur menggunakan perforator steril diameter 6,0 mm. Pada tiap sumur dimasukkan madu dengan berbagai konsentrasi sebanyak 100 μ L. Setelah itu cawan Petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, akan muncul zona penghambatan. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur.

Penetapan Kadar Hambat Minimum (KHM)

Metode yang digunakan adalah metode dilusi cair (*Broth Dilution Method*) dengan menggunakan media *Mueller Hinton Broth* (CLSI 2006). Konsentrasi madu yang digunakan adalah 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% b/v dan madu tanpa pengenceran. Ke dalam setiap tabung diisi masing-masing 1 mL larutan madu dan 100 μ L inokulum bakteri dengan konsentrasi setara dengan standard 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ koloni/mL). Disediakan 1 tabung berisi media dan inokulum bakteri yang digunakan sebagai kontrol positif, dan 1 tabung berisi media yang digunakan sebagai kontrol negatif. Selanjutnya seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri dengan cara membandingkan-nya terhadap kontrol positif. Kadar hambat minimum diperoleh dengan mengamati tabung yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi terendah.

Penetapan Kadar Bakterisid Minimum (KBM)

Penetapan kadar bakterisid minimum madu dilakukan sama seperti pada penetapan konsentrasi hambat minimum madu. Tabung-tabung yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri selanjutnya dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 1 mL ke dalam cawan Petri. Selanjutnya dituang media *Plate Count Agar* (PCA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kadar bakterisid minimum ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media PCA dengan konsentrasi terendah.

Pengujian Potensi Madu Pahit dibandingkan terhadap Antibiotik Kloramfenikol, Oksitetrasiklin dan Gentamisin

Sampel madu pahit yang memiliki aktivitas antimikroba paling baik selanjutnya diuji banding dengan menggunakan antibiotik kloramfenikol, oksitetrasiklin dan gentamisin. Pengujian potensi dilakukan mengacu pada Suplemen I Farmakope Indonesia IV.

Hasil dan Pembahasan

Analisis Sifat Fisikokimia Madu

Kualitas madu ditentukan oleh dua faktor utama yaitu komposisi nektar asal madu dan faktor eksternal seperti waktu pemanenan madu, proses pengolahan dan penyimpanan (Sihombing 1997). Analisis terhadap beberapa sifat fisikokimia madu pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kualitas madu yang digunakan dan untuk mendukung penjelasan hasil aktivitas antibakteri madu terhadap bakteri uji. Hasil analisis fisikokimia madu yang meliputi pH, keasaman, kadar air dan konduktivitas dapat dilihat pada Tabel 1. Menurut Molan (1992a), madu dikarakterisasi berdasarkan sifat keasamannya dan nilai pH yang rendah pada madu (3,2-4,5) dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini diperoleh nilai pH madu yang berkisar antara 3,55-4,29 dan nilai keasaman yang berkisar antara 13,66-45,39 meq/kg. Nilai keasaman tersebut sesuai dengan yang dipersyaratkan oleh SNI yaitu kurang dari 50 meq/kg.

Keasaman memiliki pengaruh yang besar terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup bagi sel bakteri. Setiap spesies memiliki tingkat keasaman optimum untuk pertumbuhannya. Ketika pH turun sampai batas terendah untuk pertumbuhan bakteri, tidak hanya sel bakteri yang akan terhenti pertumbuhannya tetapi bakteri juga akan kehilangan kemampuan hidupnya (Ray 2001).

Tabel 1. Karakteristik Fisikokimia Madu

Nama Madu	pH ^a	Keasaman ^b	Kadar air ^b	Konduktivitas ^c
Madu A	3,55	14,28	24,8	0,21
Madu B	3,61	13,66	24,5	0,22
Madu C	4,00	22,24	24,3	0,24
Madu D	4,00	26,28	23,6	0,64
Madu E	3,72	34,32	20,3	1,13
Madu F	3,97	31,81	20,2	0,91
Madu G	4,18	37,58	20,6	1,14
Madu H	4,29	45,39	22,3	1,27
Madu I	4,11	25,55	18,7	0,54

Syarat 3,5 – 4,5 Maks 50 meq/kg Maks 22 %b/b 0,22-1,52 mS/cm

Keterangan: ^aBogdanov, Honey Composition, Book of Honey, 2011. ^bSNI 01-3545-2004.

