

*Skripsi*

**SKRINING KANDUNGAN SENYAWA AKTIF MADU HUTAN ASAL  
Kab.BONE DAN UJI POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI  
TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Staphylococcus mutans***

**WAHYUNI EKA NANDA**

**H311 14 017**



**DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2018**

**SKRINING KANDUNGAN SENYAWA AKTIF MADU DAN UJI  
POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus  
aureus* DAN *Staphylococcus mutans***

**Skripsi ini di ajukan sebagai salah satu syarat  
untuk mendapatkan gelar sarjana sains**

**Oleh :**

**WAHYUNI EKA NANDA**

**H311 14 017**



**MAKASSAR  
2018**



**SKRIPSI**

**SKRINING KANDUNGAN SENYAWA AKTIF MADU DAN UJI  
POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus  
aureus* dan *Staphylococcus mutans***

**Disusun dan diajukan oleh:**

**WAHYUNI EKA NANDA  
H311 14 017**

**Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh:**

**Pembimbing Utama**



**Prof. Dr. H. Alfian Noor, M.Sc  
NIP. 19510515 197412 1 001**

**Pembimbing Pertama**



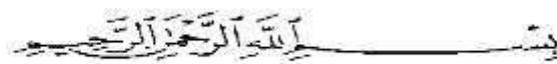
**Drs. F.W. Mandey, M.Sc  
NIP. 19650118 199002 1 001**

*Kupersembahkan untuk Ayahanda, Ibunda, Saudaraku,  
orang-orang yang kucintai dan mencintaiku karena Allah.*

*Serta sebagai tanda terima kasih kepada mereka.*



## PRAKATA



Alhamdulillah rabbil alamin, segala puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT, yang telah mengizinkan penulis menyelesaikan penulisan skripsi ini. Skripsi yang berjudul “**SKRINING KANDUNGAN SENYAWA AKTIF MADU HUTAN ASAL Kab.BONE DAN UJI POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Staphylococcus mutans***” disusun sebagai salah satu persyaratan akademik yang harus dipenuhi untuk menyelesaikan program strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Limpahan rasa hormat dan bakti serta doa yang tulus, penulis persembahkan kepada orang tua Ayah dan Ibu tercinta, **Tukiman dan Wawinarti**, atas kesabaran, dukungan, kekuatan dan doa yang tak pernah putus untuk anak-anaknya, saudaraku **M. Nur Karim, Habilin, Srikandi dan Adi Wibowo** terimakasih atas segala kasih sayang, perhatian dan pengertiannya, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kasih sayang-Nya dan memberi rahmat-Nya kepada kalian. Terimakasih juga penulis haturkan kepada:

1. Ayahanda **Prof. Dr. H. Alfian Noor** selaku pembimbing utama dan ayahanda **Drs. F.W. Mandey, M.Sc** selaku pembimbing pertama yang sangat membantu penulis dan telah mengarahkan penulis sejak awal rencana penelitian hingga terselesaikannya penulisan skripsi ini.

**Prof. Dr. H. Ahyar Ahmad** (ketua), bapak **Dr.Maming, M.Si** (anggota), dan ibu **Dr. Sitti Fauziah, M.Si** (anggota) sebagai tim penguji



yang telah meluangkan waktunya untuk memberi saran dan masukan yang berharga kepada penulis agar lebih baik lagi.

3. Bapak **Dr. Abdul Karim** selaku ketua Departemen Kimia dan seluruh dosen serta staf jurusan yang telah mengajarkan dan membantu penulis dalam berbagai hal serta menjadi orang tua penulis selama perjalanan menempuh pendidikan di Departemen Kimia. Semoga apa yang diajarkan bernilai ibadah oleh-NYA.
4. Adik-adikku **M.Nur Karim, Habilin, Srikandi, dan Adi Wibowo** sebagai penyemangat saya dalam menyelesaikan tugas akhir ini. karena kalian merupakan adik- adik tersayang.
5. Saudara-saudaraku **PREKURSOR 2014** terimakasih atas kebahagiaan dan kenangan indah yang kalian berikan selama ini, ikatan saudara di dunia perkuliahan yang selalu berbagi suka dan duka, yang saling membantu dan memberi semangat. Ikatan ini tidak berakhir disini, karena setiap kenangan menolak untuk dilupakan “*KUAT KITA BERSAMA*”. Dan atas “*DEDIKASI HINGGA AKHIR*” yang memang hingga akhir perjalanan dalam dunia perkuliahan.
6. Saudara-saudaraku **CHEMISTRY 2014** terimakasih atas kebahagiaan dan kenangan indah yang kalian berikan selama ini, ikatan saudara di dunia perkuliahan yang selalu berbagi suka dan duka, yang saling membantu dan memberi semangat.
7. Saudara-saudaraku **Mipa 2014**, terkhusus buat **Pengurus BEM KMF MIPA** **le 2017-2018** terimakasih atas seluruh bantuan, dukungan dan



kebersamaan kalian. Semoga semangat itu selalu bersama kalian dimanapun kalian berada.

