

Kandungan fitokimia dan aktivitas antibakteri madu *Heterotrigona itama* yang ditenakkan pada areal tumbuhan kaliandra (*Calliandra culthrolysus*) terhadap bakteri *Escherichia coli*

Enos Tangke Arung^{1*}, Ari Tri Kusumaning Octaria Ardy¹, Syafrizal, Netty Maria Naibaho, Swandari Paramita,

¹ Laboratorium Kimia Hasil Hutan dan Energi Terbarukan, Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman

² Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman

³ Politeknik Pertanian Negeri Samarinda

⁴ Fakultas Kedokteran, Universitas Mulawarman

*E-Mail: tangkearung@yahoo.com

Artikel diterima : 17 Oktober 2023 Revisi diterima 12 Februari 2024

ABSTRACT

Heterotrigona itama honey is an alternative medicine that is often consumed directly. It is known to contain antiseptic compounds which can inhibit bacterial activity. The aim of this study was to investigate the potential of stingless bee honey (also known as kelulut) from Heterotrigona itama bees in the Calliandra plant area to inhibit the activity of Escherichia coli bacteria in six months period (October 2022 – March 2023). To test the antibacterial properties of honey, the agar diffusion method was used. This involved pouring nutrient agar media into a petri dish, allowing it to dry, making a hole in the substrate, and adding a bacterial suspension. Samples were intensively tested for six months, with chloramphenicol used as a positive control and aquades as a negative control. The results showed that stingless bee honey from Heterotrigona itama was effective in inhibiting the growth of Escherichia coli bacteria. The antibacterial properties of honey are influenced by the effect of predominant bioactive compounds.

Keyword: Antibacterial, E. coli, Heterotrigona itama, honey, six months

ABSTRAK

Madu Heterotrigona itama dikenal sebagai alternatif dalam pengobatan yang sering dijumpai dengan langsung dikonsumsi. Kemampuan madu dalam menghambat aktivitas bakteri karena mengandung senyawa antiseptik. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi madu lebah tanpa sengat (kelulut) Heterotrigona itama yang ditenakkan pada areal tumbuhan kaliandra dalam menghambat aktivitas bakteri Escherichia coli selama 6 bulan pengamatan (Oktober 2022 – Maret 2023). Penelitian ini menggunakan metode difusi agar untuk menguji sifat antibakteri madu. Prosedur ini meliputi penuangan media nutrient agar ke cawan petri dan dibiarkan mengering. Kemudian, dibuat lubang pada media dan ditambahkan suspensi bakteri. Dilakukan pengujian pada sampel secara intensif selama enam bulan. Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif dan aquades sebagai kontrol negatif. Hasil menunjukkan bahwa madu lebah tanpa sengat H. itama efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri E. coli. Sifat antibakteri madu dipengaruhi oleh efek senyawa bioaktif yang dominan.

Kata kunci: Antibakteri, E. coli, Heterotrigona itama, honey

PENDAHULUAN

Lebah *Heterotrigona itama* atau yang sering disebut lebah trigona memiliki ciri khas lebah tanpa sengat atau kelulut (*stingless bee*). Sarang lebah ini tetap dapat dipertahankan dari serangan predator karena memiliki propolis (Wicandra, 2019). Madu *H. itama* dikenal sebagai alternatif dalam pengobatan yang sering dijumpai dengan langsung dikonsumsi. Kebiasaan masyarakat yang kurang memperhatikan kebersihan lingkungan sering kali dapat menimbulkan berbagai gangguan kesehatan sehingga manfaat madu ini sangat membantu mengatasi permasalahan tersebut. Beberapa diantaranya yaitu infeksi primer pada usus seperti

diare dan infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* (Nor dkk., 2019). Kemampuan madu dalam menghambat aktivitas bakteri karena adanya kandungan senyawa antiseptik yaitu hidrogen peroksida (Huda dkk., 2013).

Tumbuhan kaliandra merupakan tanaman obat tradisional untuk mengobati berbagai infeksi. Ekstrak tumbuhan kaliandra memiliki aktivitas antimikroba salah satunya yaitu terhadap bakteri *E. coli* (Nvau dkk., 2020). Tumbuhan kaliandra yang memiliki potensi sebagai antibakteri ini yang kemudian dijadikan lebah *H. itama* sebagai pakan pokoknya. Adapun nektar diambil oleh lebah lalu disimpan dalam sarang dan menjadi bahan utama

produksi madu. Lebah sendiri memproduksi madu sebagai cadangan makanannya. Lebah *H. itama* diternakkan pada areal tumbuhan kaliandra untuk mengetahui seberapa efektif kemampuan madu dalam menghambat aktivitas bakteri khususnya pada bakteri *E. coli*.