^cInternational Honey Commission, 2000.

Kadar air pada penelitian ini berkisar antara 18,7% - 24,8% dengan syarat $\leq 22\%$ (SNI 2004). Madu A, B, C, D dan H memiliki nilai lebih tinggi dari yang dipersyaratkan, karena diduga madu tersebut merupakan madu yang asli yang berasal dari hutan. Kebanyakan kondisi madu hutan yang dihasilkan di Indonesia mempunyai kadar air yang tinggi karena Indonesia berada di daerah tropis yang lembab dan basah serta curah hujan yang cukup tinggi.

Konduktivitas elektrik berhubungan dengan kadar asam dan kadar abu yang mencerminkan keberadaan ion dan asam organik pada madu. Semakin tinggi kadar asam dan kadar abu maka konduktivitas elektrik pun akan semakin tinggi. Nilai konduktivitas elektrik madu pada penelitian ini bervariasi dari 0,21-1,27 mS/cm sedangkan berdasarkan IHC (2000) berada dalam rentang 0,22-1,52 mS/cm.

Madu A dan B memiliki nilai konduktivitas yang lebih rendah daripada madu yang lainnya yaitu sebesar 0,21 dan 0,22 mS/cm, hal ini dapat terjadi karena madu A dan B memiliki kadar keasaman yang rendah yaitu sebesar 14,28 dan 13,66 meq/kg. Demikian pula sebaliknya dengan madu H yang memiliki konduktivitas elektrik paling besar yaitu sebesar 1,27 mS/cm, memiliki kadar keasaman sebesar 45,39 meq/kg.

Aktivitas Antibakteri

Daya antibakteri madu dapat dilihat dari luasnya zona bening di sekitar sumur yang telah ditetesi larutan madu. Zona bening tersebut menunjukkan adanya penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji. Derajat hambatan pada setiap bakteri akan berbeda satu sama lain tergantung pada jenis madu dan bakteri yang digunakan. Diameter zona hambat yang terbentuk dari aktivitas antibakteri madu tanpa pengenceran dan glukosa 80% terhadap bakteri uji dapat dilihat pada Tabel 2.

Setiap jenis madu memiliki sifat fisikokimia yang berbeda. Sifat fisikokimia madu seperti pH, keasaman, kadar air, konduktivitas elektrik, viskositas, jenis dan jumlah komponen yang ada pada tiap madu berpengaruh terhadap derajat hambatan. Faktor lain yang berperan dalam perbedaan aktivitas antibakteri madu adalah jenis, jumlah, umur, dan keadaan bakteri uji.

Berdasarkan data pada Tabel 2, dibuat grafik perbandingan antara diameter hambat yang dihasilkan oleh seluruh sampel madu terhadap masing-masing bakteri uji seperti terlihat pada Gambar 1.

Dari grafik pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa madu H memiliki daya antibakteri yang paling besar terhadap bakteri *Salmonella typhimurium* yaitu sebesar 46,1 mm. Madu H merupakan madu manis lokal yang diperoleh langsung dari sarang lebah. Madu I yang merupakan madu manis impor, memiliki hambatan terbesar kedua terhadap *Salmonella typhimurium* yaitu sebesar 40,1 mm. Hambatan selanjutnya yaitu madu pahit C, D, B, A, E dan G (Tabel 2). Semua madu memberikan hambatan yang cukup besar terhadap bakteri *Salmonella typhimurium* dan *Escherichia coli*. Untuk bakteri *Pseudomonas aeruginosa* hambatan hanya dapat diamati dengan jelas pada madu C (24,3 mm), D (22,5 mm) dan I (26,3 mm). *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri yang termasuk ke dalam golongan bakteri Gram negatif. Pada penelitian ini, zona hambat madu terhadap bakteri uji Gram positif lebih kecil dibandingkan terhadap bakteri uji Gram negatif. Bakteri *S. aureus* dapat dihambat oleh semua jenis madu yang diteliti. *E. faecalis*, *B. cereus*, dan *L. Monocytogenes* dihambat oleh madu C, D, E, F, G, H dan I sedangkan *S. epidermidis* dihambat oleh madu C, D, E, F, H dan I dengan data diameter hambat dapat dilihat pada Tabel 2.