8. Rekan-rekan peneliti Laboratorium Kimia Radiasi, **Endah, Ainun, Rani, dan vitra**. Dan teman yang biasa diajak kemana-mana **Mia, Nadya, dan Tina**.
9. Teman-teman **KKN Gel. 96 Kecamatan Patampanua, Kabupaten Pinrang**, terkhusus seluruh keluarga di **Posko Desa Mattiro Ade**.
10. Seluruh kanda-kanda, adinda-adinda dan alumni **Keluarga Mahasiswa Kimia FMIPA Unhas** yang telah berbagi ilmu dan pengalaman serta mendorong penulis untuk tetap semangat dalam menyelesaikan tugas akhir. *“HMK Tempat Kita di Bina, HMK Tempat Kita di Tempa”*.
10. Seluruh anggota dan alumni **KM FMIPA Unhas** untuk berbagai macam pelajaran berharga. Salam *“Use Your Mind Be The Best”*

Penulis sadar akan segala kekurangan dalam penulisan skripsi ini, maka penulis sangat menghargai bila ada kritik dan saran demi penyempurnaan isi skripsi ini. Penulis hanya dapat berdoa agar termasuk kedalam orang-orang yang diridhoi-Nya dan apa yang dikerjakan semoga bernilai ibadah disisi-Nya serta agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi penulis dan orang-orang yang membacanya. Aamiin.

Makassar, 12 Januari 2018

Penulis



## ABSTRAK

Madu merupakan cairan alami yang dihasilkan dari sekresi lebah yang berasal dari nektar bunga dan diproses dalam perut lebah. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan pengujian bioaktivitas madu, ekstrak madu dan fraksi madu. Proses isolasi meliputi tahap-tahap maserasi, partisi dan fraksinasi. Selanjutnya dilakukan uji fitokimia dan uji bioktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil uji fitokimia didapatkan bahwa madu mengandung metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin, senyawa fenolik, saponin, steroid dan terpenoid. Pada ekstrak madu hanya mengandung alkaloid, flavonoid, steroid dan tanin. Sedangkan pada fraksi madu hanya mengandung alkaloid dan tanin. Hasil uji bioaktivitas antibakteri menunjukkan bahwa senyawa tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus mutans*.

Kata kunci: antibakteri, bioaktivitas madu, ekstrak madu, madu, fraksi madu, uji fitokimia



## ABSTRACT

Honey is a natural liquid produced from the secretion of bees derived from flower nectar and processed in the bee stomach. This research are aimed to isolate, identify, characterize, and test the bioactivity of dichloromethane fraction of honey, honey ekstraks and honey fraction. The isolation process including steps of maceration, partition and fractionation. Moreover, phytochemical tests and antibacterial bioctivity tests of *Sthapylococcus mutans* and *Sthapylococcus aureus*. The phytochemical test results showed that honey contained secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, tannins, phenolic compounds, saponins, steroids and terpenoids. Honey extract contains alkaloids, flavonoids, steroids and tannins. While the honey fraction contains alkaloids and tannins. Bioactivity test as an antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* and *Sthapylococcus mutans* shown a positive sign of inhibition.

Keyword: antibacterial, honey, honey ekstrakt, honey fraction, honey bioactivity, phytochemical tests.



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
PRAKATA.....	v
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACT .....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Maksud Penelitian.....	4
1.3.2 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Gambaran Umum Madu.....	6
2.2 Madu Monofloral Dan Polifloral .....	7
2.2.1 Sifat Sifat Madu .....	8
2.2.2 Fungsi dan Kegunaan Kimia Aktif Madu.....	9



2.5 Jenis Jenis Bakteri .....	10
2.6 Uji Aktivitas Antibakteri.....	13
2.7 Sifat Antibakteri Pada Madu.....	15
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>19</b>
3.1 Bahan Penelitian.....	19
3.2 Alat Penelitian.....	19
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian .....	19
3.4 Prosedur Penelitian.....	20
3.4.1 Pengambilan Sampel.....	20
3.4.2 Ekstraksi Dan Isolasi Madu .....	20
3.4.3 Fraksinasi Ekstrak Diklorometan (DCM) dan N-Heksan .....	20
3.4.4 Skrinning Fitokimia .....	20
3.4.4.1 Identifikasi Golongan Alkaloid (Harborne, 1973).....	20
3.4.4.2 Identifikasi Golongan Flavonoid (Harborne, 1973) .....	21
3.4.4.3 Identifikasi Golongan Terpenoid dan Steroid(Harborne, 1973)	21
3.4.4.4 Identifikasi Golongan Fenolik (Harborne, 1973) .....	21
3.4.4.5 Identifikasi Golongan Tanin (Ahmad dkk., 2013).....	22
3.4.4.6 Identifikasi Golongan Saponin (Maretrin, 2017).....	22
3.4.5 Pengujian Aktivitas Antibakteri.....	22
3.4.5.1 Pembuatan Medium Nutrien Agar.....	22
3.4.5.2 Penyiapan Biakan Bakteri Uji .....	22
3.4.5.3 Pembuatan Larutan Kontrol.....	22
3.5 Uji Aktivitas Antibakteri .....	23



<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>25</b>
4.1 Penyiapan dan Pengolahan Sampel.....	25
4.2 Ekstraksi dan Fraksinasi.....	25
4.3 Skrinning Fitokimia .....	26
4.4 Uji Aktivitas Antibakteri.....	28
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>35</b>
5.1 Kesimpulan .....	35
5.2 Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA .....	36
LAMPIRAN.....	40



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Madu polifloral.....	7
2. Hasil zona hambat madu pada <i>S.muntans</i> .....	29
3. Hasil zona hambat madu pada <i>S.aureus</i> .....	30



## DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Standar Kualitas Madu Berdasarkan <i>International Honey Comission</i> ...	9
2. Hasil uji fitokimia ekstrak sarang madu dan madu.....	17
3. Hasil uji fitokimia madu.....	27
4. Aktivitas antibakteri madu pada bakteri yaitu <i>Staphyloccus mutans</i> dan <i>Staphyloccus aureus</i> .....	29



