

AKTIVITAS ANTIBAKTERI MADU HITAM PAHIT DAN MADU HITAM MANIS TERHADAP *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Sri Peni Fitrianingsih¹, Annisa Khairat¹, Ratu Choesrina¹
email: sri_peni@yahoo.com
¹Universitas Islam Bandung

ABSTRAK

Telah dilakukan pengujian aktivitas antibakteri madu hitam pahit dan madu hitam manis terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas antibakteri, menentukan konsentrasi hambat minimum, dan menentukan sifat kerja dari madu hitam pahit dan madu hitam manis yang didapat dari Kalimantan. Pengujian aktivitas antibakteri dan penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan cakram kertas. Pengujian sifat kerja antibakteri dilakukan dengan metoda turbidimetri. Hasil pengujian menunjukkan bahwa madu hitam pahit dan madu hitam manis mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. Kemampuan daya hambat kedua jenis madu terhadap bakteri uji semakin besar dengan meningkatnya konsentrasi. Nilai KHM dari madu hitam pahit terdapat pada konsentrasi antara 3,4%–3,8%. Dan nilai KHM dari madu hitam manis terdapat pada konsentrasi antara 4,4%–4,8%. Aktivitas madu hitam pahit dan madu hitam manis pada konsentrasi 6,25% terhadap bakteri *S.aureus* yaitu bersifat bakteristatik. Dilihat dari hasil pengujian aktivitas antibakteri, KHM dan turbidimetri, terlihat bahwa madu hitam pahit memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar dibandingkan madu hitam manis.

Kata kunci: aktivitas antibakteri, madu hitam pahit, madu hitam manis, KHM

ABSTRACT

Antibacterial activity of bitter-black honey and sweet-black honey against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was investigated. The purpose of this study was to measure the antibacterial activity, Minimum Inhibition Concentration (MIC), and the action of bitter-black honey and sweet-black honey that collected from Borneo. Disc diffusion method was used to measure the antibacterial activity and MIC of honeys. Turbidimetric assay was used to measure the antibacterial action of honeys. Results showed that bitter-black honey and sweet-black honey possess antibacterial activity against *E.coli* and *S.aureus*. MIC value of bitter-black honey was 3,4%-3,8%. And MIC value of sweet-black honey was 4,4%-4,8%. Antibacterial action of two types of honey at concentration 6,25% against *S.aureus* was bacteriostatic. Bitter-black honey had higher antibacterial activity than sweet-black honey.

Keywords: antibacterial activity, bitter-black honey, sweet-black honey, MIC

PENDAHULUAN

Madu adalah cairan kental yang dihasilkan oleh lebah madu dari nektar bunga. Lebah mengisap berbagai macam sari bunga dan buah, lalu dikumpulkan dalam tubuhnya, kemudian dibawa ke sarangnya dan dibentuk menjadi madu. Madu merupakan makanan cair yang manis, sehat dan dapat dimanfaatkan juga sebagai obat (Tirtawinata, 2006).

Madu terbagi menjadi beberapa jenis berdasarkan sari bunga yang diambil lebah penghasilnya, diantaranya adalah madu bunga kapuk randu, madu bunga klengkeng, madu bunga rambutan, madu multi floral, madu hutan, madu bunga mahoni dan lainnya (Yunianto, 2010).

Madu hitam pahit dan madu hitam manis sebagian besar dihasilkan oleh jenis lebah hutan *Apis dorsata* yang hingga saat ini belum dapat dibudidayakan dengan baik. Spesies ini dapat ditemukan di desa yang berbatasan langsung dengan kawasan hutan seperti Muara Teweh Kalimantan dan Sumbawa (Julmansah, 2012).

Kalimantan terkenal dengan madu hitam pahit dan madu hitam manis. Makanan lebah yang alami membuat madu hitam pahit dan madu hitam manis berbeda dengan madu daerah lain. Makanan yang dihisap oleh lebah penghasil madu hitam pahit berasal dari berbagai jenis tanaman, salah satunya adalah baluntas (*Pluchea indica*). Dan makanan yang dihisap oleh lebah penghasil madu hitam manis tergantung dari musimnya salah satunya adalah bunga rambutan.

Madu merupakan salah satu bahan pengobatan luka dari zaman dahulu yang kembali diperkenalkan pada pengobatan modern di Australia dan Eropa yang diikuti dengan pengembangan regulasi produk-produk perawatan luka. Khasiat terapeutiknya dihubungkan dengan aktivitas antimikroba dan kemampuannya untuk menstimulasi penyembuhan luka dengan cepat (Cooper, 2007).