Secara keseluruhan zona hambat madu terhadap bakteri Gram negatif lebih besar dibandingkan terhadap bakteri Gram positif. Perbedaan struktur dinding sel antara bakteri Gram positif dan Gram negatif diyakini sebagai penyebab terjadinya perbedaan respon terhadap berbagai perlakuan dan bahan (Pelczar dan Chan 1988). Penelitian lain yang juga menunjukkan bahwa bakteri Gram negatif lebih sensitif dibandingkan Gram positif diantaranya adalah penelitian Hafidiani (2001), Malika *et al.* (2004), Ansari and Alexander (2009), Al-Namma (2009), Chauhan *et al.* (2010), Anyanwu (2011), dan Mohapatra *et al.* (2011).

Penggunaan glukosa dengan konsentrasi 80% sebagai kontrol dalam uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini ternyata hanya mampu menghambat bakteri *Salmonella typhimurium* dan *Escherichia coli*. Molan (1992a) menjelaskan bahwa yang berperan dalam aktivitas antibakteri pada madu adalah tekanan osmotik, keasaman, hidrogen peroksida dan faktor fitokimia (asam siringat, metil siringat, asam 3,4,5-

trimetoksibenzoat, pinocembrin, terpen, benzil alkohol). Keempat faktor tersebut baik bekerja sendiri-sendiri atau bersama-sama akan menghambat atau mengurangi pertumbuhan sebagian besar mikroorganisme.

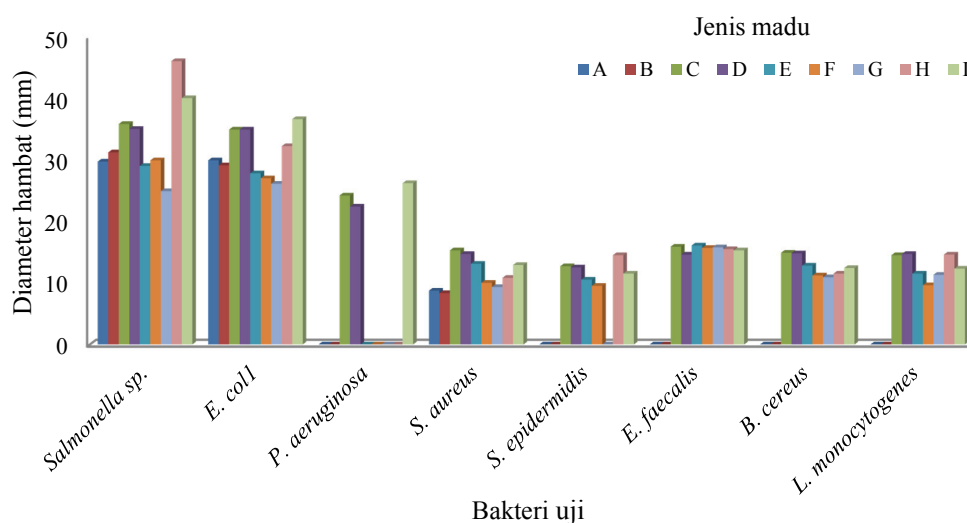
Dengan demikian dapat diduga bahwa selain tekanan osmotik, adanya aktivitas antibakteri pada penelitian ini dapat dipengaruhi oleh keasaman, hidrogen peroksida, dan faktor fitokimia.

Kadar hambat minimum (KHM) madu merupakan konsentrasi minimum yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. KHM diperoleh dengan mengamati tabung subkultur yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi terendah. Hasil kadar hambat minimum madu terhadap bakteri uji dapat dilihat pada Tabel 3. Dari data pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa madu dapat menghambat semua pertumbuhan bakteri uji. Kadar hambat minimum sampel madu terhadap bakteri uji bervariasi dengan rentang antara 30-60% b/v.