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Bagan Penyiapan Sampel .....	40
2. Bagan Ekstraksi dan Isolasi Madu .....	41
3. Fraksinasi Ekstrak Metanol dan diklorometan (DCM) .....	42
4. Uji Bioaktivitas.....	43
5. Uji bioaktivitas antibakteri .....	45
6. Foto dokumentasi .....	46



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara dengan kawasan hutan seluas 129,425,443.29 ha memiliki potensi yang sangat besar untuk dikembangkan (Kementrian Kehutanan, 2013). Potensi hutan terbagi atas dua jenis yaitu: potensi kayu dan non kayu. Produksi hutan kayu antara lain: akasia, meranti, eukaliptus, sengon atau albasia, jati, karet, merbau, pinus, mahoni dan lain lain. Selanjutnya potensi hutan non kayu berupa bambu, rotan, getah pinus, madu, karet, daun kayu putih, kemiri, asam, gaharu, damar dan lain lain. Madu adalah potensi hutan non kayu terbesar keempat di Indonesia yakni sebesar 95.915,91 liter per tahun (Statistik Produksi Kehutanan, 2014).

Produksi pada tahun 2014 madu di Pulau Sulawesi sebesar, 5.850 liter dan menjadi penyumbang sebanyak 6,14% dari total produksi madu nasional, serta merupakan pulau penghasil madu ketiga terbesar setelah Jawa (64,77%) dan Bali serta Nusa Tenggara (19,3%). Produksi madu tahun 2014 ini memiliki kecenderungan peningkatan selama triwulan I sampai III yakni meningkat dari 9.360 liter pada triwulan I menjadi 37.240 liter pada triwulan III. Namun pada triwulan IV menurun menjadi 36.790 liter (Statistik Produksi Kehutanan, 2014).

Beberapa provinsi di Indonesia yang menjadi daerah sentra produksi yang potensial untuk pengembangan komoditi madu hutan, diantaranya adalah Provinsi

Selatan yang memiliki luas kawasan hutan 2,725,796.00 ha (Kementrian Kehutanan, 2013).



Potensi ini juga didukung oleh pemerintah Provinsi Sulawesi Selatan dengan mencanangkan Gerakan Pembangunan Ekonomi Masyarakat (Gerbang Emas). Salah satu arah program ini adalah pengembangan budidaya lebah madu sebagai upaya untuk mengentaskan kemiskinan yang dilaksanakan di beberapa kabupaten yang ada di Sulawesi Selatan seperti Gowa, Bantaeng, Sinjai, Bulukumba, Maros, Sidrap, Palopo, Tana Toraja, Luwu, Bone dan beberapa daerah lainnya (Mahmud, 2008).

Madu adalah cairan nektar bunga yang dihisap oleh lebah madu dan disimpan di kantong madu yang ada di dalam tubuhnya. Nektar bunga yang telah disimpan dan diolah dalam tubuh lebah dengan bantuan enzim kemudian dikeluarkan kembali ke tempat penyimpanan madu di sarang lebah (Adriani, 2011). Madu merupakan zat manis alami yang dihasilkan lebah dari bahan baku nektar bunga. Madu adalah energi yang mudah digunakan oleh tubuh karena memiliki kandungan gula sederhana yang mudah dicerna. Nilai kalori madu adalah 295 kalori/ 100 gram.

Komposisi utama madu adalah 75-80% karbohidrat, 17-20% air, 1-2% mineral dan beberapa senyawa organik. Zat-zat yang terkandung dalam madu sangatlah kompleks dan kini telah diketahui tidak kurang dari 181 macam zat yang terkandung dalam madu dan yang terbesar adalah kandungan karbohidrat (Sihombing, 1997). Secara umum kandungan karbohidrat madu adalah 60-70% monosakarida, disakarida, trisakarida dan oligosakarida. Selanjutnya senyawa organik yang terdapat dalam madu antara lain asam amino, enzim, protein, vitamin, asam organik, pigmen, fenolat, produk reaksi *Maillard* (MRP) dan senyawa yang mudah menguap (Kucuk dkk., 2007; Karaman dkk., 2010).

Madu hutan memiliki metabolit sekunder yang berasal dari nektar tumbuhan bervariasi. Hal ini dikarenakan lebah hutan memiliki habitat di hutan hujan yang memiliki keragaman tumbuhan yang tinggi. Madu memiliki beberapa



aktivitas biologis antara lain: anti mikroba, anti peradangan/ infeksi atau anti inflamasi (Bangroo dkk., 2005). Aktivitas anti mikroba dari madu sebagian besar disebabkan oleh adanya hidrogen peroksida yang dihasilkan secara enzimatis pada madu. Kandungan hidrogen peroksida ini menghasilkan radikal bebas yang menimbulkan efek anti mikroba (Hendri dkk., 2008).

Mikroorganisme yang terdapat dalam madu berasal dari berbagai sumber antara lain nektar dan serbuk sari dari daerah pengolahan. Mikroorganisme yang lebih sering ditemukan adalah dari Tipe *Bacillus* Bakteri non-sporulated (*Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*) yang berasal dari organ bunga atau saluran pencernaan lebah. Jamur dapat menyebar di alam karena dapat bertahan dalam kondisi termal atau panas, dalam kapasitas yang besar, hal ini dapat disebarkan oleh manusia, melalui debu bahkan melalui lebah dan madu (Gillian dkk., 1983). Mikroba yang ditemukan dalam madu tidak berbahaya bagi kesehatan konsumen. Bahkan jika *Aspergillus flavus* ditemukan, tidak ada kondisi yang menguntungkan bagi aflatoxin. Kehadiran mikroorganisme pada madu terkadang dapat mempengaruhi kestabilan produk dan higienisnya kualitas (Maria dkk., 2010).

