

**PERBANDINGAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI PADA MADU
HITAM DAN MADU HUTAN TERHADAP *Escherichia coli*
DENGAN TEKNIK DIFUSI AGAR**

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagai Syarat
Guna Memperoleh Sarjana S-1
dalam Ilmu Gizi



Oleh :

JULIETA WULANDARI

NIM : 1807026064

**PROGRAM STUDI GIZI
FAKULTAS PSIKOLOGI DAN KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG**

2022

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Julieta Wulandari

NIM : 1807026064

Program Studi : Gizi

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

“Perbandingan Aktivitas Antibakteri pada Madu Hitam
dan Madu Hutan terhadap *Escherichia coli* dengan Teknik
Difusi Agar”

Secara keseluruhan adalah hasil penelitian atau karya saya sendiri, kecuali bagian
tertentu yang dirujuk sumbernya.

Semarang, 10 September 2022

Pembuat Pernyataan



Julieta Wulandari

NIM. 1807026064

PENGESAHAN

Naskah skripsi ini :

Judul : Perbandingan Aktivitas Antibakteri pada Madu Hitam dan Madu Hutan terhadap *Escherichia coli* dengan Teknik Difusi Agar

Penulis : Julieta Wulandari

NIM : 1807026064

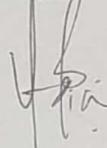
Program Studi : Gizi

Telah diujikan dalam sidang *munaqasyah* oleh Dewan Penguji Fakultas Psikologi dan Kesehatan UIN Walisongo Semarang dan dapat diterima sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana dalam Ilmu Gizi.

Semarang, Desember 2022

DEWAN PENGUJI

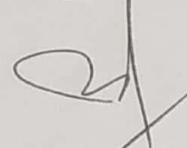
Penguji I



Dr. Dina Sugiyanti, S.Si., M.Si

NIP. 198408292011012005

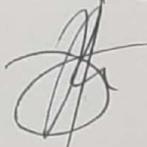
Penguji II



Dr. Widiastuti, M.Ag

NIP. 197503192009012003

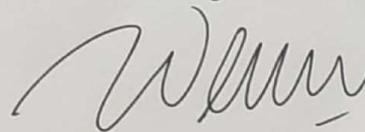
Pembimbing I



Nur Hayati, S.Pd., M.Si

NIP. 197711252009122001

Pembimbing II



Wenny Dwi K., S.T.P., M.Si

NIP. 199105162019032011

NOTA PEMBIMBING

Semarang, 16 September 2022

Kepada
Yth. Dekan Fakultas Psikologi dan Kesehatan
UIN Walisongo
Di Semarang

Assalamu 'alaikum Wr. Wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan, dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : Perbandingan Aktivitas Antibakteri pada Madu Hitam dan Madu Hutan terhadap *Escherichia coli* dengan Teknik Difusi Agar

Penulis : Julieta Wulandari

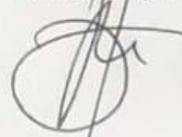
NIM : 1807026064

Program Studi : Gizi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Psikologi dan Kesehatan UIN Walisongo Semarang untuk diujikan dalam Sidang Munaqosyah.

Wassalamu 'alaikum Wr. Wb.

Pembimbing I,



Nur Hayati, S.Pd., M.Si

NIP. 197711252009122001

NOTA PEMBIMBING

Semarang, 20 September 2022

Kepada
Yth. Dekan Fakultas Psikologi dan Kesehatan
UIN Walisongo
Di Semarang

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan, dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : Perbandingan Aktivitas Antibakteri pada Madu Hitam dan Madu Hutan terhadap *Escherichia coli* dengan Teknik Difusi Agar

Penulis : Julieta Wulandari

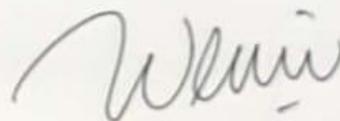
NIM : 1807026064

Program Studi : Gizi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Psikologi dan Kesehatan UIN Walisongo Semarang untuk diujikan dalam Sidang Munaqosyah.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Pembimbing II,



Wenny Dwi K., S.T.P., M.Si

NIP. 199105162019032011

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* yang telah melimpahkan banyak rahmat, nikmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi ini dengan baik. Sholawat dan salam selalu tercurahkan kepada Nabi agung Muhammad *Shallallahu 'Alaihi Wasallam* semoga kita semua senantiasa mendapatkan syafa'at Rasulullah di *Yaumul Qiyamah* kelak, *Aamiin*.

Skripsi dengan judul: Perbandingan Aktivitas Antibakteri pada Madu Hitam dan Madu Hutan terhadap *Escherichia coli* dengan Teknik Difusi Agar, telah selesai dengan penuh perjuangan sehingga telah sampai kepada penguji dan pembaca lainnya yang menjadi syarat kelulusan program Strata Satu Gizi di Fakultas Psikologi dan Kesehatan Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang.

Dalam tahap yang berkaitan dengan proses penyusunan naskah skripsi, tidak luput dari bantuan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak. Selesainya tahap skripsi ini, perkenankan penulis mengucapkan terimakasih yang mendalam dengan setulus hati kepada berbagai pihak yang sudah mendukung dan membantu selama proses penelitian serta penyusunan naskah skripsi. Ucapan terimakasih yang sangat mendalam dari penulis kepada:

1. Prof. Dr. Syamsul Ma'arif, M.Ag. selaku Dekan Fakultas Psikologi dan Kesehatan UIN Walisongo Semarang
2. Ibu Nur Hayati, S.Pd., M.Si. selaku pembimbing I yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga untuk memberikan bimbingan, arahan, nasihat, dan motivasi yang sangat membantu penulis
3. Ibu Wenny Dwi Kurniati., S.T.P., M.Si. selaku pembimbing II yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga untuk memberikan bimbingan, arahan, nasihat, dan motivasi yang sangat membantu penulis

4. Ibu Dr. Dina Sugiyanti, S.Si., M.Si. sebagai penguji I yang memberikan saran dan kritik yang membangun dan memberikan arahan serta solusi dalam proses penyempurnaan naskah skripsi ini
5. Ibu Dr. Widiastuti, M.Ag sebagai penguji II yang memberikan saran dan kritik yang membangun dan memberikan arahan serta solusi dalam proses penyempurnaan naskah skripsi ini
6. Segenap Dosen Program Studi Gizi Fakultas Psikologi dan Kesehatan UIN Walisongo yang telah memberikan ilmu yang luar biasa kepada penulis selama menempuh studi
7. Secara khusus penulis mengucapkan terimakasih kepada kedua orang tua penulis, Bapak Tri Yunarto dan Ibu Desi Setia Reni yang telah berjuang merawat, membesarkan, mendidik, memberikan do'a, dorongan, dan motivasi kepada penulis
8. Adik Bintang Adi Setiawan yang selalu memberikan semangat dan dukungan kepada penulis
9. Segenap keluarga besar dari penulis yang memberikan dukungan dan do'a kepada penulis
10. Pak Lestari yang telah memberikan izin dan membantu penelitian penulis serta memberikan dukungan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian
11. Teman teman kelas Gizi C dan senior program studi Gizi yang telah memberikan bantuan dan semangat kepada penulis
12. Sahabat-sahabat saya Nicol, Shafira, Alya, Gandhis, Yolla, Agni, Eca, Ririn, Yemi, Septi, dan Thomas yang sudah menjadi tempat keluh kesah, memberikan bantuan, dukungan, semangat, dan memberi nasihat serta do'a kepada penulis
13. Kepada berbagai pihak yang sudah membantu penulis selama menyusun naskah skripsi ini.

Penulis hanya dapat mengucapkan terima kasih dan mendoakan semoga mereka dibalas dengan kebaikan oleh Allah SWT. Naskah skripsi ini

tidaklah lepas dari suatu keterbatasan pengetahuan dan pengalaman dari penulis. Penulis berharap penelitian ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, pembaca, dan masyarakat luas.

Semarang, 10 September 2022

Julieta Wulandari
NIM. 1807026064

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN	ii
PENGESAHAN	iii
NOTA PEMBIMBING	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
BAB I : PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Hasil Penelitian	4
E. Keaslian Penelitian.....	5
BAB II : KAJIAN PUSTAKA	8
A. Landasan Teori	8
1. Keracunan Makanan	8
2. Diare.....	8
3. Bakteri <i>Escherichia coli</i>	9
4. Antibakteri	14
5. Metode Pengujian Antibakteri.....	14
6. Media Pertumbuhan Bakteri	16
7. Media <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA)	17
8. Madu	18
a. Definisi madu	18
b. Jenis Madu	19
c. Lebah Madu <i>Apis mellifera</i>	21

9. Madu Hitam	22
a. Komposisi dan Kandungan Madu Hitam	22
b. Manfaat Madu Hitam	23
c. Mekanisme Aktivitas Antibakteri pada Madu Hitam	24
10. Madu Hutan	24
a. Komposisi dan Kandungan Madu Hutan	25
b. Manfaat Madu Hutan	25
c. Mekanisme Aktivitas Antibakteri pada Madu Hutan.....	27
B. Kerangka Teori	27
C. Kerangka Konsep Penelitian.....	28
D. Hipotesis	29
BAB III : METODE PENELITIAN.....	31
A. Desain Penelitian	31
B. Variabel Penelitian.....	34
C. Lokasi dan Waktu Penelitian	35
D. Teknik Pengambilan Sampel	35
E. Definisi Operasional	36
F. Prosedur Penelitian.....	37
1. Pengumpulan Data.....	38
2. Instrumen Penelitian	38
3. Teknik Pengumpulan Data.....	39
G. Analisa Data	49
H. Alur Kerja Penelitian	50
BAB IV : HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	52
A. Gambaran Umum Lokasi Pengambilan Sampel dan Lokasi Penelitian	52
B. Deskripsi Subjek	53
C. Hasil dan Pembahasan	59
BAB V : KESIMPULAN DAN SARAN.....	77
DAFTAR PUSTAKA	79
LAMPIRAN.....	85

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
Tabel 1	Keaslian Penelitian	5
Tabel 2	Kandungan Madu Hitam	23
Tabel 3	Kandungan Madu Hutan	25
Tabel 4	Rancangan Penelitian Uji Aktivitas Antibakteri pada Madu	32
Tabel 5	Rancangan Penelitian Uji Aktivitas KHM	33
Tabel 6	Variabel Bebas	34
Tabel 7	Definisi Operasional	36
Tabel 8	Klasifikasi Zona Hambat Bakteri	60
Tabel 9	Rata-rata Diameter Zona Hambat Antibakteri pada Madu	63
Tabel 10	Perbandingan Aktivitas Antibakteri pada Madu	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
Gambar 1	Bentuk Bakteri <i>E. coli</i>	10
Gambar 2	Struktur Bakteri <i>E.coli</i>	11
Gambar 3	Identifikasi Bakteri <i>E.coli</i>	14
Gambar 4	Uji Aktivitas Antibakteri <i>E. coli</i> pada Media MHA	17
Gambar 5	Lebah <i>Apis mellifera</i>	22
Gambar 6	Kerangka Teori	28
Gambar 7	Kerangka Konsep	29
Gambar 8	Pemberian Cairan Madu pada Kertas Cakram	45
Gambar 9	Rancangan Metode <i>disc diffusion</i>	45
Gambar 10	Penurunan Konsentrasi Larutan	47
Gambar 11	Rancangan Uji KHM	47
Gambar 12	Alat Ukur Jangka Sorong Digital	48
Gambar 13	Skala Jangka Sorong Digital	48
Gambar 14	Rancangan Hasil Percobaan	49
Gambar 15	<i>Flowchart</i> Penelitian	51
Gambar 16	Peta Desa Kedawung	52
Gambar 17	Lebah Pekerja <i>Apis mellifera</i>	54
Gambar 18	Sampel Madu Hitam	56
Gambar 19	Pengambilan Sampel Madu Hitam	56
Gambar 20	Sampel Madu Hutan	58
Gambar 21	Pengambilan Sampel Madu Hutan	58
Gambar 22	Hasil Uji Aktivitas Antibakteri pada Cawan 1	60
Gambar 23	Hasil Uji Aktivitas Antibakteri pada Cawan 2	61
Gambar 24	Hasil Uji Aktivitas Antibakteri pada Cawan 3	62
Gambar 25	Hasil Uji Aktivitas Antibakteri pada Cawan 4	62
Gambar 26	Rata-rata Diameter Zona Hambat Antibakteri	64

Gambar 27	Rata-rata Diameter Zona Hambat Antibakteri Kontrol	65
Gambar 28	Rata-rata Zona Hambat Antibakteri Madu Hitam	67
Gambar 29	Rata-rata Zona Hambat Antibakteri Madu Hutan	70
Gambar 30	Uji KHM Madu Hitam	73
Gambar 31	Zona Hambat Antibakteri Uji KHM Madu Hitam	74
Gambar 32	Uji KHM Madu Hutan	74
Gambar 33	Zona Hambat Antibakteri Uji KHM Madu Hutan	75
Gambar 34	Rata-rata Diameter Zona Hambat Uji KHM Madu	75

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
Lampiran 1	Angket Wawancara dan Observasi	84
Lampiran 2	Pembuatan Larutan Konsentrasi Uji KHM	86
Lampiran 3	Hasil Uji Laboratorium	89
Lampiran 4	Hasil Uji SPSS	91
Lampiran 5	Dokumentasi Peneliti	92

ABSTRAK

Latar Belakang: Penyakit diare masih menjadi permasalahan kesehatan di Indonesia. Prevalensi tingginya penyakit diare di Indonesia dapat menyebabkan kematian. Penyakit diare dapat diakibatkan oleh infeksi bakteri salah satunya bakteri *E. coli*. Madu dapat dijadikan sebagai antibiotik untuk pengobatan alternatif penyakit diare. Madu kaya akan zat antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, antivirus, antidiabetes, dan antikanker. Madu hitam diduga memiliki potensi antibakteri yang dapat menyembuhkan penyakit diare. Madu hutan juga berpotensi memiliki efek antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri penyebab diare.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan aktivitas antibakteri madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.

Metode: Penelitian menggunakan uji eksperimental teknik *disc diffusion* dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variasi konsentrasi sampel madu yang diteliti sebesar 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20%, menggunakan kontrol positif antibiotik ciprofloxacin 500 mg dan kontrol negatif dengan aquades steril pengulangan ini dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan. Analisa data menggunakan uji *independent sample T-Test*.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas antibakteri madu hitam dan madu hutan terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* pada semua konsentrasi yaitu 100%, 80%, 60%, 40%, 20%. Zona hambat madu hitam dalam kategori kuat – sedang yaitu 12,45 mm – 6,26 mm. Konsentrasi terbesar madu hitam pada konsentrasi 100% dengan rata-rata zona hambat 12,45 mm. Hal ini membuktikan madu hitam dapat menghambat pertumbuhan *E. coli*. Zona hambat madu hutan dalam kategori sedang – lemah yaitu 9,25 mm – 3,23 mm. Konsentrasi terbesar madu hutan pada konsentrasi 100% dengan rata-rata zona hambat 9,25 mm. Hal ini juga membuktikan madu hutan dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) aktivitas antibakteri madu hitam pada konsentrasi 12,5% yaitu 2,07 mm. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) aktivitas antibakteri madu hutan pada konsentrasi 15% yaitu 1,96 mm.

Kesimpulan: Adanya perbandingan aktivitas antibakteri madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.

Kata Kunci: Antibakteri, *Escherichia coli*, Madu Hitam, Madu Hutan

ABSTRACT

Background: Indonesia still has a problem with diarrhea. The high incidence of diarrhea in Indonesia can result in death. *E. coli* is one of the bacteria that may cause diarrhea. Honey can be used as an alternative antibiotic to treat diarrhea illnesses. Honey compounds are antioxidants, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, anti-diabetic, and anticancer. Black honey has antibacterial properties that can treat diarrheal illnesses. Additionally, forest honey has the potential to suppress the growth of diarrhea-causing germs through an antibacterial impact.

Objective: This study intends to the comparison antibacterial of black honey and forest honey on the growth of *E. coli* bacteria.