METODE PENELITIAN

Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai dari pengambilan hingga pengujian sampel. Pengambilan sampel dilakukan di tempat budidaya lebah madu kelulut yaitu Desa Lubuk Sawah, Kelurahan Mugirejo, Kecamatan Sungai Pinang Kota Samarinda. Pengujian sampel dilakukan di Laboratorium Kimia Hasil Hutan dan Energi Terbarukan, Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah madu lebah kelulut *Heterotrigena itama*, larutan aquades, larutan dragendorff, asam klorida (HCL), natrium hidroksida (NaOH), asam sulfat (H₂SO₄), larutan kloroform, asam asetat (CH₃COOH), dan larutan molisch, nutrient agar, dan glucose dan bakteri *Escherichia coli*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, gelas beaker, sarung tangan, botol vial, spuit, kertas label, plastik wrapping, *aluminium foil*, *yellow dan blue tip*, spatula, kawat ose, penggaris, rak tabung, residu etanol, corong kaca, timbangan analitik, kapas, tabung reaksi, microtube, cawan petri, tabung reaksi, gelas beaker, erlenmeyer, micropipet, UV-vis spectrometer, autoclave, *laminar air flow cabinet*, *hot plate*, *incubator*, *cork borer*, dan *cutton swab*.

Prosedur Penelitian

Uji Fitokimia

Pada pengujian fitokimia sampel madu *H. itama* meliputi: uji alkaloid menggunakan pereaksi HCL dan dragendorff, uji flavonoid menggunakan pereaksi NaOH dan HCL, uji saponin menggunakan pereaksi aquades dan HCL, uji triterpenoid dan steroid menggunakan pereaksi CH₃COOH dan H₂SO₄, uji karotenoid menggunakan pereaksi kloroform dan H₂SO₄, uji kumarin menggunakan pereaksi NaOH dan alkohol, uji tanin menggunakan pereaksi CH₃COOH, dan uji karbohidrat menggunakan pereaksi Molisch dan H₂SO₄ (Syafrizal dkk., 2020).

Pembuatan Media

Pembuatan media agar menggunakan nutrient broth, glukosa, dan agar. Semua bahan tersebut

kemudian dihomogenkan dengan aquades dalam gelas beaker. Larutan media tersebut kemudian dipanaskan menggunakan hotplate sambil diaduk menggunakan spatula atau bisa juga menggunakan magnetic stirrer hingga mendidih kemudian dilakukan sterilisasi.

Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspense bakteri dilakukan dengan memasukkan aquades steril kedalam isolate bakteri kemudian kocok tabung tersebut. Larutan yang dihasilkan kemudian diuji menggunakan UV-vis spectrometer. Pengujian dilakukan berdasarkan standar Mc. Farland 0,5.

Pengujian Antibakteri

Penelitian ini menggunakan pengujian antibakteri yang mengacu pada (Saputra dkk., 2021) dengan sedikit modifikasi. Bakteri yang digunakan pada pengujian ini yaitu *Escherichia coli*. Media NA dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak ±20 ml dan dibiarkan hingga dingin (mengeras). Setelah media mengeras, suspensi bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri berisi media agar menggunakan mikropipet sebanyak 100 µl, kemudian dilabur menggunakan cotton swab steril hingga rata dan dibiarkan mengering. Sebanyak lima lubang sumuran dibuat pada media dengan menggunakan *cork borer steril* ukuran 5 mm.

Pengujian dilakukan dengan konsentrasi sampel 100% dengan kontrol positif berupa kloramfenikol (konsentrasi akhir 10 µg/well) diteteskan kedalam lubang sebanyak 20 µl, dan aquades 40% sebagai kontrol negatif diteteskan kedalam lubang sebanyak 20 µl. Setiap lubang diisi dengan masing-masing sampel sebanyak 20 µl. Ditutup rapat dan dibungkus dengan menggunakan plastik wrapping. Kemudian diinkubasi selama 18-24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C. Data hasil pengujian antibakteri dihitung berdasarkan rata-rata diameter dari tiga kali pengulangan dalam satuan mm, yang selanjutnya dibandingkan dengan kontrol positif. Zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ditunjukkan dengan zona bening yang tampak pada sekitar lubang sampel. Data hasil rata-rata dihitung dengan menentukan indeks aktivitas dan persen penghambatan semua sampel pada konsentrasi 100%, menggunakan rumus berikut (Nasri dkk., 2022):