Aktivitas antibakteri madu terutama bergantung pada kombinasi aktivitas peroksida dan komponen non-peroksida. Aktivitas antibakteri dari lima varietas madu (tiga monofloral, akasia, gelam dan nanas, serta dua polifloral, kelulut dan tualang) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Izwan dkk., 2013).

*Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang

akan karies gigi. Karies merupakan salah satu penyakit di rongga mulut  
prevalensinya di Indonesia masih cukup tinggi. Karies gigi merupakan suatu  
infeksi pada jaringan keras gigi, yaitu email, dentin dan sementum



(Warna, 2011). Karies gigi pada anak usia dini merupakan masalah kesehatan yang sangat serius karena merupakan penyakit infeksi kronis yang menular pada setiap anak (Lutfi dkk., 2010). Proses terjadinya karies adalah hasil dari pergeseran yang bertahap dan konsisten pada keseimbangan demineralisasi dan remineralisasi email gigi yang secara langsung dipengaruhi oleh *S. mutans* sebagai salah satu agen yang paling penting penyebab karies gigi (Nathan, 2008).

Hasil nilai rata-rata diketahui bahwa jumlah bakteri *S. mutans* anak usia dini bebas karies lebih rendah ( $513.500,00 \pm 185.565,28$  CFU/mL) dibandingkan dengan S-ECC ( $977.000,00 \pm 222.500,15$  CFU/mL), sedangkan ekspresi IL-8 neutrofil saliva anak usia dini bebas karies lebih tinggi ( $3,31 \pm 0,50$ ) dibandingkan dengan S-ECC ( $2,95 \pm 0,56$ ) (Lutfi, 2011), sehingga sangat penting untuk mengurangi aktivitas dari bakteri ini. Maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari madu asal hutan Bone di Desa Sadar. Karena madu asal daerah ini belum ada yang meneliti sebelumnya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini, antara lain:

1. apa saja senyawa aktif yang terdapat dalam madu hutan Bone di Desa Sadar?
2. apakah senyawa ini memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *S. mutans*?

## 1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Maksud Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi dan terisasi senyawa aktif yang terdapat dalam hutan yang berpotensi sebagai



### 1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini untuk:

1. mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa aktif dari madu hutan Bone di Desa Sadar.
2. mengetahui potensi senyawa aktif dari madu hutan Bone di Desa Sadar sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus aureus*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi potensi sumber daya hutan Indonesia dalam madu meliputi kandungan senyawa aktif sebagai antibakteri serta memberikan kontribusi terbaru terhadap perkembangan pengetahuan dan penelitian.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Gambaran Umum Madu

Madu menurut standar Nasional Indonesia (SNI) 01-3545-2004 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. Madu di Indonesia memiliki kisaran nilai yang besar dalam setiap komponennya.

Faktor yang diperlukan untuk menghasilkan madu. Pertama, bunga nektarnya merupakan bahan baku pembuatan madu. Kedua, serangga yaitu lebah yang merupakan tenaga ahlinya. Nektar adalah senyawa kompleks yang dihasilkan kelenjar tanaman dalam bentuk larutan gula (Sarwono, 2001).

Madu merupakan hasil sekresi lebah, karena madu ditempatkan dalam bagian khusus di perut lebah yang disebut perut madu dan terpisah dari perut besarnya. Nektar yang dihisap mengandung 60% air sehingga lebah harus menurunkan menjadi 20% atau lebih rendah lagi untuk membuat madu. Proses penurunan kadar air mulai terjadi saat lebah menjulurkan lidahnya (*proboscis*) untuk memindahkan madu dari perut madu ke sarang lebah, disarang kadar air terus diturunkan melalui putaran sayap-sayap lebah menyirkulasikan hawa hangat ke dalam sarang lebah. Proses selanjutnya terjadi di dalam perut lebah dimana enzim invertase mengubah sukrosa (disakarida) menjadi glukosa dan fruktosa yang keduanya merupakan monosakarida (Harivati, 2010).

ak ribuan tahun yang lalu sampai sekarang ini, madu telah dikenal sebagai bahan makanan atau minuman alami yang mempunyai peranan penting



dalam kehidupan. Madu memiliki manfaat dalam berbagai aspek, antara lain dari segi pangan, kesehatan dan kecantikan. Madu sering digunakan sebagai bahan pemanis penyedap makanan dan campuran saat mengonsumsi minuman. Selain itu, madu sering pula digunakan untuk obat-obatan. Madu merupakan salah satu obat tradisional tertua yang dianggap penting untuk pengobatan penyakit pernapasan, infeksi saluran pencernaan dan bermacam macam penyakit lainnya. Madu juga dapat digunakan secara rutin untuk membuat luka, serta mengurangi rasa sakit dan bau dengan cepat (Mulu dkk., 2004).

Menurut Hariyati (2010), di Indonesia jenis lebah yang paling banyak digunakan sebagai penghasil madu adalah lebah lokal (*Apis cerana*), lebah hutan (*Apis dorsata*) dan lebah eropa (*Apis mellifera*). Ada banyak jenis madu yang dibedakan berdasarkan sumber nektar, letak geografi, dan teknologi pemrosesannya. Jenis madu berdasarkan sumber nektarnya dapat dibagi menjadi dua, yaitu monoflora dan poliflora (Suranto, 2007). Madu poliflora yang merupakan madu hutan dapat dilihat pada **Gambar.1**.