Method: The research employed a experimental evaluation of the *disc diffusion* technique utilizing a Randomized Complete Block Design (CRD). Variations in the concentration of honey samples studied were 100%, 80%, 60%, 40%, and 20%, This was repeated twice using a positive control antibiotic of 500 mg ciprofloxacin and a negative control of sterile distilled water. In the examination of the data, the *T-test for independent samples* was utilized.

Result: The findings demonstrated that black honey and forest honey had antibacterial effects on *E. coli* bacterial growth at all doses, including 100%, 80%, 60%, 40%, and 20%. Black honey's inhibition zone fell into the strong-medium group, measuring 12.45 mm - 6.26 mm. With an average inhibition zone of 12.45 mm, the highest concentration of black honey was at 100% concentration. This demonstrates that black honey can suppress the growth of *E. coli*. The inhibition zone of forest honey fell into the category of moderate to weak, measuring 9.25 mm to 3.25 mm. The highest concentration of forest honey was at 100%, with an average inhibition zone of 9.25 millimeters. This also demonstrates that forest honey can prevent *E. coli* development. At a concentration of 12.5%, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of antibacterial activity in black honey is 2.07 mm. At a concentration of 15%, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of forest honey antibacterial activity was 1.96 mm.

Conclusion: There are to the comparison antibacterial of black honey and forest honey on the growth of *E. coli* bacteria.

Keyword: Antibacterial, *Escherichia coli*, Black Honey, Forest Honey

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Keracunan makanan menjadi keadaan diidentifikasi dengan mual, muntah, ataupun diare sesudah mengonsumsi makanan. Data dari BPOM tahun 2019, setidaknya di Indonesia terjadi kasus keracunan pangan nasional per tahunnya sebanyak 20 juta kasus (Dwinanda, 2019: 1). Kasus keracunan makanan berasal dari bahan baku yang telah terkontaminasi selama proses pengolahan. Terjadinya kontaminasi sebelum pengolahan makanan berasal dari penanganan yang salah selama distribusi berlangsung (Rahayu *et al.*, 2018: 41-42). Kontaminasi tersebut berasal dari bakteri atau toksin di dalam makanan. Salah satu bakteri patogen penyebab kontaminasi makanan yaitu bakteri *Escherichia coli*.

Escherichia coli (*E. coli*) termasuk bakteri gram negatif memiliki persebarannya sangat luas. Bakteri *E. coli* dapat dijumpai dalam tanah, air, hingga saluran pencernaan manusia dan hewan. Liu (2019: 2) menjelaskan beberapa *strain* bakteri *E. coli* bersifat patogen dan menyebabkan penyakit. Walaupun terdapat *strain E. coli* komensal yang tidak berbahaya. Beberapa galur bakteri *E. coli* menghasilkan racun yang merugikan tubuh hingga mengakibatkan diare akut seperti diare bercampur darah nutrisi (Rahayu *et al.*, 2018).

Diare merupakan gejala penyakit dengan perubahan frekuensi buang air besar, konsistensi feses, dan gerak peristaltik pada usus (Chandler, 2011: 113). Penyakit diare menjadi permasalahan kesehatan yang utama di negara berkembang. Diare menjadi penyakit infeksi menular yang dapat menyebabkan kematian. Data Riskesdas 2018 menunjukkan prevalensi periode diare untuk seluruh kelompok usia di Indonesia sebesar 6,8%. Kelompok usia paling tinggi mengalami diare yaitu kelompok usia 1 tahun hingga 4 tahun sebesar 11,5% dan persentase 9% pada bayi. Kelompok lansia dengan prevalensi tinggi didominasi dengan usia 75

tahun dengan persentase 7,2% (Primadi, 2020: 164). Sehingga angka kontaminasi patogen yang berasal dari produk makanan masih cukup tinggi. Bakteri patogen yang dapat menyebabkan diare yaitu *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* dan *E. coli*.

Penatalaksanaan pengobatan diare dengan memberikan antibiotik serta cairan tubuh yang cukup agar tidak dehidrasi (Amin, 2015: 206). Antibiotik yang diberikan secara tidak tepat dapat meningkatkan risiko resistensi hingga multiresistensi. Naibaho (2018: 1) menerangkan jika bakteri pemicu diare telah resisten terhadap beberapa jenis antibiotik. Resistensi pada antibiotik menyebabkan pencarian alternatif antibiotik, seperti antibiotik dari bahan alami. Madu menjadi salah satu antibiotik dari bahan alami.

Puspitasari (2007) menjelaskan madu merupakan zat kental yang dihasilkan dari lebah madu (genus *Apis* sp). Indonesia memiliki beragam variasi madu, antara lain madu hitam, madu hutan, madu kelengkeng, dan madu jenis lainnya. Indonesia memproduksi madu yang paling banyak dijumpai adalah madu hutan sebanyak 70% dan sisanya dihasilkan dari madu peternak (Pribadi & Wiratmoko, 2019: 186).

Madu kaya akan aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, antivirus, antidiabetes, dan antikanker (Rao *et al.*, 2016: 657). Winen *et al* (2014: 377) menjelaskan bahwa madu memiliki senyawa antioksidan seperti fenol dan komposisi lain seperti komponen peroksida, non-peroksida, viskositas kental, dan pH. Senyawa tersebut menghambat laju pertumbuhan bakteri. Aktivitas antibakteri berasal dari tekanan osmotik, derajat keasamaan, hidrogen peroksida, dan senyawa antioksidan (Rahmah, 2021: 62). Selain itu, mengonsumsi madu secara rutin dapat menambah stamina dan nutrisi di dalam tubuh.

Masing-masing jenis madu mempunyai warna, rasa, dan aroma yang berbeda. Asal Perbedaan tersebut dari nektar yang dikumpulkan oleh lebah. Penelitian yang akan dilakukan lebih fokus menggunakan madu hitam dan madu hutan. Madu hitam mempunyai warna yang lebih gelap

dibandingkan dengan madu jenis lain serta mempunyai rasa yang pahit. Warna hitam berasal dari karakteristik tumbuhan sumber nektar. Rasa pahit yang dihasilkan berasal dari nektar bunga pahit. Fitriyaningsih (2014) menyatakan aktivitas antibakteri yang dimiliki madu hitam pahit lebih besar dibandingkan jenis madu lainnya. Kandungan fenol total yang lebih tinggi berasal dari madu dengan warna yang lebih gelap dibanding dengan madu yang berwarna terang (Boukraâ, 2013). Madu hutan berasal dari madu yang diproduksi oleh lebah liar yang bersumber dari nektar madu hutan tropis Indonesia. Terdapat antibiotik alami pada madu hutan yang dihasilkan dari lebah liar sehingga bermanfaat untuk kesehatan (Cunha *et al.*, 2020: 80).

Sun (2019) melakukan penelitian uji aktivitas antibakteri madu hutan terhadap pertumbuhan *E. coli* menunjukkan hasil bahwa terdapat pengaruh madu hutan terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Apriyani (2021) meneliti tentang aktivitas antibakteri madu hitam pahit dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* bahwa madu hitam pahit memiliki aktivitas antibakteri dibuktikan dalam kemampuan madu menghambat pertumbuhan *E. coli*. Berdasarkan pernyataan tersebut dapat dilihat belum adanya penelitian mengenai perbandingan uji aktivitas antibakteri pada madu hitam dan madu hutan terhadap *E. coli*. Peneliti tertarik untuk menguji aktivitas antibakteri antara madu hitam dengan madu hutan dalam penyembuhan dan pencegahan penyakit akibat bakteri *E.coli*.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah yang akan diteliti sebagai berikut :

1. Apakah terdapat perbandingan aktivitas antibakteri antara madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* ?
2. Berapakah variasi konsentrasi dari madu hitam dan madu hutan yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* ?

3. Berapakah konsentrasi hambat minimum pada madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* ?

C. Tujuan Penelitian

Berkaitan perumusan masalah tersebut, tujuan penelitian sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui perbandingan aktivitas antibakteri madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.
2. Untuk mengetahui variasi konsentrasi madu hitam dan madu hutan yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.
3. Untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum pada madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.

D. Manfaat Hasil Penelitian

Berlandaskan tujuan penelitian yang akan dicapai, penelitian yang hendak dilakukan dapat mempunyai manfaat baik secara langsung atau tidak langsung. Maka manfaat penelitian ini sebagai berikut :

1. Manfaat Teoritis:
 - a) Memberikan kontribusi ilmiah pada kajian tentang aktivitas antibakteri pada madu hitam dan madu hutan terhadap bakteri *E. coli*.
 - b) Memberikan kontribusi ilmiah pada kajian tentang analisis aktivitas antibakteri yang paling aktif antara madu hitam dan madu hutan terhadap bakteri *E. coli*.
2. Manfaat Praktis:
 - a) Memberi referensi dan ilmu pengetahuan baru bagi peneliti dalam bidang ilmu pangan.
 - b) Memberi informasi kepada masyarakat sebagai bahan pertimbangan dalam pemilihan madu sebagai obat alternatif alami.

E. Keaslian Penelitian

Penelitian tentang uji aktivitas antibakteri pada madu terhadap bakteri sebelumnya sudah banyak dilakukan. Sepanjang penelusuran yang sudah dilakukan oleh peneliti belum menemukan riset yang sama dengan penelitian yang akan peneliti lakukan. Kajian keaslian penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Keaslian Penelitian

No.	Nama Peneliti, Judul, dan Tahun	Metode Penelitian			Hasil
		Desain Penelitian	Variabel	Sampel Penelitian	
1.	Dian Maximiliany Sun, Desi Indria Rini, Rr Listyawati Nurina, Uji Aktivitas Antibakteri Larutan Madu Hutan terhadap Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> secara <i>In Vitro</i> , 2019.	<i>Eksperimental</i>	Variabel Bebas : Konsen trasi Madu Variabel Terikat : Diameter Zona Hambat Madu Hutan Pertum buhan Bakteri <i>E. coli</i>	Madu Hutan, Bakteri <i>Escherichia coli</i>	Madu hutan memiliki aktivitas antibakteri. Konsentrasi 10% dan 20% tergolong lemah, konsentrasi 40% dan 60% tergolong sedang, konsentrasi 80% tergolong kuat, dan konsentrasi 100% tergolong sangat kuat.
2.	Krisyanella, Zamharira Muslim, Resva Meinisasti, Screening Fitokimia dan Penetapan Potensi Madu Hutan sebagai Agen	<i>Eksperimental</i>	Variabel Bebas : Jenis Madu Hutan Variabel Terikat : Kan dungan Fitokimia Madu,	Madu Hutan Bengkulu, Bakteri <i>Propionil Bacter acne</i> , Bakteri <i>Staphylo coccus aureus</i>	Semua sampel madu hutan asli bengkulu memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri <i>Propionil Bacterium</i>

No.	Nama Peneliti, Judul, dan Tahun	Metode Penelitian			Hasil
		Desain Penelitian	Variabel	Sampel Penelitian	
	Antibakteri terhadap Bakteri <i>Propionibacterium acne</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> , 2021.		Diameter Daya Hambat Madu terhadap Bakteri, Konsen trasi Hambatan Minimum		<i>acne</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> .
3.	Ria Khoirunnisa Apriyani, Sindi Cantika, Uji Aktivitas Antibakteri Madu Hitam Pahit dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri <i>Escherichia coli</i> di Laboratorium Analisis Kesehatan Politeknik Piksi Ganesha Bandung, 2021.	Deskriptif Eksperimental dan Rancangan Acak Lengkap (RAL)	Variabel Bebas : Konsen trasi Madu Variabel Terikat : Diameter Zona Hambat Madu Hitam Pahit pada Pertumbuhan Bakteri <i>E. coli</i>	Madu Hitam Pahit, Bakteri <i>Escherichia coli</i>	Madu hitam pahit memiliki potensi sebagai antibakteri untuk menghambat pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> .
4.	Siti Aisyah Ratna Putri, FX Haryanto Susanto, Sabrina Handayami Tambun, Uji Aktivitas Antibakteri pada Macam-macam Madu pada Bakteri	<i>Eksperimental</i>	Variabel Bebas : Konsen trasi madu Variabel Terikat : Diameter Zona Hambat Bakteri, Kadar Hambat	Madu Randu, Madu Mente, Madu Rambutan, Madu Sono, Madu Akasia, Madu Karet, Bakteri <i>Escherichia</i>	Semua madu yang diujikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri serta memiliki hasil nilai KHM dan KBM.

No.	Nama Peneliti, Judul, dan Tahun	Metode Penelitian			Hasil
		Desain Penelitian	Variabel	Sampel Penelitian	
	<i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> dengan Metode Difusi Agar dan Dilusi Cair, 2022.		Minimum , Kadar Bunuh Minimum	<i>coli</i> , Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	

Pada tabel keaslian penelitian terdapat perbedaan penelitian yang akan dilakukan peneliti dengan penelitian sebelumnya. Hal tersebut terletak pada variabel dan sampel yang akan diujikan. Fokus variabel yang akan diteliti yaitu variasi konsentrasi madu hitam dan madu hutan, diameter zona hambat yang terbentuk madu hitam dan madu hutan terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*, dan jumlah koloni bakteri yang terbentuk untuk menilai KHM pada madu hitam dan madu hutan. Sampel yang diujikan menggunakan madu hitam dan madu hutan.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. Landasan Teori

1. Keracunan Makanan

Keracunan makanan menjadi suatu penyakit yang terjadi setelah mengonsumsi makanan yang memiliki racun. Makanan yang beracun berasal dari bahan makanan yang mengalami pembusukan makanan atau kontaminasi bakteri (Arisman, 2009: 2). Keracunan makanan disebabkan dari pencemaran bahan makanan, mikroba, bakteri, virus, kapang, dan kontaminasi zat kimia yang masuk ke dalam tubuh. Arisman (2009: 2) menjelaskan gejala yang muncul akibat keracunan makanan seperti mual, muntah, sakit perut, hingga diare.

2. Diare

Diare adalah feses yang keluar dalam frekuensi melebihi tiga kali sehari dengan perubahan konsisten feses lembek, dengan atau tanpa munculnya darah dan lendir (Depkes RI, 2011). Sebagian besar diare diakibatkan dari cemaran dan *higienitas* makanan yang kurang terjaga. Diare dapat diklasifikasikan penyakit yang berbahaya karena hingga mengakibatkan kejadian luar biasa (KLB) seperti kematian. Indonesia diare masih menjadi penyakit endemis. Agus & Joko (2021: 2) menerangkan jika insiden kasus diare secara nasional mencapai 270/1.000 penduduk sehingga masih menjadi sorotan dunia kesehatan Indonesia.

Jenis diare diklasifikasi menjadi 3, yakni diare dengan dehidrasi berat, diare dehidrasi ringan, diare tanpa dehidrasi. Penyebab diare datang dari hormon usus yang memproduksi hormon yang berlebihan, asam lemak dan empedu mengalami penurunan kapasitas reabsorpsi, dan toksin bakteri (Abidin, 2018: 39).

Toksin bakteri penyebab penyakit diare salah satunya berasal dari bakteri *E. coli*. Daya penetrasi *E. coli* dapat mendegradasi hingga merusak sel mukosa yang menghasilkan racun yang dapat mempengaruhi sekresi cairan di usus sehingga kemampuan rekat bakteri di dalam usus menjadi meningkat. Huda (2013: 251) menjelaskan selain penyakit diare, bakteri *E. coli* mengakibatkan infeksi lain seperti infeksi saluran kemih, meningitis, dan sepsis.

Shigella berasal dari *enteroinvasive* bakteri *E. coli* dapat mengakibatkan diare disentri. Syahrurachman (1994: 197) menyatakan dalam bukunya bahwa bakteri menempel pada sel mukosa dapat menimbulkan kerusakan sel sehingga lapisan mukosa menjadi lepas. Bakteri *E. coli* pada manusia bersifat verotoksigenik berupa gejala tinja bercampur dengan darah. Ciri khusus pada diare disentri *enteroinvasive E. coli* bentuk tinja menjadi cair dan mengandung darah, mukus, dan pus.

3. Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri berasal dari kata latin yaitu *bacterium* atau *bacteria* yang berarti sekumpulan organisme yang tidak mempunyai membran inti sel. Bakteri *E. coli* memiliki kemampuan dapat beradaptasi di berbagai habitat. Adapun bersifat parasit dan hidup secara bebas. Bakteri berkembang biak dengan membelah diri untuk memperbanyak populasinya. Syahrurachman (1994: 195) menjelaskan bakteri *E. coli* termasuk bakteri patogen oportunistik yang biasa dijumpai dalam kolon sebagai mikroflora normal.

a) Karakteristik dan Klasifikasi Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *E. coli* tergolong bakteri *coliform* dalam famili *Enterobacteriaceae*. Famili ini dapat bertahan hidup dalam saluran pencernaan. Ukurannya 1,00 - 1,50 μm x 2,00 - 6,00 μm , motil atau tidak motil, dapat berkembang tanpa oksigen atau terdapat oksigen, dan dapat hidup dalam media yang miskin nutrisi (Rahayu *et al.*,

2018: 5). Dwidjoseputro (2010: 121) menjelaskan karakteristik yang dimiliki oleh bakteri dengan famili *Enterobacteriales* termasuk dalam ordo paling besar berbentuk batang pendek dan bergerak dengan flagel.

Menurut Songer (2005) klasifikasi bakteri *E. coli* sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Filum	: <i>Proteobacteria</i>
Kelas	: <i>Gamma proteobacteria</i>
Ordo	: <i>Enterobacteriales</i>
Famili	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

E. coli tidak menghasilkan spora, berbentuk batang, berflagel, oksidase negatif, dan dapat memfermentasi karbohidrat dengan memproduksi asam dan gas (Gillespie & Hawkey, 2006). Bakteri *E. coli* berbentuk seperti *coccobasil* dengan ukuran 0,40 - 0,70 μm x 1,40 μm , tidak mempunyai nukleus, motil, tergolong organel eksternal maupun sitoskeleton selain itu mempunyai vili sebagai organel eksternal. Prestianti (2017: 20) menerangkan jika bakteri *E.coli* dapat hidup dalam suhu paling optimal pada 37 °C dan dapat menghasilkan gas serta kemampuan dalam memfermentasi laktosa.

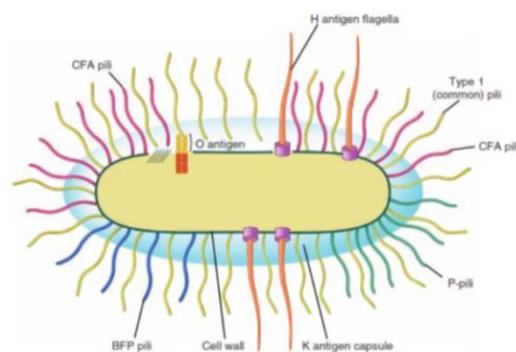


Gambar 1. Bentuk Bakteri *E. coli*

Sumber : Anggreini, 2015

b) Struktur Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *E. coli* mengandung nukleoprotein di dalam sitoplasma yang mengelilingi membran sel. Dinding sel menutupi membran sel dengan berlapis flagel dan pili (Budiyanto, 2002). Quinn *et al.* (2002) menyatakan terdapat tiga struktur utama dalam *E. coli* seperti dinding sel, kapsul, dan flagel. Terdapat 150 tipe antigen O pada bakteri *E. coli*, 90 tipe antigen K, dan 50 tipe antigen H. Penyakit infeksi saluran kemih dan diare termasuk dalam penyakit spesifik yang berhubungan dengan antigen O. Struktur dinding sel bakteri *E. coli* terdapat antigen somatik yang diklasifikasikan sebagai antigen O terdiri atas lipopolisakarida yang memiliki sifat pirogen dan menghasilkan endotoksin. Kapsul pada bakteri *E. coli* dikenal sebagai antigen K untuk melindungi membran luar dari fagositik yang berupa polisakarida. Antigen H diklasifikasikan sebagai flagelar *E. coli*. Spesifikasi antigen dapat ditentukan dari rantai karbohidrat. Seperti antigen F atau *proteinaceous fimbriae* memiliki fungsi sebagai pelekat pada permukaan mukosa. Faktor penyebab bakteri *E. coli* dapat mempertahankan diri terhadap inangnya disebabkan adanya *enterotoksin*, *hemolisin*, *kolkisin*, molekul yang memikat besi, dan *siderophore*.



Gambar 2. Struktur Bakteri *E. coli*

Sumber : Ryan KJ, Ray CG, 2014

c) Patogenesis

Bakteri *E. coli* dihubungkan terhadap penyakit diare karena *enteropathogenic* pada *E. coli* dapat mengakibatkan penyakit tersebut. *Enterotoxigenic E. coli* mengakibatkan diare sekretorik seperti kolera. Strain pada bakteri ini mengeluarkan toksin LT atau ST. Antigen F mengakibatkan bakteri melekat pada mukosa lalu bakteri mengeluarkan toksin (Syahrurachman, 1994: 197). *E. coli* dapat ditemukan dalam kolon dan tidak menimbulkan gangguan jika jumlahnya normal. Wardhana (2014: 15) menerangkan *E. coli* mampu menimbulkan penyakit terhadap inangnya bila dalam keadaan tidak normal. Bakri (2015: 184) menjelaskan manusia dapat terinfeksi bakteri *E. coli* jika berkontak langsung dengan hewan terinfeksi atau mengonsumsi makanan yang tidak mengalami proses pasteurisasi. Jawetz (2008, 150) menerangkan bakteri *E. coli* dapat menyebabkan penyakit lain seperti:

1) *Escherichia coli enteropatogenik* (EPEC)

EPEC menjadi pemicu diare cair yang kerap terjadi pada balita namun dapat sembuh dengan sendirinya. EPEC menempel pada sel mukosa usus dapat menimbulkan hilangnya mikrovili. Sehingga mengganggu proses penyerapan tubuh kemudian terjadi diare.

2) *Enteroinvasif Escherichia coli* (EIEC)

EIEC memiliki persamaan seperti *Shigella* dalam hal respon biokimia. EIEC melakukan penetrasi di mukosa usus besar sehingga menyebabkan kerusakan jaringan mukosa. Kerusakan ini dapat menimbulkan penyakit diare dengan gejala yang mirip dengan disentri.

3) *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC)

EAEC penyebab diare kronis dan kronik dengan jangka waktu lama yakni lebih dari 14 hari. EAEC menghasilkan

enterotoksin yang melekat pada lumen mukosa usus. Racun tersebut menyebabkan diare pada anak-anak.

4) *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC)

EHEC menjadi penyebab radang usus dan diare ringan. EHEC memproduksi sitotoksin yang dapat menimbulkan infeksi hingga pendarahan di usus. EHEC disalurkan melalui makanan yang disajikan dengan tidak bersih atau melalui penularan secara langsung.

d) Pemeriksaan Laboratorium

Identifikasi bakteri *E. coli* dapat menggunakan media dan metode yang disesuaikan pemeriksaannya. Metode khusus digunakan untuk mendeteksi sebagian dari galur *E. coli* patogen, misalnya mengidentifikasi toksin yang dihasilkan *E.coli*. Perbenihan dilakukan dengan mengisolasi bakteri menggunakan media *Endo agar*, *Eosin Methylene Blue* (EMB), dan *MacConkey agar*. Inkubasi 24 jam dengan suhu 37 °C. Koloni-koloni berkembang pada perbenihan diperiksa dan diambil sekurang-kurangnya tiga koloni bakteri *E. coli*. Lalu suspensi diberi serum anti OB polivalen. Rahmawati (2021: 30) menyatakan jika terdapat reaksi aglutinasi positif maka dapat diidentifikasi sementara dari bakteri *E. coli*.

Bakteri *E. coli* menunjukkan adanya hasil tes positif terhadap *indole*, *lysine dekarboksilase*, memfermentasi manitol, dan menghasilkan gas dari glukosa. Hasil dari penelitian Nuraini *et al* (2020: 109) menunjukkan isolasi dalam air minum yang tumbuh dari media EMB menunjukkan warna yang khas seperti *metallic sheen* menunjukkan adanya identifikasi dari bakteri *E. coli*.



Gambar 3. Identifikasi Bakteri *E. coli* pada Media EMB
Sumber : Juwita, Usna, Jose, Christine, 2014

4. Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu senyawa yang memiliki fungsi sebagai pengendali dan mematikan bakteri yang merugikan. Pengendalian dengan antibakteri sebagai pencegahan yang ditimbulkan dari penyebaran infeksi lebih meluas. Ditinjau dari daya kerjanya, antibakteri mampu menghambat pertumbuhan bakteri hingga membunuh bakteri (Ganiswarana, 1995). Firmansyah *et al* (2016: 140) menjelaskan senyawa antibakteri menghambat pertumbuhan bakteri dengan dua cara, yaitu dengan merusak membran sel dan mengubah permeabilitas sehingga pertumbuhan sel dapat sampai sel mati dan menyebabkan protein terurai menjadi struktur primernya (denaturasi).

5. Metode Pengujian Antibakteri

Metode difusi sering digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri pada *Escherichia coli*. Untuk metode difusi Abidin (2018: 47-48) menerangkan cara yang digunakan dalam melakukan metode difusi yaitu dengan metode *disk difusi*, *E-test*, *ditch-plate technique*, dan *cup-plate technique*.

a. Metode *disk diffusion*

Metode sering disebut metode cakram. Metode ini dengan ditanami sampel bakteri pada media agar. Kemudian paper disk yang telah diisi senyawa antibakteri diletakan pada media agar. Kemudian dilakukan pengamatan pada area jernih yang mengidentifikasi

adanya hambatan pada pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri.

b. Metode *E-test*

Konsentrasi minimal pada senyawa antibakteri digunakan sebagai estimasi Kadar Hambat Tumbuh Minimum (KHTM) bakteri. Metode ini menggunakan senyawa antibakteri yang terkandung dalam strip plastik dari tingkat rendah ditempatkan dalam permukaan media agar yang ditanami bakteri.

c. Metode *ditch-plate technique*

Mengidentifikasi bakteri dengan memasukan sampel bakteri pada senyawa antibakteri pada media agar yang telah dibuat parit lalu digoreskan. Parit dibuat membujur dengan memotong bagian tengah pada media agar.

d. Metode *cup-plate technique*

Hampir sama dengan metode *disk diffusion*, perbedaan terletak pada media agar dibuat lubang seperti sumur. Kemudian bakteri uji diletakan pada sumuran yang telah diberi senyawa antibakteri. Menurut Pratiwi (2018: 190) KHM merupakan konsentrasi minimal pada suatu antibakteri dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Prosedur yang digunakan dengan menentukan konsentrasi antibiotik yang masih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri dalam mengontrol infeksi. Inokulum bakteri sudah terstandarisasi ditambahkan dalam tabung yang mengandung seri antibiotik yang sudah diencerkan dan pertumbuhan bakteri dimonitoring dengan perubahan kekeruhan. KHM dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti metode dilusi dan metode difusi.

6. Media Pertumbuhan Bakteri

Media memiliki komposisi campuran nutrisi yang digunakan sebagai pertumbuhan bakteri. Terdapat komponen menghambat pertumbuhan bakteri dan kadar yang tinggi menjadi racun seperti asam lemak, gula, dan lain-lain (Widayanti, 2016: 15). Media kultur mikroba digunakan sebagai isolasi, pembiakan, pengujian, dan perhitungan jumlah mikroorganisme. Pratiwi (2017) menyebutkan media dibedakan menjadi tiga yakni bentuk, susunan, sifatnya:

a. Menurut bentuknya

- 1) Media padat, media yang ditambahkan 12-15 gram tepung agar/1000 ml media.
- 2) Media cair, media yang tidak terdapat zat pematat.
- 3) Media semi padat, media yang ditambahkan 50% zat pematat..

b. Menurut susunannya

- 1) Media alami, terbuat dari komposisi bahan alami.
- 2) Media sintesis, tersusun dari senyawa kimia.
- 3) Media semi sintesis, terdiri atas bahan alami dan bahan kimia.

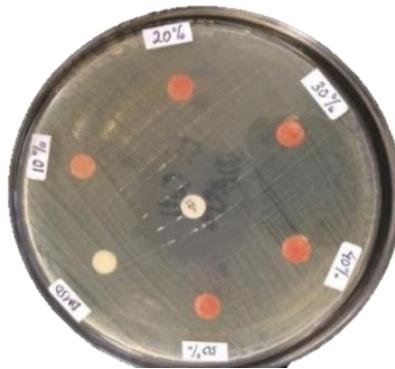
c. Menurut sifatnya

- 1) Media universal, media yang digunakan untuk menumbuhkan berbagai macam mikroorganisme. Misalnya media BHIB.
- 2) Media kaya, media khusus untuk mendapatkan pertumbuhan mikroorganisme tertentu. Misalnya media *Nutrient Agar* (NA).
- 3) Media selektif, media untuk menyeleksi kelompok bakteri dari kelompok bakteri yang lain berdasarkan kemampuan untuk tumbuh dalam media. Misalnya media *Manitol Salt Agar* (MSA).
- 4) Media diferensial, media yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme tertentu sesuai sifatnya. Misalnya media gula-gula.

- 5) Media eksklusif, media yang hanya mikroorganisme tertentu yang dapat hidup. Misalnya media *Bacillus Cereus Selective Agar Base* (BCSAB).
- 6) Media pengujian, media yang digunakan untuk menguji sifat khusus mikroorganisme. Misalnya media *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Arianda, 2016: 33-68).

7. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Pratiwi (2017: 14) menjelaskan media MHA menjadi media paling baik dalam menguji sensitivitas bakteri menggunakan metode difusi agar dengan cara *Kirby-Bauer*. Media yang ditemukan oleh Mueller dan Hinton di tahun 1941. Komposisi dari media *Mueller Hinton Agar* berupa *beef extract* 2 gram, Acid Hydrolysate of Casein 17,5 gram, Starch 1,5 gram, agar 17 gram, dan aquades 1 liter. Uji aktivitas antibakteri pada media MHA dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4 Uji Aktivitas Antibakteri *E. coli* pada Media MHA

Sumber : Utomo *et al.*, 2018

Atmojo (2016: 1) menyebutkan keunggulan media MHA dalam uji sensitivitas bakteri karena :

- 1) Semua mikroba dapat berkembang pada media ini karena tidak termasuk media selektif dan media diferensial.
- 2) Dapat menyerap racun dari bakteri sehingga tidak mengganggu antibiotik.

- 3) Rendahnya kadar *sulfonamide*, *trimethoprim*, dan *tetracycline inhibitors*.
- 4) Mendukung pertumbuhan bakteri patogen non-fastidious.
- 5) Terdapat banyak data dan penelitian uji sensitivitas dengan media ini.

8. Madu

a. Definisi madu

Madu merupakan cairan kental berasal dari bahan alami memiliki rasa khas manis didapat dari lebah madu yang mengambil sari bunga tanaman atau bagian lain dari tanaman. Komposisi dalam madu yakni air (17,2%), zat gula (81,3%), dan beberapa asam amino, vitamin, mineral, enzim, hormon, zat bakterisida, serta zat aromatik. Vitamin yang terkandung didalamnya yaitu asam askorbat, piridoksin, thiamin, riboflavin, niasin, asam pantotenat, biotin, asam folat, dan vitamin K. Komposisi zat gula dalam madu seperti fruktosa, glukosa, sukrosa, maltosa, dan disakarida. Selain itu kandungan asam organik dalam madu yaitu asam asetat, asam butirat, format, suksinat, glikolat, malat, pro glutamat, sitrat, dan piruvat (Sahputra, 2014: 4).

Madu dapat menjadi antibakteri karena kandungan glukosanya tinggi, pH madu yang asam, dan rendah protein. Madu membatasi jumlah air yang tersedia untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Sejumlah riset menunjukkan madu memiliki efek antibakteri terhadap bakteri yang resistensi terhadap beberapa antibiotik.