Tabel 2. Data Diameter Hambat Madu Terhadap Bakteri Uji

Nama Bakteri	Diameter Hambat Madu (mm) Terhadap Bakteri Uji									Glukosa
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
<i>S. typhimurium</i>	29,8	31,3	35,9	35,1	29,1	30,0	25,0	46,1	40,1	42,3
<i>E. coli</i>	30	29,2	35,0	35,0	27,9	27,1	26,2	32,3	36,7	36,8
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	24,3	22,5	-	-	-	-	26,3	-
<i>S. aureus</i>	8,8	8,4	15,4	14,8	13,2	10,1	9,4	10,9	13,0	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	12,8	12,6	10,6	9,6	-	14,6	11,6	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	16,0	14,7	16,2	15,8	15,9	15,6	15,4	-
<i>B. cereus</i>	-	-	15,0	14,9	12,9	11,3	11,0	11,6	12,5	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	14,6	14,8	11,6	9,7	11,4	14,7	12,4	-

Keterangan: (-) Tidak ada zona hambat. A, B, C, D, E, F, G, H dan I: Contoh madu yang diuji.



Gambar 1. Grafik perbandingan diameter hambat antibakteri madu terhadap bakteri uji.

Hasil kadar bakterisid minimum madu terhadap bakteri uji dapat dilihat pada Tabel 4. Dari data pada Tabel 4 dapat dilihat bahwa seluruh jenis madu pahit yang diteliti dapat membunuh semua bakteri uji, baik bakteri Gram negatif maupun bakteri Gram positif. Pada penelitian ini madu yang tidak memberikan hambatan pada uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi agar ternyata mampu menghambat dan membunuh bakteri uji pada metode dilusi cair hal ini sesuai dengan penelitian Tan (2009) yang menyatakan bahwa metode dilusi cair memberikan hasil yang lebih kuantitatif dan tepat dibandingkan dengan metode difusi agar karena tingkat difusi zat aktif dalam agar lebih lambat dibandingkan dalam media cair. Menurut Molan (1992b), aktivitas bakterisid sangat bergantung pada lamanya sel bakteri terpapar oleh madu, kerentanan bakteri yang digunakan dan perbedaan pada komposisi madu. Banyak zat yang awalnya bersifat bakteriostatik menjadi bakterisid pada konsentrasi

tinggi. Penelitian yang dilakukan oleh Mishref, et al. (1989) juga menyatakan bahwa efek bakterisid bergantung pada jenis bakteri dan konsentrasi madu yang digunakan.

Dari hasil aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji, diketahui bahwa madu pahit C dan D memiliki aktivitas lebih baik dibandingkan madu pahit lainnya. Oleh karena itu dilakukan uji potensi madu pahit C dan D dibandingkan terhadap antibiotik kloramfenikol, oksitetrasiklin dan gentamisin. Uji potensi madu dengan pembanding kloramfenikol dilakukan dengan menggunakan bakteri uji *Salmonella typhimurium* dengan dosis tengah (S3) kloramfenikol sebesar 64 µg/mL dan konsentrasi madu 40%. Data perbandingan aktivitas antibakteri kloramfenikol, madu pahit C, dan madu pahit D terhadap *Salmonella typhimurium* dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 3. Hasil Kadar Hambat Minimum Madu terhadap Bakteri Uji

Bakteri	Kadar Hambat Minimum Madu terhadap Bakteri Uji (%b/v)								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Salmonella typhimurium</i>	30	30	30	30	40	40	30	30	30
<i>Escherichia coli</i>	40	40	30	30	40	50	50	30	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	40	30	30	40	30	40	30	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	50	40	50	50	50	50	50	40
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	50	60	50	50	50	50	60	40	50
<i>Enterococcus faecalis</i>	60	60	40	50	50	50	60	40	40
<i>Bacillus cereus</i>	60	60	40	40	60	60	60	50	40
<i>Listeria monocytogenes</i>	60	50	40	40	40	50	50	40	40

Tabel 4. Hasil Kadar Bakterisid Minimum Madu terhadap Bakteri Uji

Bakteri	Kadar Bakterisid Minimum Madu terhadap Bakteri uji (% b/v)								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Salmonella typhimurium</i>	40	40	30	30	50	50	50	30	30
<i>Escherichia coli</i>	50	50	40	40	50	60	60	40	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60	60	40	40	60	60	60	40	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	60	60	60	60	70	70	70	60	60
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	70	70	60	60	70	70	80	60	60
<i>Enterococcus faecalis</i>	80	80	60	60	70	70	70	50	50
<i>Bacillus cereus</i>	80	80	60	60	80	80	80	70	60
<i>Listeria monocytogenes</i>	80	70	50	60	60	60	70	60	50