**Gambar 1.** Madu poliflora



## 2.2 Madu Monofloral dan Polyfloral

Madu monoflora merupakan madu yang diperoleh dari satu tumbuhan utama. Madu ini biasanya dinamakan berdasarkan sumber nektarnya, seperti madu kelengkeng, madu rambutan dan madu randu. Madu monoflora juga disebut madu ternak, karena madu jenis ini pada umumnya diternakkan. Sedangkan madu poliflora merupakan madu yang berasal dari nektar beberapa jenis tumbuhan bunga. Contoh dari madu jenis ini adalah madu hutan. Madu hutan adalah madu yang diproduksi oleh lebah liar yang bernama *Apis dorsata*. Sumber pakan dari lebah ini adalah tumbuh-tumbuhan obat yang banyak tumbuh didalam hutan hujan tropis di Indonesia. Madu hutan juga sangat baik untuk kesehatan karena mengandung antibiotik alami yang diproduksi oleh lebah-lebah liar (Suranto, 2007).

Selain madu monoflora dan poliflora, terdapat jenis madu yang ketiga yang disebut madu ektraflora. Madu ektraflora atau madu embun adalah madu yang dihasilkan dari nektar diluar bunga, seperti daun, cabang dan batang tanaman. Madu embun dihasilkan dari cairan sekresi serangga, yang kemudian eksudatnya diletakkan dibagian tanaman. Selanjutnya cairan itu dihisap dan dikumpulkan oleh lebah madu. Madu ini berwarna gelap dengan aroma merangsang (Sarwono, 2001).

Madu telah digunakan sebagai makanan dan produk medis sejak awal. Madu secara alami diproduksi oleh lebah madu *Apis mellifera* dari nektar bunga atau dari eksudat pohon dari tanaman yang memberikan jenis madu masing-masing. Madu menjadi satu-satunya pemanis alami, yang merupakan makanan penting bagi manusia (Crane,1975).



### as Madu

ualitas madu ditentukan oleh beberapa hal diantaranya waktu pemanenan ar air, warna madu, rasa dan aroma madu. Waktu pemanenan madu harus

dilakukan pada saat yang tepat, yaitu ketika madu telah matang dan rongga-rongga madu mulai ditutup oleh lebah. Madu bersifat menyerap air sehingga akan bertambah encer dan akan menyerap kelembaban udara disekitarnya. Madu yang normal yaitu memiliki kadar air 18,8% atau kurang akan menyerap kelembaban udara sekitar 60% (Olaitan dkk., 2007).

Standar madu internasional telah ditentukan dalam *European Directive Honey* oleh Codex Alimentarius yang telah dipublikasikan sejak tahun 1997. Beberapa standar dan metode dikembangkan dengan lebih modern dalam *Harmonised Method Of The International Honey Commission* tahun 2002, mencakup standar dan metode untuk penentuan faktor kualitas meliputi kadar air, abu, keasaman, hidroximetilfurfural (HMF) dan aktivitas diastase dan bahan tidak larut dalam air seperti terlihat pada **Tabel 1.** berikut:

**Tabel 1.** Standar Kualitas Madu Berdasarkan *International Honey Commission* (2002)

Kriteria Kualitas	Syarat
Kadar air	25 gram/100 gram
Kadar abu	1,2 gram/100 gram
Keasaman	50 meq/kg
pH	3,6-5,6
Konduktivitas elektrik	0,8 mS/ cm
Aktivitas diastase	8
5-Hidroksimetil-2-furfural (HMF)	60 mg/kg

## 2.4 Kandungan Kimia Aktif Madu



komposisi madu ditentukan oleh dua faktor utama yaitu komposisi nektar asal faktor-faktor eksternal yaitu lingkungan (Sihombing, 2005). Perbedaan

jenis tanaman sebagai sumber utama nektar mengakibatkan komponen madu yang dihasilkan juga berbeda. Komposisi kimia madu yang dapat menjadi indikator kemurnian madu yaitu kandungan HMF, kadar air, karbohidrat, protein dan nilai pH (Bogdanov dkk., 2002; Simuth dkk., 2004).

Hidroksimetilfurfural (HMF) yang terdapat dalam madu merupakan senyawa kimia yang dihasilkan dari perombakan monosakarida madu yang jumlah atom C nya enam (glukosa dan fruktosa), dalam suasana asam dan dengan bantuan kalor (panas) (Achmadi, 1991). Kadar HMF dapat menjadi indikator kerusakan madu oleh pemanasan yang berlebihan atau karena penambahan gula *invert*. Kedua perlakuan tersebut akan meningkatkan kadar HMF (Winarno, 1982). Semakin lama penyimpanan menyebabkan kadar HMF pada madu semakin tinggi (White, 1994).