Patton (2006) menjelaskan pH yang asam dapat mengurangi pertumbuhan bakteri dan senyawa hidrogen peroksida membunuh mikroorganisme patogen. Senyawa organik madu bersifat antibakteri seperti flavonoid, glikosida, dan polifenol. Cara kerja senyawa ini dengan meracuni protoplasma dan menghancurkan dinding sel. Selanjutnya senyawa fenolik menyebabkan kebocoran dengan

memutus ikatan hidrofobik pada membran hingga mengakibatkan keluarnya isi sel pada bakteri (Marantika, 2018).

Prestianti (2017: 10) menyebutkan manfaat lain dari madu seperti mempercepat proses penyembuhan, mengatasi masalah insomnia, baik untuk sistem pencernaan, untuk terapi dan pengobatan penyakit infeksi, memperkuat kerja jantung, meredakan batuk dan menghilangkan dahak, sebagai antioksidan yang baik, mencegah penyakit infeksi, dan sebagai obat alternatif.

b. Jenis Madu

Wulansari (2018) mengelompokan madu berdasarkan sumber bunga dan sumber makanannya. Berdasarkan sumber bunganya terbagi menjadi dua yaitu:

1) Madu Monofloral

Madu yang berasal salah satu jenis nektar atau dominan oleh salah satu nektar, contoh madu hitam dan madu kelengkeng.

2) Madu Multifloral

Madu berasal dari berbagai jenis nektar yang berasal dari lebih dari satu tanaman, contoh madu hutan.

Madu berdasarkan sumber makanannya terbagi menjadi tiga, yaitu:

1) Madu Flora

Madu ini berasal dari nektar bunga. Madu flora dibedakan menjadi madu monofloral dan madu multifloral.

2) Madu Ekstrafloa

Madu berasal dari nektar diluar bunga, seperti daun, cabang atau batang tanaman.

3) Madu Embun

Madu embun berupa cairan yang diproduksi serangga yang meletakkan gula pada tumbuhan yang dikumpulkan dan disimpan dalam sarang lebah.

Seperti yang telah dijelaskan bahwa Rasulullah SAW menggunakan madu untuk mengobati berbagai penyakit. Sebagaimana firman Allah SWT yang telah menciptakan madu dengan berbagai jenis dalam Al-Qur'an surah An-Nahl ayat 69:

ثُمَّ كُلِي مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (٩٦)

“Kemudian makanlah dari segala (macam) buah-buahan lalu tempuhlah jalan Tuhanmu yang telah dimudahkan (bagimu). Dari perut lebah itu keluar minuman (madu) yang bermacam-macam warnanya, di dalamnya terdapat obat yang menyembuhkan bagi manusia. Sungguh, pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berpikir.”

Dalam tafsir Al-Misbah menjelaskan ayat tersebut yakni Allah SWT memerintahkan kepada lebah yang mempunyai naluri yang kuat serta dapat melakukan kegiatan yang sangat bermanfaat untuk manusia. Manfaat tersebut keluar dari perut lebah yang menghisap berbagai macam bunga dalam bentuk minuman yang lezat dan bermanfaat dengan berbagai warna sesuai dengan jenis bunga dan waktu. Di dalamnya berupa madu yang memiliki kandungan obat yang dapat menyembuhkan. Semuanya adalah tanda kekuasaan Allah SWT (Shihab, 2002: 280).

Madu bersumber dari nektar tumbuhan yang dihasilkan oleh lebah madu. Lebah menghisap nektar yang difermentasikan di dalam perutnya dengan mengubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Nektar dipindahkan oleh lebah pekerja kepada lebah yang ada disarang melalui mulutnya dengan menelan dan mengeluarkannya berulang kali. Pada saat pemindahan nektar terjadi proses ekstraksi air dan pembersihan nektar dari racun, mikroba, penambahan asam amino, lipid, dan elemen lainnya (Suranto, 2007). Nektar akan disimpan dalam sarang yang ditutup dengan malam. Proses tersebut ini jika telah memenuhi kapasitas yang tersedia, madu dapat dipanen.

c. Lebah Madu *Apis mellifera*

Klasifikasi lebah *Apis mellifera* berdasarkan *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Arthropoda</i>
Kelas	: <i>Insecta</i>
Ordo	: <i>Hymenoptera</i>
Famili	: <i>Apidae</i>
Genus	: <i>Apis</i>
Spesies	: <i>Apis mellifera</i>

Peternak di Indonesia banyak yang membudidayakan jenis lebah ini. Hal tersebut dikarenakan *Apis mellifera* memiliki keunggulan yang dapat beradaptasi dengan keadaan iklim di Indonesia dan menghasilkan kualitas madu yang lebih unggul (Kusumaningrum, 2012). Jumlah koloni lebah pekerja sekitar 60.000 - 80.000 lebah saat musim kemarau sedangkan saat musim sekitar 10.000 lebah pekerja. Populasi lebah dan jumlah anakan dari lebah *Apis mellifera* biasanya sulit ditebak. Terutama pada musim-musim tertentu. Bisa dipengaruhi oleh kualitas dan kuantitas pakan yang diperoleh, suhu, iklim, lokasi, dan usia ratu lebah. Koloni lebah *Apis mellifera* berkembang biak dengan baik jika ada setidaknya satu ratu lebah dan 200 pekerja. Setiap kotak koloni menampung 10 sisir eram. Tapi di luar musim bunga, jumlah sisiran dapat dikurangi dan ditambahkan kembali saat musim bunga (Aprilliana, 2017: 10).



Gambar 5. Lebah *Apis mellifera*
Sumber : <http://madubinaapiari.co.id>

9. Madu Hitam

Madu hitam memiliki rasa pahit pada madu hitam diperoleh dari sari bunga pelawan dan bunga lain yang tidak memproduksi buah untuk dikonsumsi manusia. Madu hitam diproduksi oleh jenis lebah *apis mellifera*. Madu hitam ini kaya akan kandungan alkaloid. Warna yang dihasilkan pada madu hitam yakni hitam hingga coklat pekat (Apriyani & Cantika, 2021: 83). Madu hitam memiliki keunggulan dibandingkan madu lainnya karena memiliki kadar glukosa yang lebih rendah.

a. Komposisi dan Kandungan Madu Hitam

Nora *et al* (2018: 42) menjelaskan madu hitam memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, dan terpenoid. Warna madu hitam dapat menjadi indikasi dari madu tersebut. Warna madu semakin gelap berasal dari suhu dan lama penyimpanan. madu hitam pahit mengandung senyawa alkaloid sebagai berikut, yaitu: berberin, isoboldin, iso koridin, iso tetrandrine, dan obaberine (Safira & Aisy, 2020: 969). Kandungan madu hitam dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan Madu Hitam

No.	Komposisi	Nilai
1	Kalori (Kkal)	294
2	Air (%)	16,19
3	Gula Pereduksi (%)	77,50
4	Abu (%)	0,50
5	Sukrosa (%)	4,02
6	Protein (g)	0,30
7	Karbohidrat (g)	79,50
8	Fosfor (mg)	16
9	Zat Besi (mg)	0,90
10	Natrium (mg)	6
11	Kalium (%)	26,90
12	Thiamin (mg)	0,02
13	Riboflavin (mg)	0,04
14	Niasin (mg)	0,10
15	Asam askorbat (mg)	4

Sumber : Safira & Aisy, 2020

b. Manfaat Madu Hitam

Madu hitam memiliki manfaat yang lebih unggul dibandingkan dengan jenis madu lainnya. Hal tersebut karena madu hitam memiliki potensi antioksidan yang lebih tinggi. Beberapa manfaat madu seperti antibakteri, dapat menurunkan kolesterol jahat, menyembuhkan berbagai penyakit, dan dapat meningkatkan kekebalan tubuh. Berikut penjelasan manfaat dari madu hitam.

1) Antibakteri

Madu hitam menjadi zat antibakteri pada bakteri gram negatif dan gram positif. Syawalludin (2019: 311) menyatakan kemampuan madu hitam sebagai zat antibakteri karena terdapat senyawa seperti flavonoid, hidrogen peroksida, dan senyawa organik lainnya. Fitriyaningsih (2014) dalam jurnalnya menjelaskan aktivitas antibakteri pada warna madu lebih gelap memiliki daya hambat yang tinggi dibandingkan madu yang berwarna terang.

2) Menyembuhkan penyakit dan menurunkan kolesterol

Denata (2021: 1) menyebutkan madu hitam memiliki khasiat dapat menyembuhkan segala penyakit seperti maag, gangguan pernafasan, asam urat, rematik, dan jenis penyakit lainnya. Selain itu madu hitam juga bermanfaat dapat menurunkan risiko tinggi kolesterol dan dapat menstabilkan kolesterol darah.

3) Meningkatkan kekebalan tubuh

Kandungan antioksidan yang dimiliki madu hitam seperti flavonoid memiliki kadar yang lebih tinggi dibandingkan madu jenis lain. Madu hitam memiliki kandungan kalsium, magnesium, dan zat besi yang dibutuhkan oleh tubuh (Denata, 2021: 1).

c. Mekanisme Aktivitas Antibakteri pada Madu Hitam

Madu hitam memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri secara langsung dan tidak langsung. Mekanisme secara langsung terjadi akibat terbentuknya hidrogen peroksida, osmolalitas, pH, faktor non-peroksida, dan fenol (Putri & Asparini, 2017: 65). Kandungan hidrogen peroksida madu mampu membunuh bakteri. Hidrogen peroksida merusak gugus fungsi biomolekul pada bakteri. Molan (1992: 19) menerangkan cara kerja senyawa tersebut dengan mendenaturasi protein serta menghambat fungsi dari nukleat bakteri sehingga terjadi kerusakan pada dinding bakteri dan gangguan sintesis asam nukleat yang mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri.

10. Madu Hutan

Madu hutan dihasilkan oleh jenis lebah *apis mellifera*. Prestianti (2017: 8) menjelaskan jenis madu ini diperoleh dengan melakukan perburuan dengan peralatan yang ekstra untuk mencapai sarang lebah yang berada di atas pohon dengan tali, ember, pisau, pengasap, jerigen, dan alat saring madu.

a. Komposisi dan Kandungan Madu Hutan

Madu hutan diperoleh dari nektar berbagai sumber oleh lebah penghasil madu. Madu hutan memiliki komposisi atas 17,1% air, 82,4% karbohidrat total, 0,5% protein, asam amino, vitamin, dan mineral (Fady, 2015). Suranto (2008) menjelaskan madu hutan sangat tinggi karbohidrat dan rendah lemak. Kandungan gula mencapai 80% terdiri dari *fruktosa* dan *glukosa*. Asam *glutamat* menjadi asam utama yang terkandung dalam madu hutan. Terdapat asam organik lain seperti asam *asetat*, asam *butirat*, *format*, *suksinat*, *glikolat*, *malat*, *pro glutamat*, *sitrat*, dan *piruvat*. Kandungan madu hutan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kandungan Madu Hutan

No.	Komposisi	Nilai
1	Kalori (Kkal)	328
2	Kadar Air (%)	17,20
3	Protein (g)	0,50
4	Karbohidrat (g)	82,40
5	Abu (g)	0,20
6	Tembaga (mg)	4,40 - 9,20
7	Fosfor (mg)	1,90 - 6,30
8	Magnesium (mg)	1,20 - 3,50
9	Thiamin (mg)	0,10
10	Riboflavin (mg)	0,25
11	Protein (mg)	0,50
12	Niasin (mg)	0,20
13	Ph	3,90
14	Asam Folat (mg)	43,10

Sumber : Suranto, 2008

b. Manfaat Madu Hutan

Sakri (2015) menjelaskan madu hutan kaya akan vitamin dan mineral, selain itu mudah dicerna, dan dapat dijadikan sebagai pengganti gula. Wulansari (2018) menambahkan manfaat lain madu hutan seperti dapat menyembuhkan luka, sumber antioksidan dan antibakteri.

1) Sumber vitamin dan mineral

Banyak sekali vitamin dan mineral yang ada dalam madu hutan. Vitamin dan mineral disesuaikan dengan jenis bunga yang dihisap nektarnya. Selain itu madu hutan mengandung asam askorbat, kalsium, dan zat besi.

2) Mudah dicerna

Madu hutan dapat mengubah menjadi bentuk gula lain seperti *fruktosa* menjadi *glukosa*. Sehingga madu hutan dapat dicerna oleh perut yang sensitif.

3) Pengganti gula

Madu hutan menjadi pengganti gula alami yang menyehatkan. Dapat ditambah bahan lain seperti susu yang mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh.

4) Penyembuh luka

Madu hutan dalam proses penyembuhan sangat efektif karena banyak mengandung nutrisi, meminimalisir iritasi, dan terdapat antibakteri. Kemampuan lain madu hutan dalam proses pembersihan infeksi luka yang cepat, debridement luka, menekan peradangan dan mempercepat proses pertumbuhan epitel.

5) Antioksidan

Berbagai senyawa antioksidan pada madu hutan bergantung dengan jenis bunga. Umumnya mengandung senyawa fitokimia yang memiliki fungsi sebagai sumber antioksidan. Salah satu senyawa fitokimia yang hanya ada di dalam madu hutan adalah senyawa *polifenol*.

6) Antibakteri

Antibakteri madu hutan efektif pada bakteri gram positif. Antibakteri memiliki efek bakterisida yang dapat melawan bakteri yang bersifat patogen. *Hidrogen peroksida* dapat menghasilkan agen antibakteri. Konsentrasi gula yang tinggi dapat juga sebagai antibakteri.

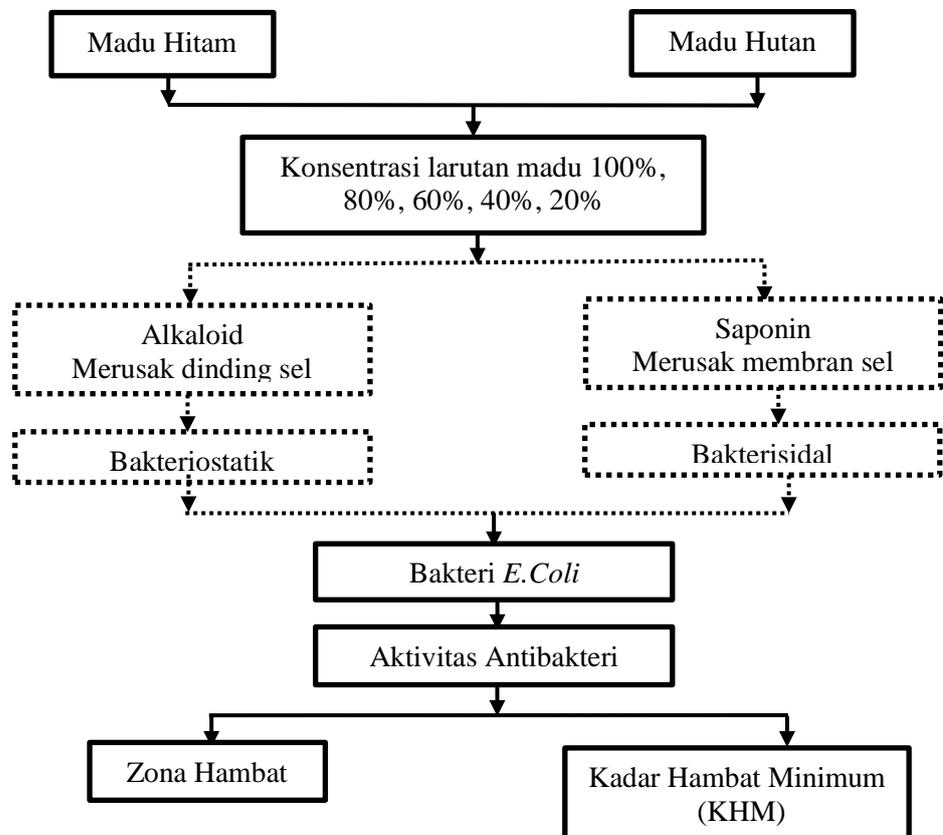
c. Mekanisme Aktivitas Antibakteri pada Madu Hutan

Madu hutan memiliki senyawa yang berperan sebagai antibakteri. Nadhilla (2014: 96) menjelaskan 3 cara kerja senyawa antibakteri pada madu hutan terdapat tekanan osmosis, keasaman dan penghambatan. Faktor tersebut secara sendiri atau bersama-sama dapat mengurangi pertumbuhan kontaminasi bakteri. Larutan jenuh dalam tekanan osmosis madu hutan berasal dari gula dengan persentase kandungan air sebanyak 15-21% dari beratnya. 84% kandungan madu hutan berasal dari campuran gula sederhana, yaitu *fruktosa* dan *glukosa*. Hubungan yang kuat berasal dari molekul gula menghasilkan sedikit air yang tersedia untuk bakteri. Bakteri akan mengalami dehidrasi pada proses osmosis dan dapat membunuh bakteri tersebut.