Indeks aktivitas (AI) =

$$\frac{\text{rata - rata diameter zona hambat sampel}}{\text{rata - rata diameter zona hambat kontrol positif}}$$

$$\text{Persen Penghambatan} = \text{Indeks aktivitas} \times 100\%$$

Berdasarkan Greenwood (1995) klasifikasi respon penghambatan pertumbuhan bakteri adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Klasifikasi Respon Penghambatan Pertumbuhan Bakteri

Diameter Daerah Hambatan (DDH)	Respon Penghambatan Pertumbuhan
> 20 mm	Sangat Kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
< 5 mm	Lemah

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Fitokimia

Hasil pengujian *screening* fitokimia sampel madu *H. itama* pada setiap bulan pengujian menunjukkan adanya senyawa alkaloid, flavonoid, kumarin, tanin,

dan karbohidrat. Didapatkan pula senyawa saponin dan triterpenoid yang hanya terkandung dalam sampel pada bulan januari. Sedangkan senyawa steroid tidak ditemui pada semua sampel uji. Dari hasil pengujian antibakteri yang telah dilakukan didapatkan hasil sebagai berikut (Tabel 2):

Tabel 2. Fitokimia Madu *Heterotrigona itama* yang ditenakkan pada Areal Tumbuhan *Kaliandra* selama 6 Bulan

No.	Nama Sampel	Alk	Fla	Sap	Tri	Ste	Kar	Kum	Tan
1	Oktober 2022	+	+	-	-	-	-	+	+
2	November 2022	+	+	-	-	-	-	+	+
3	Desember 2022	+	+	-	-	-	-	+	+
4	Januari 2023	+	+	+	+	-	+	+	+
5	Februari 2023	+	+	-	-	-	-	+	+
6	Maret 2023	+	+	-	-	-	+	+	+

Ket: Alk(Alkaloid), Tri (Triterpenoid), Kum (Kumarin), Fla (Flavonoid), Ste (Steroid), Tan (Tanin), Sap (Saponin), Kar (Karotenoid)

Pengujian fitokimia yang dilakukan adalah pengujian secara kualitatif dengan pengamatan pada perubahan warna setelah diberikan pereaksi. Dapat diketahui dalam Tabel 2 terdapat beberapa senyawa bioaktif yang dominan. Senyawa tersebut yaitu alkaloid, flavonoid, kumarin, dan tanin yang ditemui pada madu tiap bulan. Saat ini belum ada yang melaporkan secara lengkap selama 6 bulan kondisi fitokimia dari propolis *H. itama*. Sarah dkk (2022), melaporkan bahwa fitokimia propolis *H. itama* yang diambil pada suatu waktu dari berbagai tempat didominasi oleh alkaloid, flavonoid dan kumarin. Perbedaan kualitas senyawa pada berbagai sampel berdasarkan bulan ini dapat dipengaruhi oleh kadar air maupun kadar gula yang berbeda. Ketika kandungan air dan keasaman madu meningkat, kualitasnya menurun. Namun, penurunan kandungan air juga menyebabkan penurunan kualitas gula madu. Madu yang mengandung lebih dari 17% air dan total kadar gula kurang dari 83% rentan terhadap fermentasi yang toleran terhadap yeast osmotoleran. Proses fermentasi ini dapat menyebabkan madu menjadi

fermen selama penyimpanan, menghasilkan rasa asam dan merusak madu. Perbedaan dalam rasio tingkat air antara sampel dari berbagai bulan ini dapat dipengaruhi oleh kedua elemen endogen dalam koloni lebah madu, seperti jumlah koloni, serta faktor eksogen meliputi faktor lingkungan dan antropogenik. Faktor lingkungan ini mengacu pada variasi kondisi iklim, musim, dan komposisi vegetasi yang tersedia bagi lebah untuk dijadikan pakan. Di sisi lain, faktor antropogenik mencakup pengolahan madu selama panen, kemasan, dan penyimpanan, serta praktik petani dalam menambahkan sirup langsung ke madu (Fatimah dkk., 2017). pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan pada