Fruktosa dan glukosa yang terdapat dalam madu mencakup 85% - 90% dari karbohidrat dan hanya sebagian kecil oligosakarida dan polisakarida. Kandungan karbohidrat madu juga berpengaruh terhadap sifat fisik madu (White, 1992). Madu termasuk bersifat asam dengan pH 3,2-5. Nilai pH madu yang rendah ini mendekati pH asam cuka, tetapi kandungan gula yang tinggi membuat madu terasa manis bukan asam seperti cuka (Matheson, 1984). Keasaman madu ini ditentukan oleh disosiasi ion hidrogen dalam larutan air, namun sebagian besar juga oleh kandungan berbagai mineral antara lain Ca, Na dan K (Adriana, 1987)

## 2.5 Jenis-jenis Bakteri

### A. Bakteri *Escherichia coli*

*Escherichia coli* merupakan organisme indikator yang dapat dipakai dalam

untuk menguji adanya pencemaran oleh tinja tetapi dalam pemindah tidak melalui air. Diare akut disebabkan oleh *E. coli* yang ditularkan



melalui kegiatan tangan kemulut atau melalui pemindahan pasif di dalam makanan atau minuman (Pelczar dan Chan,1988).

### **B. Bakteri *Shigella dysenteriae***

Organisme *Shigella* merupakan gram negatif, berbentuk batang pendek dan tidak bergerak. Pertumbuhan optimumnya terjadi pada suhu 37 °C dalam keadaan aerobik. Inang alamiah *Shigella* pada hakikatnya terbatas pada manusia. *Shigella* harus menembus sel-sel lapisan epitelial usus besar untuk dapat mengakibatkan disentri. Kecenderungan *Shigella* untuk menyebar tidak begitu begitu ganas dibandingkan *Salmonella*. Penyebaran *Shigella* pada organ-organ lain selain usus sehingga menyebabkan penyakit sangat jarang terjadi. Walaupun demikian, *Shigella dysenteriae* merupakan penyebab penyakit yang paling parah karena menghasilkan juga eksotoksin yang mempunyai sifat neurotoksik maupun enterotoksik sehingga anak-anak yang terjangkit dapat menderita kejang. Eksotoksin ini adalah protein terlarut yang tidak tahan panas (Pelczar dan Chan, 1988).

### **C. Bakteri *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif, berbentuk bulat (lokus) dengan ukuran kecil berdiameter 0,5-1,5 mikron, tidak membentuk spora, biasanya sel-selnya terdapat dalam kelompok seperti buah anggur. Suhu pertumbuhan optimum adalah 35-37 °C dalam pH optimum untuk pertumbuhannya adalah 7,0-7,5 dan berwarna keemasan. *Staphylococcus* adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini adalah infeksi pada folikel rambut dan kelenjar keringat, bisul, infeksi luka, meningitis dan

(Entjang, 2003; Djide dkk., 2004).



Beberapa kasus keracunan makanan yang umum terjadi karena mengonsumsi makanan yang tercemar oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus* adalah organisme yang biasanya terdapat diberbagai bagian tubuh manusia seperti hidung, tenggorokan dan kulit sehingga mudah masuk melalui makanan. Organisme ini dapat berasal dari orang yang menangani makanan orang yang menderita infeksi patogenik (membentuk nanah). Pada semua kasus yang terjadi, umumnya hanya mengalami sakit yang tidak lama ( $\pm$  24-28 jam) dan hampir semua kasus terjadi kesembuhan total. Pada anak kecil dan orang lemah, walaupun jarang terjadi, dapat mengakibatkan renjatan (*shock*) dan kematian akibat dehidrasi (Pelczar dan Chan, 1988).

Gejala segera terlihat setelah makan makanan yang tercemar. Jumlah enterotoksin yang termakan menentukan waktu timbulnya gejala serta parah tidaknya infeksi tersebut. Pada umumnya, gejala-gejala mual, pusing, muntah dan diare muncul 2 sampai 6 jam setelah makan makanan yang tercemar tersebut. Enterotoksin ini tahan panas, tidak berubah walau dididihkan selama 30 menit. Makanan tercemar yang dibiarkan pada suhu kamar selama delapan sampai sepuluh jam, cukup untuk menghasilkan toksin dalam jumlah yang memadai untuk menyebabkan keracunan makanan. Toksin yang dihasilkan juga tidak akan musnah walaupun makanan disimpan dalam lemari es selama berbulan-bulan (Pelczar dan Chan, 1988).

#### **D. Bakteri *Staphylococcus mutans***

*Staphylococcus mutans* merupakan bakteri gram positif yang terdapat dalam mulut manusia, dan memiliki multi spesies yang banyak biofilm pada gigi manusia (Zero dkk., 2009). *Staphylococcus mutans* adalah organisme kariogenik yang a sangat banyak pada gula dan asam, kapasitasnya juga dapat bertambah



karena produksi saliva pada mulut manusia. Kelebihan dari bakteri ini dapat menjadi tidak kariogenik pada pH rendah (Lemos dkk 2013 dan Falsetta dkk 2012).

*Staphylococcus mutans* pertama kali diisolasi oleh Clark pada tahun 1924 dari gigi manusia yang mengalami karies. *Staphylococcus mutans* berperan penting terhadap terjadinya karies gigi. Istilah *Staphylococcus mutans* diambil berdasarkan hasil pemeriksaan mikrobiologi dengan pengecatan gram. Bakteri ini berebentuk oval dan lain dari bentuk spesies *Staphylococcus* yang lain, sehingga disebut sebagai mutan dari *Staphylococcus*. Taksonomi dari *Staphylococcus mutans* adalah sebagai berikut (Michalek, 1990):

Kingdom : Monera  
Divisio : Firmicutes  
Class : Bacili  
Order : Lactobacilalles  
Family : Streptococcaceae  
Genus : *Staphylococcus*  
Species : *Staphylococcus mutans*

*Staphylococcus mutans* diklasifikasikan berdasarkan serotype menjadi 8 kelompok yaitu serotype “a” sampai “h”. Pembagian serotype ini berdasarkan perbedaan karbohidrat pada dinding sel. Akan tetapi, berdasarkan hibridasi DNA bakteri ini dibagi menjadi 4 kelompok genetik. Pembagian ini berdasarkan presentase basa DNA yaitu *guanine* dan *cytosine*. Strain *Staphylococcus mutans* yang banyak terdapat pada manusia adalah serotype c, e dan (36 sampai 38% G + C), dimana

*ccus mutans* serotype c merupakan bakteri utama penyebab karies gigi (1990).