Berdasarkan penelitian Tumin *et al.* (2005), disebutkan bahwa beberapa madu lokal Malaysia yang bervariasi parameter fisikokimianya mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi*, *S. aureus*, *S. sonnie* dan *E. coli* (Tumin *et al.*, 2005).

Madu dan propolis mempunyai aktivitas bakterisid terhadap strain *S. aureus* yang diisolasi dari kulit anjing yang terinfeksi (Rindt *et al.*, 2007). Lebih lanjut, dilaporkan bahwa sifat fisikokimia yang berhubungan dengan distribusi geografi dan perbedaan sumber makanan (nektar bunga) memainkan peranan penting pada aktivitas antimikroba dari madu (Taormina *et al.*, 2001).

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan antara lain madu hitam pahit dan madu hitam manis yang berasal dari Muara Teweh Kalimantan Tengah, akuabidest steril, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), tetrasiklin. Alat yang digunakan antara lain cawan petri, tabung reaksi, autoklaf, inkubator, jangka sorong, Spektrofotometer, mikropipet, labu ukur.

Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dan diidentifikasi di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antibakteri madu hitam pahit dan madu hitam manis terhadap bakteri *E.coli* dan *S. Aureus* secara *in vitro*.

Metode pengujian aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi agar dengan menggunakan cakram kertas yang telah direndam dalam larutan madu dengan konsentrasi tertentu. Tahap penelitian dimulai dengan preparasi sampel, pengujian karakteristik madu hitam pahit dan madu hitam manis, pengujian aktivitas antibakteri dan penentuan konsentrasi hambat minimum, serta pengujian sifat kerja madu hitam pahit dan madu

hitam manis secara *in vitro*. Pengujian dilakukan secara triplo pada berbagai konsentrasi madu.

Pada pengujian aktivitas antibakteri dari kedua jenis madu, masing-masing suspensi bakteri dan media NA cair dimasukkan ke dalam cawan petri, lalu dihomogenkan. Setelah media NA memadat, dimasukkan cakram kertas yang telah direndam ke dalam berbagai konsentrasi madu. Tiap pengerjaan dilakukan masing-masing tiga kali pengulangan. Cawan diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C untuk kemudian diukur diameter hambatannya.

Penetapan KHM dilakukan untuk mengetahui kadar terendah sampel uji yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pengujian KHM dilakukan dengan cara yang sama dengan pengujian aktivitas antibakteri, tetapi dengan konsentrasi yang lebih kecil dari konsentrasi terendah dari hasil pengujian sebelumnya yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Pengujian sifat kerja antibakteri dilakukan dengan metoda turbidimetri. Sejumlah volume NB dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi kemudian ditambahkan suspensi bakteri. Seluruh tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah 1 jam, larutan uji pada tabung 1 diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm. Pada tabung reaksi lainnya, ditambahkan sejumlah volume sediaan uji dan pembanding dengan konsentrasi tertentu, lalu diinkubasi. Nilai absorbansi dari tiap media uji diukur setiap selang waktu tertentu sampai inkubasi jam ke-48.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah madu hitam pahit dan madu hitam manis yang berasal dari Muara Teweh Kalimantan Tengah. Dilakukan karakterisasi fisikokimia dari kedua jenis madu ini di laboratorium Teknologi Pangan, Fakultas Teknik, Universitas Pasundan. Parameter yang diuji meliputi organoleptik (bentuk, bau, rasa, warna), aktifitas enzim diastase, hidrokisi metilfurfural, kadar air, gula pereduksi (sbg glukosa), sukrosa dan keasaman.

Hasilnya masing-masing dibandingkan dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) 3545:2013 tentang madu. Hasil pemeriksaan fisikokimia madu hitam pahit dan madu hitam manis dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil pemeriksaan fisikokimia madu hitam pahit dan madu hitam manis sesuai dengan persyaratan mutu madu berdasarkan SNI.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan fisikokimia madu hitam pahit dan madu hitam manis.