Tabel 5. Data Diameter Hambat Kloramfenikol, Madu Pahit C dan D terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhimurium*

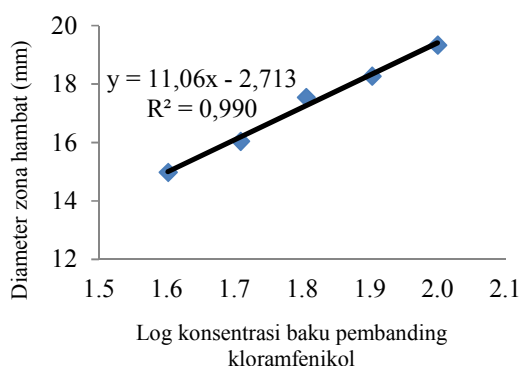
Rata-rata garis tengah daerah hambat baku pembanding kloramfenikol (mm)							
S1	S3	S2	S3	S4	S3	S5	S3
14,93±0,13	17,6±0,15	15,94±0,39	17,66±0,09	18,36±0,11	17,48±0,08	19,42±0,15	17,47±0,22
Rata-rata garis tengah daerah hambat pertumbuhan contoh madu (mm)							
Madu C		S3		Madu D		S3	
18,96±0,37		17,45±0,14		18,14±0,19		17,48±0,22	

Keterangan:

S1 – S5: Dosis Larutan Baku

Tabel 6. Perhitungan Kurva Baku Kloramfenikol terhadap *Salmonella typhimurium*

Konsentrasi Larutan Baku (µg/mL)	Log Konsentrasi	Diameter hambatan = Y	X ²	Y ²	XY
Dosis S1 (40)	1,6021	(a) 14,98	2,5666	224,50	24,004
Dosis S2 (51,2)	1,7093	(b) 16,05	2,9216	257,60	27,434
Dosis S3 (64)	1,8062	(c) 17,55	3,2623	308,00	31,698
Dosis S4 (80)	1,9031	(d) 18,28	3,6218	334,28	34,795
Dosis S5 (100)	2,0000	(e) 19,34	4,0000	373,99	38,678
Jumlah	9,0206	86,21	16,372	1498,38	156,61

**Gambar 2.** Kurva baku kloramfenikol terhadap bakteri *Salmonella typhimurium*.

Untuk mendapatkan nilai uji banding, maka diambil data log konsentrasi S3 baku pembanding kloramfenikol ($x = 1,8062$) dan disubstitusikan ke

dalam persamaan $y = 11,06x - 2,713$. Dari persamaan tersebut diperoleh nilai $y = 17,264$. Nilai y tersebut digunakan untuk menghitung dosis sampel madu dengan rumus $Y_u = \{y + (U - S_3u)\}$.

U adalah rata-rata diameter zonaambat sampel uji (madu) dan S3U adalah rata-rata diameter zonaambat dosis tengah uji baku pembanding (kloramfenikol). Dari persamaan tersebut diperoleh nilai Y_u untuk madu C sebesar 18,77 dan madu D sebesar 17,92. Nilai Y_u disubstitusikan kembali pada persamaan $y = 11,06x - 2,713$, sehingga diperoleh nilai X_u madu C sebesar 1,942 (antilog = 87,49) dan madu D sebesar 1,866 (antilog = 73,45). Potensi sampel uji dihitung dengan membandingkan nilai antilog dosis (antilog X_u) terhadap dosis tengah (S3) baku pembanding. Dari perhitungan tersebut diperoleh nilai potensi madu C terhadap kloramfenikol (dosis 64 µg/mL) sebesar 136,7% dan madu D 114,9%.