Asam *glukonat* menjadi asam utama pada madu hutan. Asam ini merupakan hasil konversi enzimatik *glukosa* oleh *glukosa oksidase* dari sekresi kelenjar hipofaring pada lebah madu menjadi asam glukonat dan glukonolakton. Inhibisi pembentukan enzim dan akumulasi *hidrogen peroksida* dalam pengenceran madu dan nektar. *Hidrogen peroksida* sebagai antibiotik yang efektif. Selain itu *flavonoid* seperti senyawa fenol juga bersifat antibakteri.

B. Kerangka Teori

Kerangka teori menjadi penentu teori-teori yang akan dijadikan sebagai landasan dalam melakukan penelitian. Teori-teori ilmiah yang digunakan dapat memecahkan masalah dalam penelitian. Kerangka teori dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 6.



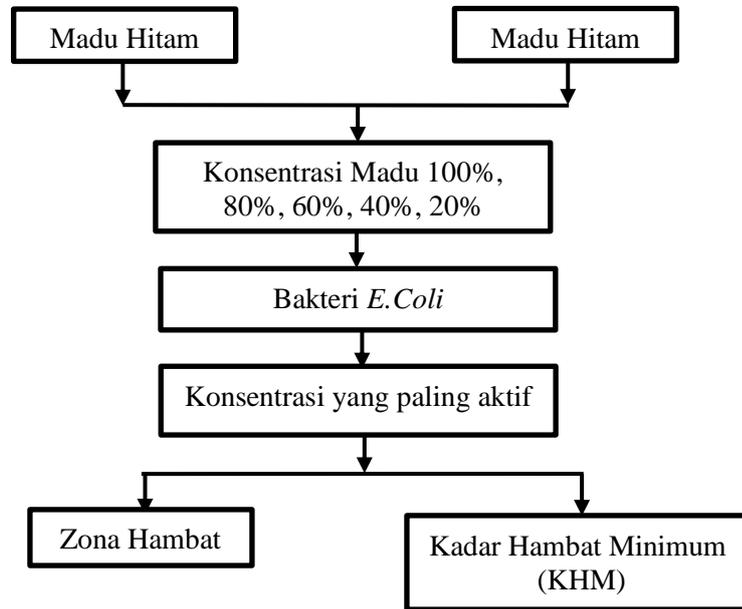
Gambar 6. Kerangka Teori

Keterangan :

- : Variabel yang diteliti
- : Variabel yang tidak diteliti
- : Hubungan yang diteliti
- : Hubungan yang tidak diteliti

C. Kerangka Konsep Penelitian

Kerangka konsep penelitian merupakan landasan penjelasan sementara terhadap gejala yang menjadi objek permasalahan. Kerangka konsep tersusun berdasarkan tinjauan pustaka dan dari hasil penelitian relevan. Berikut kerangka konsep penelitian yang berjudul Perbandingan Aktivitas Antibakteri pada Madu Hitam dan Madu Hutan pada *Escherichia coli* dengan Teknik Difusi Agar dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Kerangka Konsep Penelitian

D. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini diduga bahwa terdapat pengaruh perbandingan aktivitas antibakteri madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Ditentukan berdasarkan tiap konsentrasi yang akan diuji pada madu hitam dan madu hitam terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*. Perumusan hipotesis penelitian adalah sebagai berikut:

Apabila H_1 diterima dan H_0 ditolak:

1. Ada pengaruh perbandingan aktivitas antibakteri madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.
2. Terdapat variasi konsentrasi dari madu hitam yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.
3. Terdapat variasi konsentrasi dari madu hitam yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.

Apabila H_0 diterima dan H_1 ditolak:

1. Tidak ada pengaruh perbandingan aktivitas antibakteri madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.
2. Tidak terdapat variasi konsentrasi dari madu hitam yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.
3. Tidak terdapat konsentrasi minimum pada madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.

Metode pengambilan keputusan terbagi dua cara yaitu metode parametrik dan nonparametrik, sehingga kaidah pengambilan keputusan sebagai berikut:

a. Parametrik

- 1) $F_{hitung} > F_{tabel}$ (taraf uji 5%) maka H_0 ditolak H_1 diterima
- 2) $F_{hitung} < F_{tabel}$ (taraf uji 5%) maka H_0 diterima H_1 ditolak

b. Non parametrik

- 1) $X^2_{hitung} < X^2_{tabel}$ (taraf uji 5%) maka H_0 diterima atau H_1 ditolak
- 2) $X^2_{hitung} \geq X^2_{tabel}$ (taraf uji 5%) maka H_0 ditolak atau H_1 diterima

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif. Jenis penelitian yang akan diteliti menggunakan uji eksperimental dengan teknik *disc diffusion*. Rancangan penelitian yang akan dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Bahan yang digunakan sebagai sampel pada penelitian ini adalah madu hitam dan madu hutan. Madu hitam dan madu hutan yang diujikan dengan masing-masing konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, 20% terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 8739. Kontrol positif menggunakan antibiotik ciprofloxacin dan kontrol negatif menggunakan aquades steril.

Perhitungan besar sampel yang akan digunakan pada penelitian yang akan dilakukan menggunakan rumus besar sampel Federer menurut Supranto (2000) yaitu :

$$\begin{aligned}(t-1)(n-1) &\geq 15 \\(12-1)(n-1) &\geq 15 \\11n - 11 &\geq 15 \\11n &\geq 26 \\n &\geq 2,36 \\n &\geq 2 \text{ (pembulatan)}\end{aligned}$$

Keterangan :

t : Jumlah perlakuan pada penelitian

n : Jumlah perlakuan ulang (sampel)

Berdasarkan hasil perhitungan rumus tersebut, diketahui bahwa jumlah penelitian pada masing-masing kelompok perlakuan dengan minimal jumlah perlakuan ulang adalah 2 pengulangan. Hal tersebut meliputi :

- 1) Kontrol negatif (KØ) : media + bakteri + aquades steril
- 2) Kontrol positif (KO) : media + bakteri + ciprofloxacin 500 mg
- 3) Perlakuan 1 (P1) : media + bakteri + madu hitam 100%
- 4) Perlakuan 2 (P2) : media + bakteri + madu hitam 80%
- 5) Perlakuan 3 (P3) : media + bakteri + madu hitam 60%
- 6) Perlakuan 4 (P4) : media + bakteri + madu hitam 40%
- 7) Perlakuan 5 (P5) : media + bakteri + madu hitam 20%
- 8) Perlakuan 6 (Q1) : media + bakteri + madu hutan 100%
- 9) Perlakuan 7 (Q2) : media + bakteri + madu hutan 80%
- 10) Perlakuan 8 (Q3) : media + bakteri + madu hutan 60%
- 11) Perlakuan 9 (Q4) : media + bakteri + madu hutan 40%
- 12) Perlakuan 10 (Q5) : media + bakteri + madu hutan 20%

Dari 10 perlakuan dan 2 kontrol di atas, kemudian dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Rancangan penelitian yang akan dilakukan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rancangan Penelitian Uji Aktivitas Antibakteri pada Madu

P1Q1KØU1	P2Q4KØU1	P5Q3P4U1	P2Q4KØU2
P5Q3P4U2	P3Q2Q5U2	P1Q1KØU2	P3Q2Q5U1

Keterangan :

P : Perlakuan pada madu hitam

Q : Perlakuan pada madu hutan

K : Kontrol

U : Ulangan

Penentuan konsentrasi uji KHM dengan melakukan penurunan konsentrasi secara bertahap pada masing-masing sampel uji madu konsentrasi terendah 20% dengan menambahkan aquades steril sehingga terbentuk konsentrasi sebagai berikut :

- 1) Tabung No. 1 : madu hitam konsentrasi 15%
- 2) Tabung No. 2 : madu hitam konsentrasi 12,5%
- 3) Tabung No. 3 : madu hitam konsentrasi 10%
- 4) Tabung No. 4 : madu hitam konsentrasi 5%
- 5) Tabung No. 5 : madu hitam konsentrasi 15%
- 6) Tabung No. 6 : madu hitam konsentrasi 12,5%
- 7) Tabung No. 7 : madu hitam konsentrasi 10%
- 8) Tabung No. 8 : madu hitam konsentrasi 5%

Rancangan penelitian untuk uji kadar hambat minimum (KHM) dengan teknik difusi agar dengan perlakuan sebagai berikut :

- 1) Perlakuan 1 (P1) : media + bakteri + madu hitam 15%
- 2) Perlakuan 2 (P2) : media + bakteri + madu hitam 12,5%
- 3) Perlakuan 3 (P3) : media + bakteri + madu hitam 10%
- 4) Perlakuan 4 (P4) : media + bakteri + madu hitam 5%
- 5) Perlakuan 6 (Q1) : media + bakteri + madu hutan 15%
- 6) Perlakuan 7 (Q2) : media + bakteri + madu hutan 12,5%
- 7) Perlakuan 8 (Q3) : media + bakteri + madu hutan 10%
- 8) Perlakuan 9 (Q4) : media + bakteri + madu hutan 5%

Dari 8 perlakuan di atas, pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan sehingga. Rancangan penelitian dilakukan dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rancangan Penelitian Uji KHM

P1P2P3P4U1	Q1Q2Q3Q4U1	P1P2P3P4U2
Q1Q2Q3Q4U2	P1P2P3P4U3	Q1Q2Q3Q4U3

Keterangan :

- P : Perlakuan pada madu hitam
 Q : Perlakuan pada madu hutan
 U : Ulangan

B. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini terdiri dari konsentrasi madu hitam, konsentrasi madu hutan, kontrol positif, dan kontrol negatif. Kontrol negatif menggunakan aquades steril. Kontrol positif menggunakan antibiotik ciprofloxacin 500 mg. Perbandingan konsentrasi madu hutan dan madu hitam dapat dilihat pada Tabel 6 dibawah ini.

Tabel 6. Variabel Bebas

Jenis Madu	Konsentrasi Madu (%)
Madu	100
Hitam	80
	60
	40
	20
Madu	100
Hutan	80
	60
	40
	20

2. Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian yang akan diteliti terdiri dari dua variabel. Variabel tersebut yaitu diameter zona hambat madu hutan dan madu hitam terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* dan KHM madu hitam dan madu hutan terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini antara lain media bakteri, media aktivitas antibakteri, waktu inkubasi 24 jam, suhu inkubasi pengujian aktivitas antibakteri pada suhu 37 °C, waktu pengamatan, kondisi laboratorium steril, dan suspensi bakteri.

4. Variabel Tidak Terkendali

Variabel tidak terkontrol dalam penelitian ini meliputi kerusakan pada madu dan kerusakan pada bakteri uji.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada dua tempat. Pengambilan sampel madu dilakukan di Desa Kedawung, Kecamatan Banyuputih, Kabupaten Batang, Jawa Tengah. Uji aktivitas antibakteri pada madu dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang. Waktu observasi, penelitian, dan pengambilan data dilaksanakan kurang lebih selama 7 bulan pada bulan Desember 2021 sampai bulan Juni 2022.

D. Teknik Pengambilan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah madu hitam dan madu hutan yang berasal dari hutan Alas Roban, Batang. Koloni bakteri *E.coli* berasal dari laboratorium pengembangan kultur bakteri. Dalam penelitian ini dilakukan pengambilan sampel menggunakan metode *insidental sampling*. Sampel yang digunakan pada penelitian yang akan diteliti adalah madu hitam dan madu hutan dari peternak lebah lokal dari Desa Kedawung, Kabupaten Batang, Jawa Tengah. Koloni bakteri *E.coli* menggunakan bakteri *Escherichia coli strain ATCC 8739* yang diperoleh dari IPB *Culture Collection*.

Kriteria sampel yang akan diuji terdiri dari dua bagian, antara lain:

1. Kriteria inklusi
 - a. Madu hitam dan madu hutan dalam keadaan baik.
 - b. Madu hitam dan madu hutan tidak rusak.
 - c. Zona hambat pertumbuhan bakteri *E.coli* menunjukkan adanya zona bening pada sekitar cakram pada media agar.
2. Kriteria eksklusi
 - a. Madu hitam dan madu hutan dalam keadaan tidak baik.
 - b. Madu hitam dan madu hutan rusak secara fisik maupun komposisi.
 - c. Adanya pertumbuhan jamur atau kontaminasi lain pada media agar.

E. Definisi Operasional

Definisi operasional menjelaskan secara singkat terkait variabel. Penelitian di dalam penelitian tugas akhir yang berjudul “Perbandingan Aktivitas Antibakteri pada Madu Hitam dan Madu Hutan terhadap *Escherichia coli* dengan Teknik Difusi Agar”. Mengangkat variabel independen yaitu zona hambat. Variabel dependen yaitu madu hitam dan madu hutan. Adapun definisi operasional dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel Terikat				
Zona Hambat	Diameter zona hambat madu hitam dan madu hutan pada pertumbuhan bakteri <i>E. coli</i>	Jangka sorong	Metode yang digunakan dengan penentuan kriteria berdasarkan pada kriteria Davis dan Stout (1971). <ul style="list-style-type: none"> • Jika daerah hambatan memiliki diameter ≥ 20 mm termasuk kategori sangat kuat • Jika daerah hambatan 20-10 mm termasuk kategori kuat • Jika daerah hambatan 10-5 mm termasuk kategori lemah. (Ngajow <i>et al.</i>, 2013: 132) 	Numerik
Kadar Hambat Minimum (KHM)	Larutan sampel dengan konsentrasi terkecil yang mampu	Pengamatan pertumbuhan bakteri	Diameter Zona Hambat	Numerik

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
	membunuh bakteri.			
Variabel Bebas				
Madu Hitam	Konsentrasi madu hitam	Mikropipet	Larutan madu hutan dalam konsentrasi 100%. Diencerkan dengan aquades steril menjadi beberapa konsentrasi yakni 80%, 60%, 40%, 20%. (Apriyani & Cantika, 2021: 84)	Kategorik
Madu Hutan	Konsentrasi madu hutan	Mikropipet	Larutan madu hutan dalam konsentrasi 100%. Diencerkan dengan aquades menjadi beberapa konsentrasi yakni 80%, 60%, 40%, 20%. (Sun <i>et al.</i> , 2019: 69)	Kategorik
Kontrol positif	Antibiotik yang digunakan sebagai kontrol pertumbuhan bakteri <i>E. coli</i>	Mikropipet	Cakram uji berisi antibiotik ciprofloxacin 500 mg dengan konsentrasi 0,2%	Kategorik
Kontrol negatif	Larutan aquades steril sebagai kontrol pembanding pertumbuhan bakteri <i>E. coli</i>	Mikropipet	Cakram uji berisi aquades steril	Kategorik

F. Prosedur Penelitian

1. Pengumpulan Data

a) Data Primer

Data primer pada penelitian ini diperoleh melalui eksperimen yang dilakukan pada sampel untuk uji aktivitas antibakteri di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang.

b) Data Sekunder

Data sekunder pada penelitian yang akan diteliti diperoleh melalui observasi secara langsung pada peternak lebah di Desa Kedawung. Selain itu ditambah dengan referensi pustaka yang berkorelasi dengan penelitian ini dan kajian penelitian-penelitian sebelumnya.