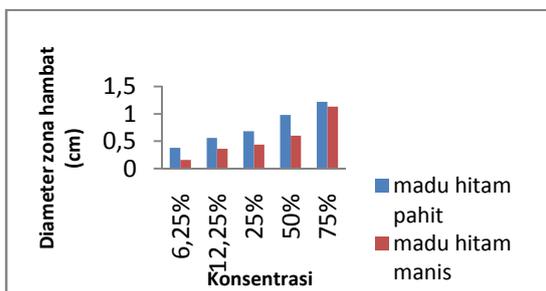
No.	Kriteria uji	Satuan	Madu hitam pahit	Madu hitam manis	SNI
1.	Keadaan		Cairan	Cairan	Cairan
	Bentuk	-	kental	kental	kental
	Bau	-	Normal	Normal	Normal
	Rasa	-	Pahit	Manis	Normal
	Warna	-	Hitam	Black	Normal
2.	pH		4	5	3,2 - 6,1
3.	Aktifitas enzim diastase	DN	10,4	12,2	Min 3
4.	Hidroksi metilfurfural	mg/Kg	32,0	30,4	Max 40
5.	Kadar air	% b/b	16,19	15,40	Max 22
6.	Gula pereduksi (sbg glukosa)	% b/b	77,52	78,21	Min 60
7.	Sukrosa	% b/b	4,02	4,60	Max 10
8.	Keasaman	ml NaOH 1N/Kg	20,42	22,8	Max 40

Pengujian aktivitas antibakteri madu dilakukan terhadap bakteri *E. coli* (Gram negatif) dan *S. aureus* (Gram positif) secara *in vitro* menggunakan metoda difusi agar menggunakan cakram kertas. Terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri uji. Zona hambat dinyatakan dalam cm yang diukur dari diameter zona bening yang terbentuk. Hasil uji aktivitas antibakteri madu hitam pahit dan madu hitam manis dapat dilihat pada Tabel 2.

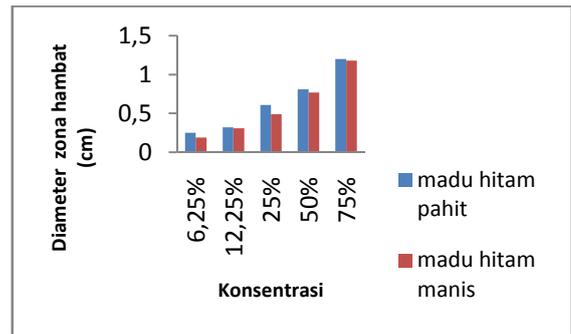
Tabel 2. Diameter zona hambat dari madu hitam pahit dan madu hitam manis

Konsentrasi	Madu hitam pahit		Madu hitam manis	
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
75%	1,22±0,15	1,20±0,015	1,13±0,11	1,18±0,015
50%	0,98±0,10	0,81±0,035	0,60±0,03	0,77±0,045
25%	0,68±0,040	0,61±0,020	0,44±0,12	0,49±0,052
12,25%	0,56±0,026	0,32±0,096	0,36±0,02	0,31±0,035
6,25%	0,38±0,036	0,25±0,041	0,16±0,02	0,19±0,07
kontrol	-	-	-	-

Nilai dinyatakan sebagai rata-rata (cm) ± SD (n=3) Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa madu hitam pahit dan madu hitam manis mempunyai aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. Hal ini dapat dilihat dari diameter hambat yang dihasilkan. Diameter hambat terbesar dari madu hitam pahit terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* terdapat pada konsentrasi 75% berturut-turut sebesar 1,22 cm dan 1,20 cm. Diameter hambat terbesar dari madu hitam manis terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* terdapat pada konsentrasi 75% berturut-turut sebesar 1,13 cm dan 1,18 cm. Sedangkan kelompok kontrol yang menggunakan akuabidest steril, tidak terbentuk zona hambat di sekitar cakram. Diagram aktivitas antibakteri madu hitam pahit dan madu hitam manis terhadap diameter hambat bakteri *E.coli* dan *S.aureus* dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Aktivitas antibakteri madu hitam pahit dan madu hitam manis terhadap *E.coli*



Gambar 2. Aktivitas antibakteri madu hitam pahit dan madu hitam manis terhadap *S.aureus*

Berdasarkan Gambar 1 dan Gambar 2 terlihat bahwa diameter zona hambat madu hitam pahit dan madu hitam manis terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* makin meningkat dengan semakin meningkatnya konsentrasi madu. Diameter zona hambat madu hitam pahit lebih besar dibandingkan madu hitam manis terhadap *E.coli* dan *S.aureus* Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan cakram kertas. Penentuan KHM diambil dari konsentrasi terkecil dari madu yang menunjukkan diameter hambat, yaitu 6,25% kemudian dilakukan pengenceran. Data hasil penentuan KHM dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil konsentrasi hambat minimum madu hitam pahit dan madu hitam manis