Analisis Antibakteri

Hasil pengujian antibakteri pada sampel madu *H. itama* menunjukkan aktivitas antibakteri dengan adanya pembentukan zona hambat pada sekitar lubang sumuran. Hasil pengukuran diameter zona hambat aktivitas bakteri *E. coli* dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Zona Hambat Madu *H. itama* terhadap Bakteri *E. coli*

No.	Sampel	Rataan (mm)	AI (Indeks Aktivitas)	Persen Hambatan (%)
1	Oktober	9,556	0,465	46,488

No.	Sampel	Rataan (mm)	AI (Indeks Aktivitas)	Persen Hambatan (%)
2	November	kloramfenikol (+)	20,556	46,742
			9,556	
3	Desember	kloramfenikol (+)	20,444	41,712
			8,667	
4	Januari	kloramfenikol (+)	20,778	47,516
			9,556	
5	Februari	kloramfenikol (+)	20,111	44,200
			8,889	
6	Maret	kloramfenikol (+)	20,111	45,055
			9,111	
		kloramfenikol (+)	20,222	

Pada Tabel 3 dapat diketahui bahwa sampel madu *H. itama* pada bulan Januari memiliki persen hambat paling tinggi yaitu 47,516% dengan rata-rata diameter zona hambat 9,556 mm. Adapun persen hambat paling rendah yaitu 41,71% pada sampel bulan desember dengan rata-rata diameter zona hambat 8,667 mm. Hal tersebut menunjukkan bahwa kemampuan madu *Heterotrigona itama* dalam menghambat aktivitas bakteri *Escherichia coli* tergolong dalam kategori sedang. Kontrol negatif yaitu aquades menunjukkan perbandingan bahwa sampel madu memiliki aktivitas antibakteri. Sedangkan kontrol positif berupa kloramfenikol berperan sebagai perbandingan karena bersifat antibiotik sintetis. Sandika dan Suwandi (2017) menyatakan bahwa Kloramfenikol menjadi pilihan sebagai kontrol positif karena efektif, murah mudah didapat, dan dapat diberikan secara oral.

Kemampuan madu dalam menghambat aktivitas bakteri ditandai dengan adanya daerah bening yang terbentuk disekeliling lubang sampel. Hal tersebut karena adanya pengaruh dari senyawa bioaktif yang terkandung dalam madu. Penelitian terdahulu yaitu menurut Munte dkk. (2016) menyatakan bahwa adanya senyawa yang dominan memberikan efek terhadap pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini ditemukan senyawa bioaktif yang dominan yaitu alkaloid, flavonoid, kumarin, tanin, dan karbohidrat. Kemampuan alkaloid dalam menghambat bakteri dengan cara kerja berupa merusak susunan penyusun peptidoglikan dan berujung pada kematian sel. Senyawa flavonoid memiliki sifat polar yang memudahkan madu *H. itama* untuk menembus lapisan peptidoglikan. Aktivitas flavonoid ini yang kemudian mengintervensi membran sitoplasma, penghambat sintetis pada asam nukleat, metabolisme energi, sintetis dinding sel, dan sintetis membrane sel (Tansil dkk., 2016). Kumarin merupakan senyawa bioaktif yang berpotensi dalam pembentukan pigmen kulit, mempengaruhi kerja enzim,

antimikroba dan menunjukkan aktivitas hambat karsinogen (Kuspradini dkk., 2016). Kandungan tanin dalam madu memberikan efek berupa reaksi dengan membrane sel, inaktivasi enzim, dan inaktivasi fungsi genetik (Pratiwi & Gunawan, 2018).

Aktivitas antibakteri madu dapat dipengaruhi oleh kemampuan lebah mencari makan. Tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai sumber makanan lebah merupakan penghasil nektar yang signifikan dalam memenuhi kebutuhan nutrisinya. Selain itu, hal ini tidak hanya berdampak pada komposisi kimia madu, tetapi juga mempengaruhi viskositasnya. Madu dengan kadar air yang lebih rendah menunjukkan kualitas yang lebih unggul, karena madu dengan kadar air yang lebih tinggi dapat mempercepat proses fermentasi, sehingga menambah kerugian yang ditimbulkan pada komponen madu (Mahani dkk., 2022).

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa membudidayakan madu pada areal kaliandra memiliki keuntungan signifikan, yaitu kemampuan untuk memperoleh hampir keseluruhan kandungan senyawa metabolit sekunder. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa kualitas senyawa paling optimal dapat ditemukan pada bulan Januari, sehingga melakukan panen pada periode tersebut dapat dianggap sebagai waktu yang cocok untuk memaksimalkan hasil budidaya madu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Fund Program for Welfare and Sustainable Economy of Indigenous Peoples and Local Communities (TERRA Fund) in collaboration with the Environmental Fund Management Agency and the Ford Foundation (Grant No: Kep-74/BPDLH/2023).