## 2.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Bakteri adalah mikroorganisme bersel tunggal dengan konfigurasi seluler prokariotik (tidak mempunyai selubung inti). Bakteri dapat diklasifikasikan dengan berbagai cara. Salah satu klasifikasi yang paling sering digunakan adalah dengan menggunakan pewarnaan gram. Pewarnaan gram adalah prosedur mikrobiologi dasar untuk mendeteksi dan mengidentifikasi bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif. Pewarnaan gram ditemukan oleh H. C. J. Gram, seorang histologis pada tahun 1884 (Harniza, 2009).

Antibiotik umumnya didefinisikan sebagai senyawa organik alami dengan berat molekul kecil yang aktif melawan mikroorganisme pada konsentrasi yang rendah (Demain, 1999). Deteksi kemampuan antibiotik menjadi salah satu cara menguji bioaktivitas suatu metabolit sekunder. Antibiotik yang aktif melawan bakteri disebut sebagai antibakteri. Antibakteri dapat digolongkan menjadi dua jenis yaitu bakteristatik yang hanya menahan pertumbuhan koloni bakteri dan bakteriosidal yang mampu membunuh koloni bakteri sepenuhnya (Pankey dan Sabbath, 2004).

Salah satu metode standar untuk antibakteri adalah metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Lethal Concentration* (MLC). MIC umumnya didefinisikan sebagai konsentrasi terendah antimikroba untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme setelah inkubasi (Andrews, 2001). Sedangkan MLC adalah konsentrasi minimum untuk membunuh inokulum yang telah ditetapkan terlebih dahulu persinya (biasanya 99,9 %) dalam waktu yang di berikan (Harniza, 2009).

Pemakaian antibakteri yang berlebihan dapat menyebabkan mikroba resisten. Oleh karena itu, senyawa antibakteri baru diperlukan mengatasi resisten bakteri tersebut. Disamping itu juga perlu pengembangan



antiseptik dan disinfektan baru yang lebih aman bagi kulit dan jaringan manusia (Hostetmann, 1991).

Beberapa metode uji bioaktivitas antibakteri dari ekstrak dapat dilakukan dengan tiga metode yaitu (Hostetmann, 1991):

a) metode difusi

Ekstrak uji yang diserap dengan kertas saring dimasukkan ke dalam silinder atau dimasukkan ke dalam lubang, dikontakkan dengan media yang telah diinokulasi. Setelah diinokulasi kemudian diinkubasi, diameter daerah bening disekitar reservoir diukur. Diameter daerah bening ini merupakan daerah inhibisi dari ekstrak sampel terhadap mikroba uji. Untuk menurunkan limit deteksi, sistem dibiarkan pada suhu rendah selama beberapa jam sebelum diinokulasi, yaitu untuk memberikan kesempatan kepada antibiotik untuk berdifusi sebelum mikroba tumbuh.

b) metode pengenceran

Sampel yang akan diuji dicampur dengan medium yang cocok yang sebelumnya telah diinokulasi dengan mikroba uji. Setelah diinkubasi, pertumbuhan mikroba dapat ditentukan dengan cara visual atau dengan perbandingan turbidimetri dari kultur uji dengan kultur kontrol. Kultur kontrol adalah kultur yang tidak diberi sampel yang akan diuji bioaktivitasnya.

c) metode bioautografi

Metode untuk menentukan posisi senyawa yang mempunyai aktivitas mikroba pada kromatogram. Caranya adalah dengan memindahkan senyawa uji dari kromatogram lapis tipis atau kertas ke medium agar yang sudah diinokulasi dengan mikroba uji. Daerah inhibisi kemudian dilihat dengan cara yang sesuai.



Aktivitas suatu antibakteri dapat diketahui secara *in vitro* dan *in vivo*. Aktivitas secara *in vitro* dan *in vivo* memiliki hasil yang tidak setara. Apabila secara *in vivo*, suatu antibakteri harus mampu mencapai tempat infeksi dalam konsentrasi yang memadai untuk memproduksi aktivitas. Secara *in vitro* ditunjang oleh pertahanan tubuh yang dapat membasmi bakteri pembasmi. Kedua cara dalam melakukan aktivitas ini dapat dilakukan bersamaan ataupun salah satu diantaranya (Wattimena, 1991).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dapat dibagi dalam lima kelompok yaitu: 1) yang mengganggu metabolisme sel bakteri; 2) yang menghambat sintesis dinding sel bakteri; 3) yang merusak keutuhan membran sel bakteri; 4) yang menghambat sintesis protein sel bakteri ; dan 5) yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri (Gan, 1989; Wattimena, 1991).

## 2.7 Sifat Antibakteri pada Madu

Aktivitas antibakteri madu terutama bergantung pada kombinasi aktivitas peroksida dan komponen non-peroksida. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari madu (tiga monofloral, akasia, gelam dan nanas, dan dua polifloral, kelulut dan tualang) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Izwan dkk.,2013).