Konsentrasi (%)	Madu hitam pahit		Madu hitam manis	
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
6,25	-	-	-	-
5	-	-	-	-
4,8	-	-	-	-
4,6	-	-	-	-*
4,4	-	-	-*	+
4,2	-	-	+	+
4	-	-	+	+
3,8	-	-*	+	+
3,6	-	+	+	+
3,4	-*	+	+	+
3,2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
2	+	+	+	+
1	+	+	+	+

(+) Tumbuh (-) Tidak tumbuh (*)KHM

Konsentrasi hambat minimum madu adalah konsentrasi terendah dari madu yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan tabel 3, nilai konsentrasi hambat minimum dari madu hitam pahit terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* terdapat pada konsentrasi antara 3,4% – 3,8%. Dan nilai konsentrasi hambat minimum dari madu hitam manis terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* terdapat pada konsentrasi antara 4,4% – 4,8%. Dari hasil pengujian terlihat bahwa KHM madu hitam pahit lebih kecil dibandingkan madu hitam manis, yang artinya bahwa madu hitam pahit memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar dibandingkan madu hitam manis.

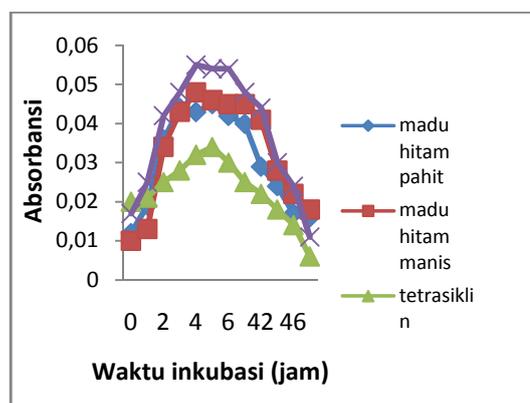
Jenis madu yang berbeda mempunyai sifat fisikokimia yang berbeda pula (Almeida-Muradian *et al.*, 2013). Madu dapat memiliki warna yang berbeda-beda mulai dari kekuning-kuningan sampai kuning gading, dan dari kuning gelap sampai hitam kemerahan. Perbedaan ini berhubungan dengan kandungan mineral, serbuk sari dan senyawa fenolik yang terdapat dalam madu, dan berbeda-beda sesuai dengan geografi asal dan varietas botani yang dihindangi lebah (Ramalhosa *et al.*, 2011).

Aktivitas madu terhadap berbagai mikroorganismenya dapat berbeda-beda. Aktivitas antibakteri madu terhadap luka infeksi terutama tergantung pada sifat osmolaritas dan keasaman madu (Rajeswari *et al.*, 2010; Tumin *et al.*, 2005). Aktivitas antimikroba dari madu berkaitan dengan kandungan hidrogen peroksida dan senyawa fenolik, meskipun hambatan pertumbuhan mikroorganismenya oleh komponen ini atau komponen lainnya sangat bervariasi, tergantung dari sumber nektar bunga. Secara umum, warna madu yang lebih gelap memiliki daya hambat yang lebih tinggi dibandingkan madu yang berwarna terang.

Madu yang lebih gelap juga memiliki potensi antioksidan yang lebih tinggi (Taormina *et al.*, 2001). Warna yang lebih gelap juga merefleksikan kandungan pigmen seperti karotenoid dan flavonoid, yang juga memiliki aktivitas antioksidan. Sifat antimikroba dari madu berkaitan

dengan sifat madu sebagai penyembuh luka yang menjaga kelembaban luka dan viskositas madu yang tinggi membantu memberikan *protective barrier* untuk mencegah infeksi (Mandal, 2011).

Pengujian tipe kerja madu hitam pahit dan madu hitam manis dilakukan dengan cara turbidimetri menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm. Diukur absorbansi media uji yang telah ditambahkan bakteri dan larutan madu setiap selang waktu 1 jam, yang diukur selama 24 jam. Pengujian ini dilakukan pada konsentrasi 6,25% dari madu hitam pahit dan madu hitam manis. Hasil pengukuran absorbansi suspensi bakteri *S. aureus* yang telah ditambahkan madu hitam pahit, madu hitam manis, tetrasiklin dan larutan kontrol dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Grafik hasil pengukuran absorbansi media uji terhadap *S.aureus*

Berdasarkan gambar di atas, hasil pengukuran nilai absorbansi pertumbuhan bakteri pada media uji yang telah ditambahkan madu hitam pahit, madu hitam manis, tetrasiklin dan kontrol (Gambar 3) menunjukkan bahwa pertumbuhan normal bakteri dalam media kontrol mengalami peningkatan sampai jam ke-1 yang disebut fase pertumbuhan diperlambat, kemudian pada jam ke-2 sampai ke-4 disebut fase log (logaritma) atau pembiakan cepat, pada jam ke-5 sampai jam ke-6 atau kurang dari jam ke-24 mengalami fase konstan, dan setelah jam ke-24 sampai jam ke-48 disebut fase penurunan atau kematian bakteri.