Tabel 7. Data Diameter Hambat Oksitetrasiklin, Madu Pahit C dan D terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

Rata-rata garis tengah daerah hambatan pertumbuhan baku pembanding Oksitetrasiklin (mm)							
S1	S3	S2	S3	S4	S3	S5	S3
17,52±0,25	19,22±0,32	18,54±0,31	19,29±0,28	20,48±0,28	19,28±0,36	20,92±0,83	19,21±0,28
Rata-rata garis tengah daerah hambatan pertumbuhan contoh madu (mm)							
Madu C	S3	Madu D	S3				
15,40±0,31	19,27±0,30	14,74±0,27	19,22±0,25				

Keterangan:

S1 – S5: Dosis Larutan Baku

Tabel 8. Data Diameter Hambat Gentamisin, Madu Pahit C dan D terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis*

Rata-rata garis tengah daerah hambatan pertumbuhan baku pembanding Gentamisin (mm)							
S1	S3	S2	S3	S4	S3	S5	S3
19,58±0,20	21,44±0,29	20,41±0,31	21,40±0,15	22,24±0,37	21,28±0,24	23,40±0,24	21,46±0,32
Rata-rata garis tengah daerah hambatan pertumbuhan contoh madu (mm)							
Madu C	S3	Madu D	S3				
12,77±0,24	21,30±0,25	12,64±0,26	21,21±0,33				

Keterangan:

S1 – S5: Dosis Larutan Baku

Dari perhitungan tersebut dapat diperoleh nilai ekivalensi madu C dan D terhadap kloramfenikol yaitu untuk 100 µL madu C konsentrasi 40% ekivalen dengan 87,488 µg kloramfenikol sedangkan untuk 100 µL madu D konsentrasi 40% ekivalen dengan 73,536 µg kloramfenikol. Dengan demikian 1 mL madu C konsentrasi 100% ekivalen dengan 2187,2 µg (2,1872 mg) kloramfenikol dan 1 mL madu D konsentrasi 100% ekivalen dengan 1838,4 µg (1,8384 mg) kloramfenikol.

Uji potensi terhadap oksitetrasiklin dilakukan dengan menggunakan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dengan dosis tengah (S3) oksitetrasiklin sebesar 10 µg/mL dan menggunakan madu tanpa pengenceran.

Data perbandingan aktivitas antibakteri oksitetrasiklin, madu pahit C, dan madu pahit D terhadap *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Tabel 7. Dari data tersebut dibuat kurva baku antara log konsentrasi dengan diameter zona hambat dan diperoleh persamaan $y = 8,977x + 10,36$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,979. Dengan perhitungan yang sama seperti perhitungan pada uji potensi madu C dan D terhadap antibiotik kloramfenikol maka diperoleh hasil potensi madu C terhadap oksitetrasiklin sebesar 0,3709 (37,09%) dan madu D sebesar 0,3171 (31,71%). Nilai ekivalensi madu C dan D terhadap oksitetrasiklin yaitu untuk 1 mL madu C ekivalen dengan 37,09 µg (0,0371 mg) oksitetrasiklin dan 1 mL madu D ekivalen dengan 31,71 µg (0,0317 mg) oksitetrasiklin. Uji potensi terhadap gentamisin dilakukan dengan menggunakan bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* dengan dosis tengah (S3) sebesar 10 µg/mL dan menggunakan madu tanpa pengenceran. Data perbandingan aktivitas antibakteri gentamisin, madu pahit C dan D terhadap *Staphylococcus epidermidis* dapat dilihat pada Tabel 8. Dari data tersebut dibuat kurva baku antara log konsentrasi dengan diameter zona hambat, diperoleh persamaan $y = 9,676x + 11,72$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,989. Dengan perhitungan yang sama, diperoleh hasil potensi madu C terhadap gentamisin sebesar 0,1313 (13,13%) dan madu D sebesar 0,1302 (13,02%). Nilai ekivalensi madu C dan D terhadap gentamisin yaitu untuk 1 mL madu C ekivalen dengan 13,127 µg (0,0131 mg) gentamisin dan 1 mL madu D ekivalen dengan 13,023 µg (0,0130 mg) gentamisin.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa madu pahit memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji Gram negatif dan Gram positif yaitu: *Salmonella typhimurium* ATCC 12028, *Escherichia coli* ATCC 9001, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25953, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778, dan *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Kadar hambat minimum untuk bakteri uji Gram negatif berada dalam rentang konsentrasi madu 30-50% b/v sedangkan untuk bakteri uji Gram positif berada dalam rentang 40-60% b/v. Kadar bakterisid minimum untuk bakteri uji Gram negatif berada dalam rentang konsentrasi madu 30-60% b/v sedangkan untuk bakteri uji Gram positif berada dalam rentang 60-80% b/v. Hasil uji banding terhadap antibiotika menunjukkan nilai kesetaraan sebagai berikut: 1 mL madu C setara dengan 2,187 mg kloramfenikol, 0,037 mg oksitetrasiklin dan 0,013 mg gentamisin sedangkan untuk 1 mL madu D setara dengan 1,838 mg kloramfenikol, 0,032 mg oksitetrasiklin dan 0,013 mg gentamisin.