Madu yang tidak diencerkan, oksidase glukosanya tidak aktif. Karena itu, dengan bantuan berbagai antioksidan konstituen, kadar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada madu yang tidak diencerkan, diminimalkan tekanan osmotiknya yang tinggi ditambah dengan keasaman tinggi jadi dua faktor utama ini yang berkontribusi terhadap sifat

madu pada tahap ini. Madu diencerkan sampai kadar tertentu, oksidase kan menjadi diaktifkan dan mulai memanfaatkan glukosa untuk



menghasilkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dalam hal ini, aktivitas antibakteri madu akan berangsur-angsur bergeser dari osmotik rendah dan pH rendah tergantung pada peroksida. Beberapa jenis madu, memiliki antibakteri non-peroksida tinggi aktivitas yang dapat mempertahankan potensi antibakteri bahkan setelah mengeluarkan komponen peroksida dari madu encer. Ini dikenal sebagai madu non peroksida aktif yang mengandung banyak unsur non-peroksida yang mendukung tindakan antibakteri. Ini termasuk senyawa fenolik, flavonoid, peptida antibakteri, *methylglyoxal*, metil *syringate*, turunan seperti antibiotik dan lainnya komponen hadir dalam jumlah jejak. Tidak semua jenis dari madu menunjukkan aktivitas non-peroksida. Adapula madu yang menunjukkan aktivitas peroksida yang tinggi namun memiliki aktivitas antibakteri yang sangat rendah (Izwan dkk., 2013). Komponen non peroksida yang mempengaruhi aktivitas antibakteri yaitu metabolit sekunder dari madu. Dan metabolit sekunder tersebut dapat diketahui dengan uji fitokimia dari madu. Maka uji fitokimia dari madu dapat dilihat pada **Tabel 2** berikut:

**Tabel 2.** Hasil uji fitokimia ekstrak sarang madu dan madu (Idris, 2017).

Sampel	Uji Pendahuluan		
	Flavonoid	Asam fenolik	Tanin
Kantong Madu	+	+	+
Kantong Polen	+	+	+
Propolis	+	+	+
Kantong Telur	+	+	+
Madu	+	+	-



Microorganismes dalam madu berasal dari nektar dan serbuk sari, dari daerah  
 a. Mikroorganismes *sporulated* yang lebih sering ditemukan termasuk  
 tipe *Bacillus* Bakteri *non-sporulated* (*Micrococcus*, *Pseudomonas*,

*Flavobacterium*) kurang banyak, berasal dari organ bunga atau saluran pencernaan lebah. Jamur filamen, lebih menyebar di alam dan memiliki spora tahan termal, dengan kapasitas bertahan yang besar, bisa terdapat dalam madu bahkan oleh manusia, melalui debu, melalui instalasi air atau wadah atau bahkan oleh lebah melalui serbuk sari (Gillian dkk., 1983). Mikroba itu ditemukan dalam madu tidak berbahaya bagi kesehatan konsumen. Bahkan jika *Aspergillus flavus* ditemukan, tidak ada kondisi yang menguntungkan bagi aflatoksin. Kehadiran mikroorganisme pada madu terkadang dapat mempengaruhi kestabilan produk dan higienisnya kualitas (Maria dkk., 2010).

Menurut Maria dkk., (2010), Madu normal harus memiliki mikroorganisme patogen atau mikroorganisme yang menghasilkan penyakit enterik. Kontaminasi mikrobiologis selama atau setelah pengolahan madu ditunjukkan dengan tidak adanya mikroorganisme dalam sampel yang dikumpulkan dari sumber primer dan dengan adanya jenis bakteri tertentu (*Bacillus sp*) dan delapan jenis jamur (lebih sering *Candida*, *Aspergillus*, *Geotrichum* dan *Rhizopus*) pada sampel. Fakta ini menunjukkan kontaminasi dari sumber sekunder selama manipulasi dan proses sebelumnya. Kontaminasi dengan jamur dan bakteri menunjukkan kebersihan yang tidak memadai kondisi saat mengumpulkan, memanipulasi, memproses dan menyimpan (Joseps dkk., 2007).

Madu merupakan sumber karbohidrat kaya terutama akan fruktosa dan glukosa. Komposisi kimia dari madu bervariasi tergantung pada sumber tanaman, musim dan metode produksi. Oleh karena itu warna, konsentrasi dan senyawa tergantung pada sumber floranya. Senyawa lain yang dapat ditemukan termasuk protein dan asam seperti asam glukonat ( $C_6H_{11}O_7$ ), mineral sidan seperti hidrogen peroksida dan vitamin (B6 dan B12) (Yates, 1996).



Aktifitas antibakteri madu bergantung pada kombinasi dari aktivitas peroksida dan komponen non peroksida. Dua enzim penting yang diketahui berkontribusi pada aktifitas biologis utama madu adalah glukosa oksidase dan enzim katalase yang berasal dari bunga (White, 1963). Enzim ini sangat penting dalam menentukan tingkat dari aktifitas peroksida dalam madu yang mendasari banyak fungsi biologis termasuk potensi bakteri. Sejumlah besar glukosa oksidase aktif akan menghidrolisis glukosa untuk menghasilkan hidrogen peroksida yang menghasilkan stress oksidatif yang bermanfaat dalam mengendalkan koloni bakteri. Sebaliknya, tingkat katalase tinggi bersamaan dengan kapasitas antioksidan yang tinggi akan menghancurkan  $H_2O_2$  dan berfungsi dalam menjaga nilai gizi dari madu (Zainol dkk., 2013).