Sedangkan pertumbuhan bakteri pada media uji yang ditambahkan madu hitam pahit dan madu hitam manis, menunjukkan grafik pertumbuhan bakteri dengan gambaran yang hampir sama dengan gambaran pertumbuhan bakteri yang dipengaruhi tetrasiklin. Walaupun nilai absorbansinya lebih rendah dibandingkan tetrasiklin. Dari hasil pengukuran nilai absorbansi dengan metoda turbidimetri, menunjukkan bahwa aktivitas madu hitam pahit dan madu hitam manis terhadap bakteri *S.aureus* yaitu bakteriostatik yang artinya madu hitam pahit dan madu hitam manis pada konsentrasi 6,25% berkerja menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus*. Madu hitam pahit dan madu hitam manis memiliki potensi antibakteri yang masih lebih rendah dibandingkan pembanding tetrasiklin. Tetapi diantara dua jenis madu yang diuji, madu hitam pahit memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar dibandingkan madu hitam manis.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa madu hitam pahit dan madu hitam manis mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. Kemampuan daya hambat kedua jenis madu terhadap bakteri uji semakin besar dengan meningkatnya konsentrasi. Nilai KHM dari madu hitam pahit terdapat pada konsentrasi antara 3,4% – 3,8%. Dan nilai KHM dari madu hitam manis terdapat pada konsentrasi antara 4,4% – 4,8%. Aktivitas madu hitam pahit dan madu hitam manis pada konsentrasi 6,25% terhadap bakteri *S.aureus* yaitu bersifat bakteriostatik.

Dilihat dari hasil pengujian aktivitas antibakteri, KHM dan turbidimetri, terlihat bahwa madu hitam pahit memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar dibandingkan madu hitam manis, walaupun potensi antibakterinya masih lebih rendah dibandingkan tetrasiklin.

DAFTAR PUSTAKA

Almeida-Muradian, L.B., Stramm, K.M., Horita, A., Barth, O.M., Freitas, A.S., and Estevinho, L.M. (2013): Comparative study of the physicochemical and palynological

characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*, *International Journal of Food Science and Technology*, **48**, 1698-1706.

Cooper, R. (2007): Honey in wound care: antibacterial properties, *GMS Hygiene and Infection Control*, **2**(2): Doc51 Julmansyah (2012): *Pembangunan Madu Hutan di Kabupaten Sumbawa*, http://www.dephut.go.id/ProdukHukum/kehutanan/workshopHHBK09_maduSumbawa_0.pdf diakses 27 Desember 2013.

Mandal, M.D., and Mandal, S. (2011): Honey: its medicinal property and antibacterial activity, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **1**(2): 154-160.

Rajeswari, T., Venugopal, A., Viswanathan, C., Kishmu, L., Venil, C.K., and Sasi kumar, J.M. (2010): Antibacterial activity of honey against *Staphylococcus aureus* from infected wounds, *Pharmacologyonline*, **1**, 537-541.

Ramalhos, E.E., Gomes, T.T., Pereira, A.P., Dias, T.T. & Estevinho, L.M. (2011): Mead production tradition versus modernity. *Advanced Food Nutritional Reserch*, **63**, 101-118.

Rindt, I.K., Niculae, M., and Brudașcă, F. (2007): Antibacterial activity of honey and propolis mellifera against *Staphylococcus aureus*, *Lucrări Științifice Medicină Veterinară*, Vol. **XL**, 584-589.

Taormina, P.J., Niemira, B.A., and Beuchat, L.R. (2001): Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power, *International Journal of Food Microbiology*, **69**, 217-225.

Tirtawinata, T.Ch. (2006): *Makanan Dalam Perspektif Al-Quran dan Ilmu Gizi*, Balai Penerbit FKUI, Jakarta, 178-182.

Tumin, N., Halim, N.A.A., Shahjahan, M., Izani, N., Sattar, M.A., Khan, A.H., and Mohsin, S.S.J. (2005): Antibacterial activity of local Malaysian honey, *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **3**(2), 1-10.

Yuniyanto, M. (2010): *Meracik Sendiri Ramuan Herbal Nabi*, Pustaka Arafah, Solo, 120-134.