2. Instrumen Penelitian

a) Bahan

Bahan penelitian yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri pada madu hitam dan madu hutan terhadap *E. coli* yaitu madu hitam, madu hutan, kultur bakteri *Escherichia coli strain* ATCC 8739, tablet ciprofloxacin 500 mg, aquades steril, larutan NaCl 0,90%, bubuk *Brain heart Infusion Broth* (BHIB), bubuk *Nutrient Agar* (NA), bubuk *Mueller Hinton Agar* (MHA).

b) Alat

Alat penelitian yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri pada madu hitam dan madu hutan terhadap *E. coli* adalah kertas cakram (*Paper Disk Oxoid*), *breast milk bags*, autoklaf, inkubator, spektrofotometer, mikroskop stereo, *colony counter*, *laminar air flow*, mortir dan stamper, cawan *petri dish* ukuran 150 mm x 150 mm, *beaker glass*, labu erlenmeyer, labu ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet volumetrik, pipet mikro, batang pengaduk, timbangan analitik, *hotplate stirrer*, *spreader*, kaca

pembesar, jangka sorong digital, kertas HVS, alumunium foil, gunting, batang ose ujung lurus, batang ose ujung bulat, termometer, blue tip, spreader, centrifuge, indikator pH, pinset, kamera

3. Teknik Pengumpulan Data

Prosedur kerja dalam penelitian yang akan dilaksanakan terdiri dari pengumpulan bahan, sterilisasi bahan, pembuatan konsentrasi madu, pembuatan media agar, pembuatan suspensi bakteri, serta pengujian aktivitas antibakteri (Sun *et al.*, 2019: 69).

a) Pengumpulan Sampel Madu

Madu hitam dan madu hutan diperoleh dari peternak lebah asli dari Desa Kedawung, Batang, Jawa Tengah dengan proses pemerasan sarang madu secara langsung dari sarang lebah di hutan Alas Roban dengan keadaan alat yang bersih. Sampel madu diambil dan dimasukkan ke dalam *breast milk bags* yang dibawa peneliti agar madu tidak terkontaminasi dan tetap higienis. Waktu pengambilan sampel madu dilakukan satu hari sebelum pengujian dilakukan agar kualitas madu yang didapat masih segar.

b) Uji Aktivitas Antimikroba

1) Sterilisasi alat dan bahan

Semua peralatan yang akan digunakan untuk penelitian dicuci hingga bersih kemudian dikeringkan. Alat yang sudah kering dibungkus menggunakan kertas HVS. Alat yang sudah terbungkus dimasukkan ke dalam autoklaf untuk proses sterilisasi. Sterilisasi dilakukan selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Tidak membuka bungkus alumunium foil jika alat tersebut belum digunakan. Sedangkan sterilisasi bahan seperti aquades steril menggunakan autoklaf dalam suhu 121 °C selama 15 menit.

2) Pembuatan kontrol positif

Kontrol positif yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu tablet ciprofloxacin 500 mg. Cara pembuatan dengan

melarutkan 10 ml aquades steril dicampur hingga homogen sehingga memperoleh larutan kontrol positif ciprofloxacin 5000 µg/ml.

Pembuatan stok awal ciprofloxacin 1 mg setara dengan 1000 µg/ml. Dibuat pengenceran untuk bakteri *E.coli* dengan kadar 2 µg/ml. Digunakan pembanding ciprofloxacin sebagai kontrol positif dan aquades steril sebagai kontrol negatif.

3) Perhitungan stok awal ciprofloxacin dan pembuatan larutan kontrol positif

Stok untuk konsentrasi ciprofloxacin 200 mg/ 100 ml setara dengan 2000 µg/ml.

$$\begin{aligned} 2000 \text{ ppm} &= 2000 \text{ mg/ L} \\ &= 2000 \text{ µg/ml} \\ &= \frac{2000}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml} \\ &= 200 \text{ mg ciprofloxacin dalam 100 ml} \end{aligned}$$

Perhitungan berat tablet ciprofloxacin 500 mg

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{berat 1 tablet}}{\text{kandungan antibiotik}} \times 200 \text{ mg} \\ &= \frac{700 \text{ mg}}{500 \text{ mg}} \times 200 \text{ mg} \\ &= 280 \text{ mg} \end{aligned}$$

Stok ciprofloxacin 2 µg/ml untuk bakteri *E.coli* :

$$\begin{aligned} V1 \times C1 &= V2 \times C2 \\ V1 \times 2000 \text{ µg/ml} &= 100 \text{ ml} \times 2 \text{ µg/ml} \\ V1 \times 2000 &= 200 \text{ ml} \\ V1 &= \frac{200 \text{ ml}}{2000} \\ V1 &= 0,1 \text{ ml} \end{aligned}$$

Larutan stok ciprofloxacin diambil sebanyak 0,10 ml kemudian ditambahkan aquadest steril sampai volume 100 ml.

2) Pembuatan konsentrasi madu

Siapkan larutan madu hutan dan madu hitam dalam konsentrasi 100%. Masing-masing madu dilakukan pengenceran dengan aquades steril menjadi beberapa konsentrasi 80%, 60%, 40%, 20% menggunakan rumus :

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

Konsentrasi madu masing-masing 100% untuk bakteri *E.coli* adalah :

(1) Konsentrasi 80%

$$\begin{aligned} V1 \times M1 &= V2 \times M2 \\ V1 \times 100\% &= 100 \times 80\% \\ V1 &= \frac{80 \times 100}{100} \\ V1 &= 80 \text{ ml} \end{aligned}$$

Sebanyak 80 ml madu ditambahkan aquades steril hingga mencapai volume 100 ml.

(2) Konsentrasi 60%

$$\begin{aligned} V1 \times M1 &= V2 \times M2 \\ V1 \times 100\% &= 100 \times 60\% \\ V1 &= \frac{60 \times 100}{100} \\ V1 &= 60 \text{ ml} \end{aligned}$$

Sebanyak 60 ml madu ditambahkan aquades steril hingga mencapai volume 100 ml.

(3) Konsentrasi 40%

$$\begin{aligned}V1 \times M1 &= V2 \times M2 \\V1 \times 100\% &= 100 \times 40\% \\V1 &= \frac{40 \times 100}{100} \\V1 &= 40 \text{ ml}\end{aligned}$$

Sebanyak 40 ml madu ditambahkan aquades steril hingga mencapai volume 100 ml.

(4) Konsentrasi 20%

$$\begin{aligned}V1 \times M1 &= V2 \times M2 \\V1 \times 100\% &= 100 \times 20\% \\V1 &= \frac{20 \times 100}{100} \\V1 &= 20 \text{ ml}\end{aligned}$$

Sebanyak 20 ml madu ditambahkan aquades steril hingga mencapai volume 100 ml.

4) Pembuatan media

Media yang digunakan untuk penelitian menggunakan 4 media. Media pembiakan bakteri yaitu BHIB, NA miring, dan NB. Media untuk uji aktivitas antibakteri menggunakan media MHA.

a) Media Pembiakan Bakteri

(1) *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB)

Media BHIB ditimbang sebanyak 4,44 gram dengan menggunakan timbangan digital dan dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 120 ml di dalam *beaker glass* 200 ml. Larutan diaduk dengan batang pengaduk hingga homogen. Ukur pH dengan indikator pH hingga mencapai $7,40 \pm 0,20$. Larutan dipanaskan dengan menggunakan bunsen hingga larut tercampur sempurna. Kemudian dipindahkan ke dalam erlenmeyer dan

ditutup dengan kapas. Lakukan sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C.

(2) *Nutrient Agar* (NA) Miring

Media NA dibuat dengan cara menimbang 10 gram bubuk NA dalam 500 ml aquades steril yang dihomogenkan di dalam *beaker glass*. Media dihomogenkan dengan cara dipanaskan dengan bunsen dan diaduk dengan batang pengaduk. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan keadaan miring dan tutup dengan kapas. Sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C.

b. Media Uji Aktivitas Antibakteri

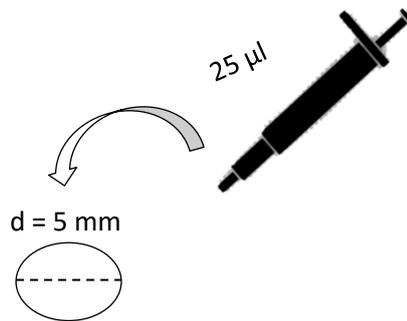
Mueller Hinton Agar (MHA)

Pembuatan media MHA dilakukan dengan cara sebanyak 38 gr MHA ditimbang dengan timbangan digital lalu dimasukkan ke dalam *beaker glass* volume 1.000 ml. Bahan dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 1.000 ml. Larutan diaduk hingga homogen dengan menggunakan batang pengaduk. Setelah homogen kemudian dipanaskan dengan bunsen burner hingga mendidih. Disterilkan dengan suhu dengan suhu 121 °C selama 15 menit ke dalam autoklaf. Ukur suhu media menggunakan termometer hingga suhu mencapai 45 °C. Kemudian larutan media MHA dituang ke dalam cawan *petri dish* steril sebanyak 5 ml. Disimpan pada suhu 4 °C.

5) Regenerasi bakteri

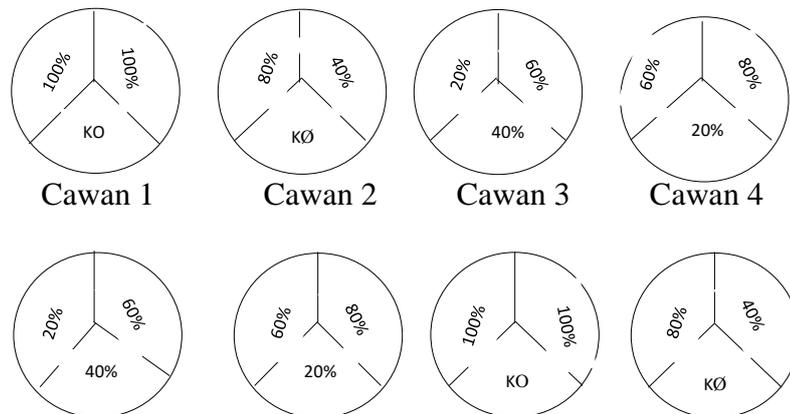
- a) Bakteri *E. coli* diambil dari biakan murni sebanyak 2 ose menggunakan jarum ose ujung bulat steril kemudian disuspensikan pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB). Tutup tabung reaksi dengan menggunakan aluminium foil agar tidak terjadi kontaminasi. Inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C di dalam inkubator.

- b) Melakukan peremajaan bakteri dengan memindahkan bakteri dari media BHIB ke media NA miring. Mengambil bakteri *E. coli* sebanyak 1-2 ose dengan menggunakan batang ose ujung lurus kemudian ditanamkan pada media NA miring dengan cara digoreskan pada media agar dengan 1 media sebagai kontrol negatif (tanpa inokulasi bakteri). Inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C di dalam inkubator agar bakteri tumbuh. Perlakuan diulang sebanyak 2 kali untuk regenerasi pertama.
- 6) Pembuatan suspensi bakteri
- Bakteri *E. coli* dalam media NA diambil sebanyak 2 ose dengan menggunakan batang ose ujung bulat. Bakteri dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 ml NaCl 0,90% steril. Pengenceran dilakukan hingga memperoleh standar kekeruhan dengan jumlah bakteri 10^8 (CFU/ml) atau hingga memenuhi syarat uji kepekaan sesuai standar *Mc Farland* (10^7 - 10^8 CFU/ml). Untuk memastikan hingga mendapat standar kekeruhan yang diinginkan dapat diukur dengan spektrofotometer hingga mencapai nilai absorbansi dengan nilai 0,1 sehingga setara dengan *Mc Farland*.
- 7) Pengujian aktivitas antibakteri
- a) Uji aktivitas antibakteri pada madu hitam dan madu hutan dengan metode *disc diffusion* menggunakan *paper disk* ukuran 5 mm. Kertas cakram steril ditetesi sebanyak 25 µl menggunakan pipet mikro dengan masing-masing konsentrasi madu hitam dan madu hutan. Pemberian sampel pada kertas cakram dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Pemberian Konsentrasi Madu pada Kertas Cakram

b) Media MHA yang telah memadat dan dingin selanjutnya ditanam bakteri. Suspensi bakteri ditanami dan diratakan hingga merata menggunakan *spreader*. Semua dilakukan dalam keadaan aseptis di *laminar air flow*. Kertas disk yang berisi sampel diletakkan di atas media MHA. Rancangan metode *disc diffusion* dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Rancangan Metode *disc diffusion*

Perlakuan terhadap bakteri *E.coli* dapat dijabarkan sebagai berikut :

- (1) Kontrol Positif (KO) : 10 ml media MHA + Suspensi bakteri + ciprofloxacin 0,1 ml
- (2) Kontrol negatif (KØ) : 10 ml media MHA + Suspensi bakteri + aquades steril

(3) Kontrol media : 10 ml media MHA

(4) Cawan 1 : 10 ml media MHA + Suspensi bakteri + konsentrasi madu hitam 100% + konsentrasi madu hutan 100% + ciprofloxacin 0,1 ml

(5) Cawan 2 : 10 ml media MHA + Suspensi bakteri + konsentrasi madu hitam 80% + konsentrasi madu hutan 40% + aquades steril

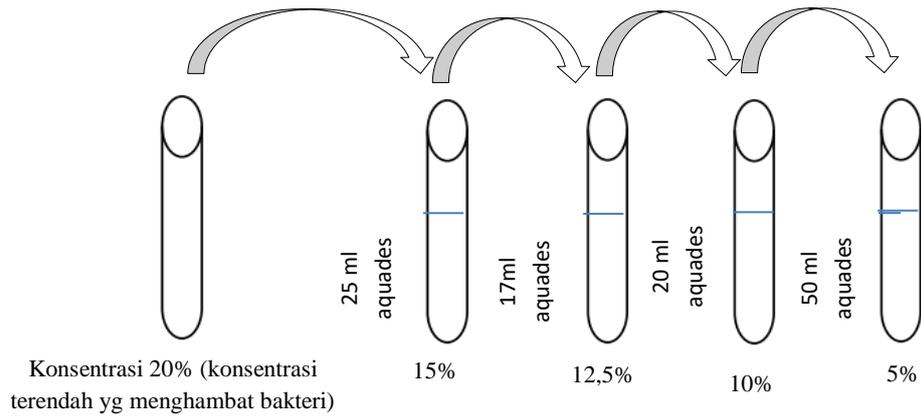
(6) Cawan 3 : 10 ml media MHA + Suspensi bakteri + konsentrasi madu hitam 20% + konsentrasi madu hutan 60% + konsentrasi madu hitam 40%

(7) Cawan 4 : 10 ml media MHA + Suspensi bakteri + konsentrasi madu hitam 60% + konsentrasi madu hutan 80% + konsentrasi madu hutan 20%

Kemudian semua media uji diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pada setiap perlakuan dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan. Pengamatan dilakukan dengan bantuan kaca pembesar. Pengamatan lanjutan dengan mikroskop stereo dan *colony counter*. Ukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong digital.