DAFTAR PUSTAKA

- Fatimah, I. I., Haryati, S., Widodo, S. (2017). Uji Kualitas Madu pada Beberapa Wilayah Budidaya Lebah Madu di Kabupaten Pati. *Jurnal Biologi*. 6(2): 58-65.
- Greenwood. (1995). *Antibiotics, Susceptibility (Sensitivity) Test Antimicrobial and Chemotherapy*. Mc. Graw Hill Company. USA.
- Huda, M. (2013). Pengaruh Madu Terhadap Pertumbuhan Bakteri Gram Positif (*Staphylococcus Aureus*) dan Bakteri Gram Negatif (*Escherichia Coli*). *Jurnal Analisis Kesehatan*. 2(2): 250-258.
- Kuspradini, H., Pasedan, F., Kusuma I. W. (2016). Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Daun *Pometia pinnata*. 1(1): 26-34.
- Mahani, M, Savitri S. R, Subroto E. (2022). Hubungan Kadar Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Madu dari Berbagai Provinsi di Indonesia. *Jurnal Sains dan Teknologi Pangan*. 7(4): 5255-5268.
- Munte, N., Sartini, & Lubis, R. 2016. Skrining Fitokimia Dan Antimikroba Ekstrak Daun Kirinyuh Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Biologi Lingkungan, Industri, Kesehatan*. 2(2): 138-139.
- Nasri, N., Kaban, V. E., Gurning, K., Syahputra, H. D., Satria, D. (2022). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya* Linn.) Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *INSOLOGI: Jurnal Sains dan Teknologi*, 1(3), 252-259. <https://doi.org/10.55123/insologi.v1i3.438>
- Nor, T. A., Indriarini, D., & Koamesah, S. M. J. (2019). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya* L) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* Secara In Vitro. *Collaborative Medical Journal (CMJ)*. 6(3): 327-337.
- Nvau, J. B., Alenezi, S., Ungogo, M. A., Alfayez, I. A. M., Natto, M. J., Gray, A. I., Ferro, V. A., Watson, D. G., de Koning, H. P., Igoli, J. O. (2020). Antiparasitic and Cytotoxic Activity of Bokkosin, A Novel Diterpene-Substituted Chromanyl Benzoquinone From *Calliandra portoricensis*. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.574103>
- Pratiwi, R. D., Gunawan, E. (2018). Antibacterial Activity Of Ethanolic Extract Of *Vernonia Amygdalina* Delile Leaves Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*. 15(2): 26-37.
- Sandika, J., & Suwandi, J. F. 2017. Sensitivitas *Salmonella thypi* Penyebab Demam Tifoid terhadap Beberapa Antibiotik. *Jurnal Majority*. 6(1): 41-45.
- Saputra, S. H., Saragih, B., Kusuma, I. W., Arung, E. T. (2021). Antioxidant and antibacterial screening of honey of *Heterotrigona itama* collected from different meliponiculture areas in East Kalimantan, Indonesia. *Nusantara Bioscience*, 13(2): 232-237.
- Dikarulin S. A., Listyaningrum D. A. D. Ananda, B. S., Putri, T. A., Amirta, R., Rosamah, E., Suinarti, W., Yuliansyah, Kusuma, I. W., Arung, E. T. (2022). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Propolis Lebah *Heterotrigona itama* Dari Beberapa Lokasi Budidaya Di Kalimantan Timur Terhadap Bakteri *Propionibacterium Acnes*. *Ulin - J Hut Trop* 6 (2) : 121-125
- Syafrizal, Ramadhan, R., Kusuma, I. W., Egra, S., Shimizu, K., Kanzaki, M., Arung, E. T. (2020). Diversity and honey properties of stingless bees from meliponiculture in East and North Kalimantan, Indonesia. *Biodiversitas* 21 : 4623-4630
- Tansil, A. Y. M., Nangoy, E., Posangi, J., Bara, R. A. (2016). Uji daya hambat ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*. 4(2). <https://doi.org/10.35790/ebm.v4i2.14344>.
- Wicandra, D. (2019). *Kiat Praktis Budidaya Lebah Trigona (Heterotrigona itama)*. Penerbit Laduny Aliftama. Lampung.