Daftar Pustaka

- Al-Namma RT, 2009, Evaluation of in vitro inhibitory Effect of Honey on some Microbial Isolate, J. Bacteriol. Res. 1(6): 64-67.
- Ansari AA, Alexander C, 2009, Effect of Natural Honey (Produced by African sculata in Guyana) Against Bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and Fungus (*Candida albicans*), World Journal of Dairy & Food Sciences 4(1): 73-77.
- Anyanwu CU, 2011, Assessment of the *In Vitro* Antibacterial Activity of Honey on some Common Human Pathogens, Journal of Research in Biology 2: 116-121.
- Aziz A, 2011, Terapi Madu: Hidup Sehat ala Rasul, Jazalitera, 79-93.
- Bogdanov S, 2011, The Honey Book: Honey Composition, Bee Product Science, www.bee-hexagon.net
- Chauhan A, Pandey V, Chacko KM, Khandal RK, 2010, Antibacterial Activity of Raw and Processed Honey, Electronic Journal of Biology 5(3): 58-66.
- Hammad S, 2009, 99 Resep Sehat Dengan Madu, Aqwamedika, 61-65.
- Hafidiani R, 2001, Aktivitas antibakteri Madu Monoflora dan Multiflora, Skripsi, Institut Pertanian Bogor.

International Honey Commission, 2002, Harmonised Methods Of The International Honey Commission, Swiss Bee Research Center, Switzerland.

Malika N, Mohamed F, Chakib EA, 2004, Antimicrobial Activities of Natural Honey from Aromatic and Medicinal Plants on Antibio-resistant Strains of Bacteria, *Int. J. Agric. Biol.* 6(2): 289-293, doi: 1560-8530/2004/06-2-289-293.

Mishref A, Magda SA, Ghazi IM, 1989, The Effect of Feeding Medicinal Plant Extract to Honeybee Colonies on The antimicrobial Activity on The Honey Produced. International Bee Research Association, London, UK. Pp 80-86.

Mohapatra D, Thakur V, Brar S, 2011, Antibacterial Efficacy of Raw And Processed Honey, *Biotechnol. Res. Int.* doi: 10.4061/2011/917505.

Molan PC, 1992a, The Antibacterial Activity of Honey: 1. The Nature of The Antibacterial Activity, *Bee World* 73: 5-28.

Molan PC, 1992b, The Antibacterial Activity of Honey: 2. Variation in The Potency Of The Antibacterial Activity, *Bee World* 73: 59-76.

Pelczar MJ, Chan ECS, 1988, Dasar-dasar Mikrobiologi 1 dan 2, Alih Bahasa: Hadioetomo, R. S., Imas, T., Tjitrosomo, S. S., Angka, S. L., UI Press, Cetakan 2006, Jakarta.

Ray B, 2001, Fundamental Food Microbiology, 2nd edition, Boca Raton, Fla: CRC Press.

Sihombing D, 1997, Ilmu Ternak Lebah Madu, Gadjah Mada Universitas Press.

Tan HT, Rahman RA, Gan SH, Halim AS, Hassan SA, Sulaiman SA, Kinrpal-Kaus BS, 2009, The Antibacterial Properties of Malaysian Tualang Honey Against Wound and Enteric Microorganism in Comparison to Manuka Honey, *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9:34, doi:10.1186/1472-6882-9-34.