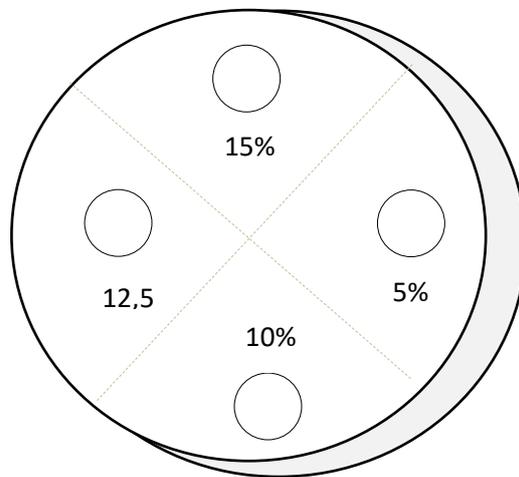
8) Uji Kadar Hambat Minimum (KHM)

Konsentrasi terkecil dari sampel masing-masing madu yang mampu menghambat bakteri diinokulasikan dengan terbentuknya zona bening yang akan menjadi nilai. Pertama sediakan tabung reaksi dan cawan petri steril. Lakukan penurunan konsentrasi di setiap tabung reaksi. Sebelumnya sediakan larutan stok dan diencerkan dengan aquades steril. Penurunan konsentrasi larutan dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Penurunan Konsentrasi Larutan

Kertas cakram ditetesi larutan sampel sebanyak 25 μ l dengan berbagai konsentrasi yang telah disiapkan. Penuangan media MHA yg sebelumnya telah disterilkan dalam *autoclave*. Media MHA yang telah memadat dan dingin kemudian ditanami bakteri dalam keadaan aseptis. Bakteri diratakan menggunakan *spreader*. Kertas cakram yang berisi sampel diletakkan dalam media MHA dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Rancangan Uji KHM

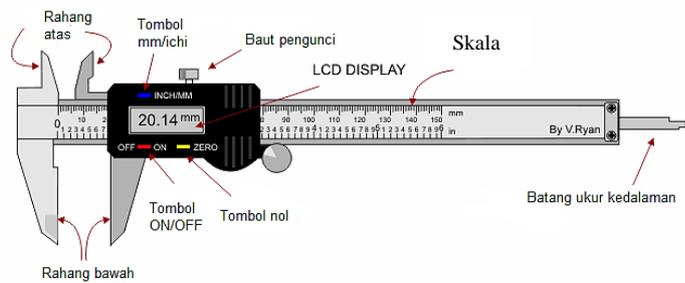
Inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 $^{\circ}$ C. Pengamatan dilakukan dengan mengamati zona bening yang terbentuk dari sampel yang mampu menghambat bakteri yang menjadi nilai KHM dari masing-masing sampel madu. Pertumbuhan bakteri diamati dengan

mikroskop stereo dan *colony counter*. Pengukuran zona bening dilakukan dengan jangka sorong digital.

Alat ukur yang digunakan :

1) Zona hambat pertumbuhan bakteri

Zona hambat pertumbuhan bakteri *E. coli* diperoleh dengan cara pengukuran diameter zona bening yang terbentuk akibat aktivitas antibakteri secara langsung menggunakan alat jangka sorong digital. Satuan yang digunakan yaitu milimeter. Alat pengukuran jangka sorong digital dapat dilihat pada Gambar 12.



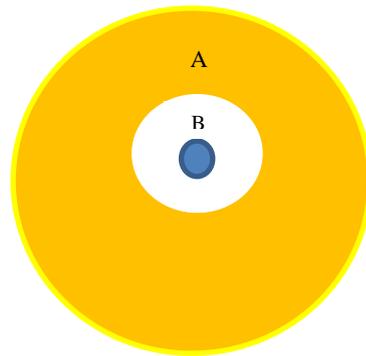
Gambar 12. Alat Ukur Jangka Sorong Digital

Jangka sorong digital dapat mengukur minimal 0,10 mm hingga maksimal 150 mm. Skala jangka sorong digital secara detail dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Skala Jangka Sorong Digital

Setelah mengukur diameter zona bening kemudian melakukan pencarian zona hambatan pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Gambar 14.



Keterangan :

A : Daerah zona Hambat

B : Paper Disk

Gambar 14. Rancangan Hasil Percobaan

Sehingga diperoleh cara penghitungan zona hambat :

$$\text{Diameter Zona Bening} = \text{Diameter A} - \text{Diameter B}$$

G. Analisa Data

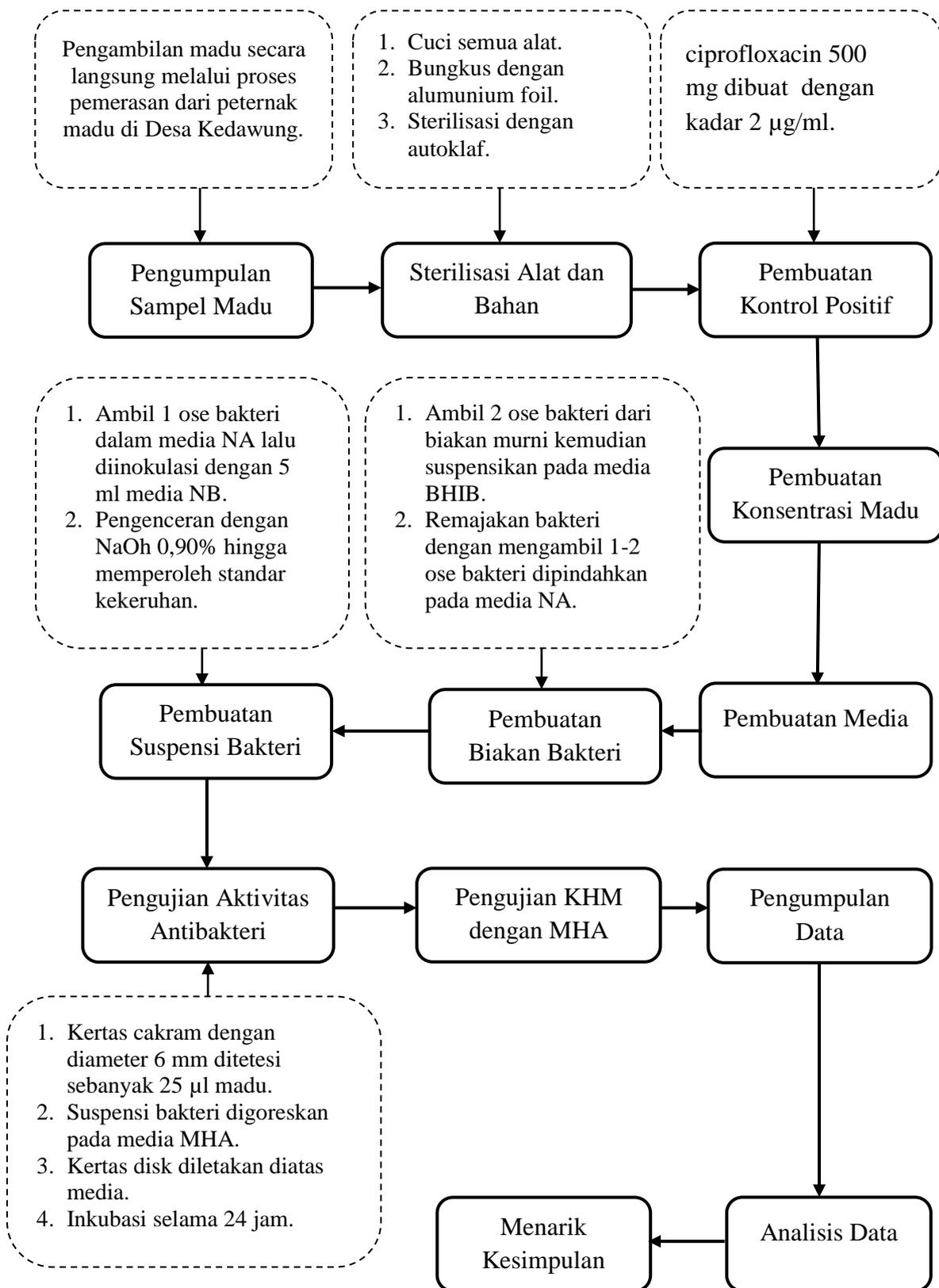
Teknik pengumpulan data yang digunakan pada penelitian yang akan dilaksanakan dengan mengelompokkan data dalam berbentuk angka atau bilangan dan tabulating atau data yang disajikan dalam bentuk tabel. Analisa data yang digunakan adalah data yang diperoleh dari pengukuran zona hambat yang terbentuk.

Data zona hambat diperoleh dalam satuan mm dan diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Dilanjut dengan uji homogenitas variansi. Jika berdistribusi normal dan variansi datanya homogen maka dilanjutkan dengan uji *independent sample T-Test* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara dua kelompok. Jika salah satu syarat tidak terpenuhi maka digunakan uji non parametrik yaitu uji *Mann-Whitney*.

Data KHM dianalisis secara kualitatif. Hal tersebut dilihat dari diameter zona hambat yang masih terbentuk dari larutan konsentrasi yang diturunkan konsentrasinya sehingga menjadi indikasi dari hambatan kadar minimum (KHM) yang terbentuk dari masing-masing konsentrasi madu terhadap bakteri *E.coli*.

H. Alur Kerja Penelitian

Metodologi penelitian bertujuan untuk menyelesaikan masalah yang ada secara terstruktur. Berikut pembagian dari *flowchart* penelitian yang akan dilaksanakan ditunjukkan pada Gambar 15.



Gambar 15. Flowchart Penelitian

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Gambaran Umum Lokasi Pengambilan Sampel dan Lokasi Penelitian

1. Lokasi Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel penelitian dilakukan di Desa Kedawung, Kecamatan Banyuputih, Kabupaten Batang, Jawa Tengah. Desa Kedawung memiliki jarak 34 km dari ibu kota kabupaten. Adapun batas wilayah :

- Sebelah utara : Laut Jawa
- Sebelah timur : Kecamatan Gringsing
- Sebelah barat : Kecamatan Subah
- Sebelah selatan : Kecamatan Limpung

Gambaran Desa Kedawung dapat dilihat dilihat pada Gambar 16 bawah ini.



Gambar 16. Peta Desa Kedawung, Kecamatan Banyuputih, Batang

Desa Kedawung terkenal dengan perkebunan karetinya yang sangat luas. Desa Kedawung banyak yang menjadi peternak lebah

madu. Potensi madu yang ada di desa ini sangat terkenal hingga diluar daerah Kabupaten Batang. Rata-rata peternak lebah madu di desa Kedawung dapat menghasilkan lebih dari 10 kilogram madu dalam sekali panen dan dapat dipanen sebanyak 3 kali pertahun.

Pengambilan sampel dilakukan pada hari minggu dimulai pukul 10.00 WIB sampai pukul 14.00 WIB. Pengambilan sampel madu hutan pukul 09.00 WIB sampai pukul 10.00 WIB. Dilanjutkan pengambilan sampel madu hitam pada pukul 13.00 WIB sampai 14.00 WIB. Pengambilan sampel didampingi oleh peternak lebah madu.

2. Lokasi Penelitian

Penelitian uji aktivitas antibakteri dilakukan di laboratorium mikrobiologi. Laboratorium ini merupakan salah satu laboratorium yang berada di Laboratorium Saintek Terpadu Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang. Laboratorium Saintek Terpadu berlokasi di Kampus 3 UIN Walisongo, Jl. Prof. Dr. Hamka, Tambakaji, Ngaliyan, Kota Semarang, Jawa Tengah, 50185.

Penelitian dilakukan pada tanggal 13 Juni 2022 sampai tanggal 15 Juli 2022. Penelitian dilakukan mulai dari pukul 09.00 WIB hingga pukul 14.00 WIB selama kurang lebih 1 bulan lebih 2 hari lamanya. Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan pada hari Selasa, 28 Juni 2022 pukul 13.00 WIB. Pengukuran KHM dilakukan pada Kamis, 16 Juli 2022 pukul 11.00 WIB.

B. Deskripsi Subjek

Subjek penelitian yang diteliti merupakan madu hitam dan madu hutan yang berasal dari peternak lebah madu di hutan Alas Roban, Batang. Berikut ini adalah gambaran subjek penelitian yang didapatkan dari data observasi dan wawancara yang dilakukan oleh peneliti saat melakukan pengamatan dan pengambilan sampel.

1. Lebah *Apis mellifera*

Madu hitam dan madu hutan yang digunakan sebagai sampel menggunakan salah satu varietas lebah yaitu lebah *Apis mellifera*. Berikut jenis lebah *Apis mellifera* yang diternakan dapat dilihat pada Gambar 17 berikut ini.



Gambar 17. Lebah Pekerja *Apis mellifera*
Sumber : Dokumentasi Peneliti

Koloni lebah terdiri atas tiga kasta yaitu lebah ratu, lebah jantan dan lebah pekerja. Dari hasil pengukuran rata-rata ukuran tubuh lebah pekerja lebih kecil daripada ukuran tubuh lebah ratu dan lebah jantan. Hal tersebut sejalan dengan yang yang diungkapkan Yustejo (2011) jika ukuran tubuh lebah pekerja lebih kecil. Bentuk tubuh yang ramping warna hitam kecoklatan serta terdapat sengat.

Dari hasil wawancara, alasan petani lebah madu hitam dan madu hutan menggunakan varietas lebah ini karena lebih unggul dibandingkan varietas lebah lainnya, mudah dibudidayakan, tidak agresif, dan menghasilkan madu yang melimpah. Lebah *Apis mellifera* dapat beradaptasi baik dengan berbagai jenis iklim. Lebah ini dapat mencari makan dalam radius minimal 3 km – 4 km dari sarang. Dalam satu tahun *Apis mellifera* dapat menghasilkan sekitar 30 kg – 40 kg madu hitam dan 20 kg – 25 kg madu hutan.

Pakan dari lebah *Apis mellifera* penghasil madu hitam berupa nektar dari pohon mahoni. Pakan dari lebah *Apis mellifera* penghasil madu hutan berupa nektar dari pohon randu, rambutan, dan karet.

Perbedaan pakan ini disesuaikan dengan peletakan sarang dengan radius pakan lebah. Lebah tersebut akan menghisap nektar sesuai dengan dominasi nektar di wilayahnya.

Lebah varietas *Apis mellifera* sangat diminati oleh peternak madu di Jawa Tengah khususnya di Kabupaten Batang. Pakan dari lebah ini menyesuaikan dengan peletakan sarang dan menyesuaikan kelimpahan pakan di lingkungan sekitar sarang. Lebah *Apis mellifera* menghasilkan madu hitam dengan mengambil pakan pada pohon mahoni. Pada madu hutan pakan dari lebah ini yaitu nektar pada beberapa pohon di sekitar sarang seperti pohon rambutan, randu, dan karet.

Lebah *Apis mellifera* memiliki tiga segmen dari bagian belakang abdomen berwarna kuning. Varietas ini tidak agresif dan mudah ditenakan dan memiliki produktivitas madu yang sangat tinggi. Selain itu lebah *Apis mellifera* sangat tahan terhadap bakteri dan hama. *Apis mellifera* mencari makan berupa nektar dan tepung sari pada tanaman disekitar area sarang. Pada musim kemarau koloni lebah lebih leluasa dalam mencari pakan. Sehingga di musim kemarau peternak lebah ini lebih banyak memanen madu dibandingkan pada musim hujan (Budiwijono, 2012: 112).

2. Madu Hitam

Madu hitam memiliki ciri khas warna coklat sedikit kehitaman dibandingkan dengan madu jenis lainnya yang umumnya memiliki warna coklat kekuningan hingga coklat tua. Sampel madu hitam termasuk dalam madu monoflora. Madu hitam yang diteliti berasal dari madu segar dari nektar pohon mahoni dari kawasan hutan sekitar desa Kedawung. Memiliki warna madu lebih hitam dibanding dengan madu jenis lainnya. Madu ini memiliki tekstur agak kental dan bau khas seperti madu. Rasa yang dihasilkan sedikit agak pahit. Madu hitam memiliki pH 4 setelah dilakukan uji menggunakan indikator pH. Madu hitam dapat dilihat pada Gambar 18 dibawah ini.



Gambar 18. Sampel Madu Hutan

(A : Madu hitam kotak 5 frame ke 4; B : Madu hitam kotak 2 frame ke 3)

Lokasi peternakan lebah madu hitam berada di tengah-tengah perkebunan. Kotak sarang lebah diletakkan setinggi kurang dari 1,5 meter dari atas tanah. Alasannya agar mudah dalam pengecekan dan pemeliharaan sarang lebah. Kebutuhan air di sekitar lokasi peternakan lebah madu sangat terpenuhi karena dekat dengan lokasi sumber mata air. Setiap seminggu sekali dilakukan pengecekan pada setiap kotak sarang lebah sehingga kondisi kandang terawat dan bersih. Lingkungan peternakan lebah bebas dari hama dan pestisida. Tidak ada *treatment* khusus yang dilakukan pada lebah sehingga madu yang dihasilkan murni dari nektar pohon mahoni. Berikut pengambilan sampel madu hitam dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Pengambilan Sampel Madu Hitam

(Koloni madu hitam dari kotak 2 frame ke 3)

Anchling (2007) menjelaskan madu memiliki warna lebih gelap cenderung banyak kandungan mineral dan kandungan fenolik yang lebih tinggi dibandingkan warna madu yang lebih terang. Eleazu *et al* (2013) menerangkan warna gelap yang dihasilkan dipengaruhi oleh faktor lama penyimpanan, suhu, dan proses pengolahan. Warna madu hitam pada sampel memiliki warna yang hitam. Karakteristik madu yang dihasilkan nektar pohon mahoni biasanya menghasilkan warna madu yang lebih gelap. Warna madu yang dihasilkan pada sampel sejalan dengan penelitian Sihombing (2005) jika warna madu dipengaruhi oleh sumber nektar yang dikonsumsi oleh lebah.

Kesegaran madu dapat dilihat dari indikasi pH yang dihasilkan madu. Rasa dan aroma pada madu dipengaruhi oleh pH madu. Budi (2016) mengungkapkan bahwa pH terendah dan rasa yang asam mampu mencegah pertumbuhan bakteri penyebab infeksi. Hasil test pH menunjukkan pH madu hitam sebesar 4. Madu yang bersifat asam memiliki manfaat dapat mencegah pertumbuhan bakteri. Karena dalam keadaan asam bakteri patogen tidak dapat bertahan hidup. Hasil ini sesuai dengan Fitriyaningsih *et al* (2014) madu hitam yang diteliti ber-pH 4. Pada madu hitam memiliki pH 3, 4 sampai 6,1 sehingga indikasi madu masih segar (Gulfraz dkk., 2010 dikutip dari Khalil dkk., 2012).

3. Madu Hutan

Madu hutan berasal dari lebah yang menghisap berbagai nektar di kawasan hutan. Madu hutan menjadi hasil hutan bukan kayu yang dapat menjadi potensi ekonomi bagi masyarakat. Madu hutan memiliki manfaat kesehatan karena mengandung banyak nutrisi. Madu hutan pada sampel penelitian ini termasuk dalam madu multiflora. Madu hutan yang diteliti berasal dari madu segar dari nektar bunga pohon randu, rambutan, dan karet. Madu hutan ini dari kawasan Hutan Alas Roban, Desa Kedawung, Kabupaten Batang, Jawa Tengah. Madu ini memiliki warna madu yang coklat agak kekuningan serta tekstur agak kental dan bau khas seperti madu. Memiliki rasa yang manis. Madu

hutan memiliki pH 5 setelah dilakukan uji menggunakan indikator pH. Madu hutan dapat dilihat pada Gambar 20 berikut ini.



Gambar 20. Madu Hutan

(A. madu hutan kotak 14 sisiran ke 3; B. madu hutan kotak 10 sisiran ke 2)

Lokasi peternakan lebah madu hutan berada di tengah-tengah perkebunan pohon karet. Kotak sarang lebah diletakan secara menggantung. Hal tersebut dilakukan untuk menciptakan suasana sarang sama dengan daerah asalnya. Kebutuhan air untuk lebah sangat terpenuhi karena dekat dengan lokasi sumber mata air. Setiap seminggu sekali dilakukan pengecekan pada kandang lebah sehingga kondisi kandang terawat dan bersih. Lingkungan peternakan lebah bebas hama dan pestisida. Tidak ada *treatment* khusus yang dilakukan pada lebah sehingga madu yang dihasilkan murni. Pengambilan sampel madu hutan dapat dilihat pada Gambar 21 dibawah ini.



Gambar 21. Pengambilan Sampel Madu Hutan

(A : Lokasi peternak lebah madu hutan; B : Pengambilan sampel madu hutan)

Madu hutan memiliki warna yang bervariasi dari warna putih hingga hitam. Warna madu umumnya tidak mempengaruhi kualitas dari madu. Warna madu berasal dari jenis dan sumber pakan dari lebah. Kebanyakan madu hutan dari Alas Roban didominasi oleh warna coklat agak kekuningan. Warna madu hutan juga dapat berubah tergantung dari asal sumber nektar. Warna pada madu hutan ini sejalan dengan Chayati (2008: 12) menjelaskan jika sumber nektar bunga penyebab dari perbedaan karakteristik madu.

Kualitas dan keaslian madu ditentukan dari sifat fisik madu. Selain dari segi warna, aroma, dan rasa, kesegaran madu dapat diukur dari tingkat keasaman madu (pH). Sampel madu hutan pada penelitian ini memiliki pH sebesar 5. Madu dengan pH tersebut termasuk dalam kategori madu segar walau tingkat keasamannya dibawah madu hitam. Derajat keasaman madu hutan ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri karena masih dalam kategori asam. Hal ini sesuai penelitian Lismayeni *et al* (2018: 22) pada madu hutan Riau yang memiliki pH madu berkisar 3,1 sampai 5,1. Tingkat keasaman pada madu hutan sesuai dengan standar kualitas yang baik untuk dikonsumsi. Produk pangan yang sesuai dengan standart diharapkan tidak bertentangan dengan nilai agama, kepercayaan, dan sosial-budaya masyarakat agar aman dan tidak memberikan rasa khawatir saat dikonsumsi oleh masyarakat (Kurniati, 2020: 70-71).

C. Hasil dan Pembahasan

1. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Madu Hitam dan Madu Hutan dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *E. coli*

Penelitian yang dilakukan untuk menguji aktivitas antibakteri pada madu hitam dan madu hutan terhadap bakteri *E. coli*. Penelitian dilakukan menggunakan metode difusi dengan media MHA. Metode cakram menjadi salah satu uji yang digunakan untuk melihat aktivitas antibakteri dari madu hitam dan madu hutan terhadap bakteri *E.coli*.

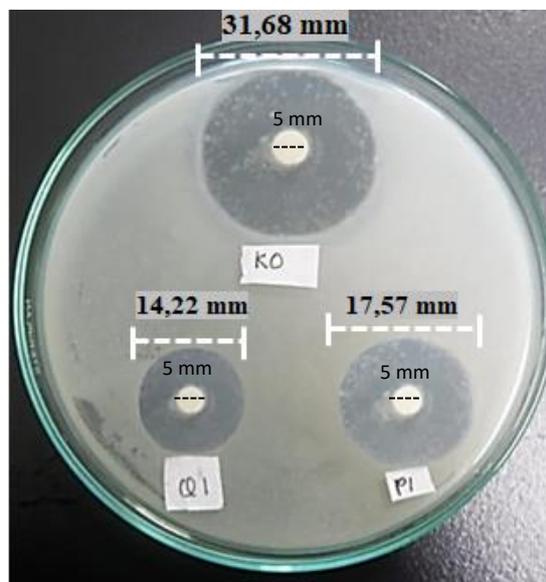
Setiap satu agar diberikan tiga cakram yang masing-masing ditetesi larutan konsentrasi yang berbeda-beda. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Terbentuknya zona hambat pada kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas antibakteri yang diukur dengan jangka sorong digital dengan satuan milimeter. Semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk maka semakin besar pula aktivitas antibakteri. Davis & Stout (1971, dikutip dalam jurnal Ngajow *et al.*, 2013) menetapkan zona hambat antibakteri diklasifikasikan berdasarkan pada tabel 8 berikut.

Tabel 8. Klasifikasi Zona Hambat Antibakteri

Diameter Zona Antibakteri	Kategori
≥ 20 mm	Sangat Kuat
20 – 10 mm	Kuat
10 – 5 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

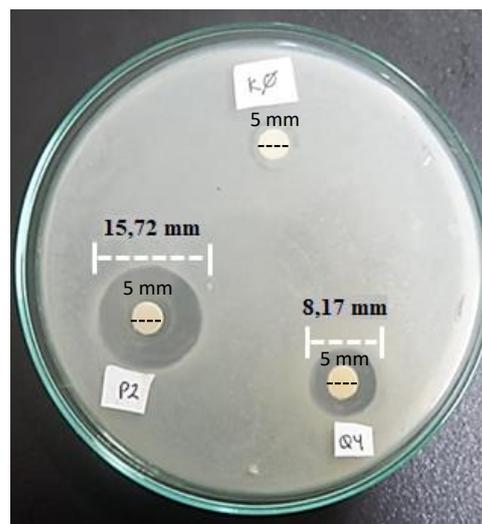
Sumber : Davis & Stout 1971

Hasil penelitian perbandingan aktivitas antibakteri pada madu hitam dan madu hutan terhadap bakteri *E. coli* dengan teknik difusi agar dapat dilihat pada gambar 22 dibawah ini.



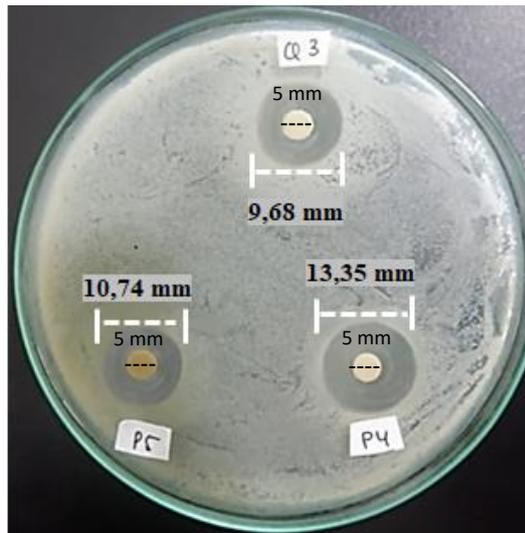
Gambar 22. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri pada Cawan 1
(P1 : Madu hitam 100%; Q1 : Madu hutan 100%; KO : Kontrol positif)

Pada Gambar 24 menunjukkan hasil bahwa sampel larutan madu hitam 100%, madu hutan 100%, dan kontrol positif menggunakan antibiotik ciprofloxacin 500 mg masing-masing memiliki zona hambat antibakteri. Diameter zona hambat terbesar pada kontrol positif yaitu antibiotik ciprofloxacin 500 mg. Ciprofloxacin termasuk dalam antibiotik golongan quinolone. Antibiotik ini dapat menghentikan pertumbuhan bakteri *E.coli*. Muslim *et al* (2020: 209) menjelaskan mekanisme antibiotik ini dengan cara menghambat kerja pada enzim DNA bakteri dalam pembelahan sel bakteri. Selain itu antibiotik ciprofloxacin sering digunakan sebagai pengobatan infeksi oleh bakteri seperti diare. Diameter zona hambat pada cawan 2 dapat dilihat pada Gambar 23 dibawah ini.



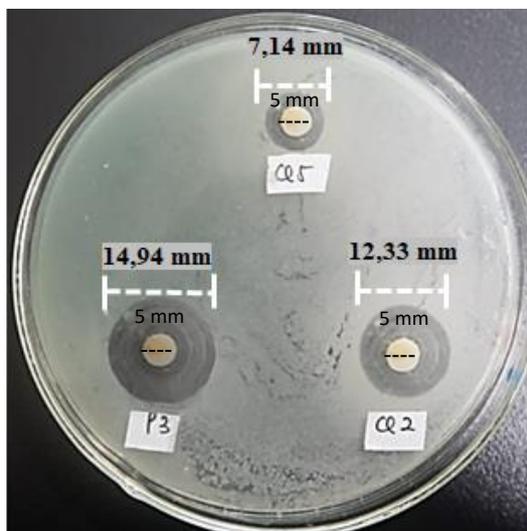
Gambar 23. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri pada Cawan 2
(P2 : Madu hitam 80%; Q4 : Madu hutan 40%; KØ : Kontrol negatif)

Gambar 23 menunjukkan hasil jika sampel larutan madu hitam konsentrasi 80% dan madu hutan konsentrasi 40%, memiliki zona hambat antibakteri. Kontrol negatif yaitu aquades steril tidak menunjukkan zona hambat antibakteri. Pada cawan 2 diameter zona hambat terbesar pada madu hitam dengan konsentrasi 80%. Diameter zona hambat pada cawan 3 dapat dilihat pada Gambar 24.



Gambar 24. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri pada Cawan 3
(P5 : Madu hitam 20%; P4 : Madu hitam 40%; Q3 : Madu hutan 60%)

Gambar 24 menunjukkan hasil bahwa sampel larutan madu hitam konsentrasi 40%, madu hitam konsentrasi 20%, dan madu hutan konsentrasi 60%, memiliki zona hambat antibakteri. Pada cawan 3 diameter zona hambat terbesar pada madu hitam dengan konsentrasi 40%. Zona hambat pada cawan 4 dapat pada Gambar 25.



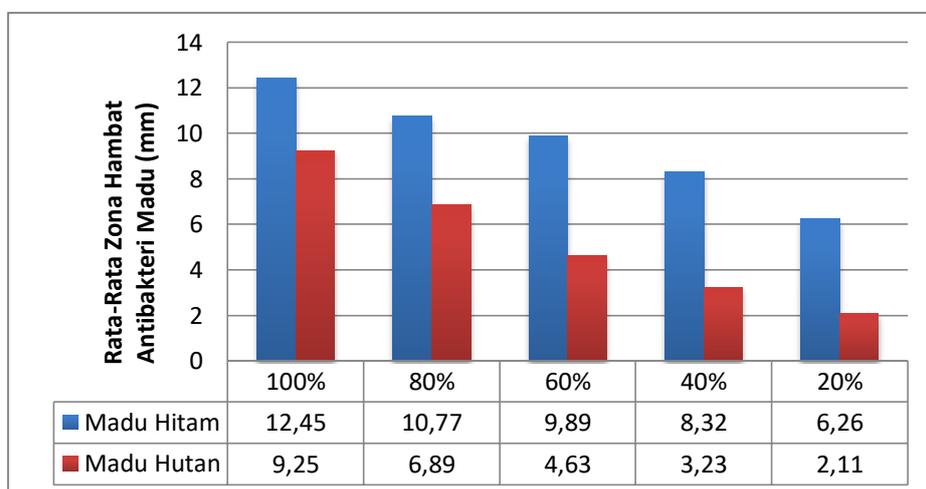
Gambar 25. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri pada Cawan 4
(P3 : Madu hitam 60%; Q2 : Madu hutan 80%; Q5 : Madu hutan 20%)

Gambar 25 menunjukkan hasil bahwa jika larutan madu hitam konsentrasi 60%, madu hutan konsentrasi 80%, dan madu hutan konsentrasi 20% memiliki zona hambat antibakteri. Pada cawan 4 diameter zona hambat terbesar pada madu hitam dengan konsentrasi 60%. Pada hasil penelitian yang dilakukan menggunakan sampel larutan madu hitam dan madu hutan dengan masing-masing konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, 20%. Kontrol positif menggunakan antibiotik ciprofloxacin 500 mg dan kontrol negatif menggunakan aquades steril. Rata-rata diameter zona bening pada masing-masing sampel dapat dilihat pada Tabel 9 berikut.

Tabel 9. Rata-rata Diameter Zona Hambat Antibakteri pada Madu

No.	Sampel Penelitian	Daerah Zona Hambat Total (mm)		Diameter Paper Disk (mm)	Daerah Zona Hambat (mm)		Rata-rata Zona Bening (mm)
		U1	U2		U1	U2	
1.	Kontrol Positif	31,68	34,18	5	26,68	29,18	27,93
2.	Kontrol Negatif	0	0	5	0	0	0
3.	P1	17,57	17,32	5	12,57	12,32	12,45
4.	P2	15,72	15,81	5	10,72	10,81	10,77
5.	P3	14,94	14,83	5	9,94	9,83	9,89
6.	P4	13,35	13,29	5	8,35	8,29	8,32
7.	P5	11,78	10,74	5	6,78	5,74	6,26
8.	Q1	14,22	14,28	5	9,22	9,28	9,25
9.	Q2	12,33	11,44	5	7,33	6,44	6,89
10.	Q3	9,68	9,57	5	4,68	4,57	4,63
11.	Q4	8,17	8,28	5	3,17	3,28	3,23
12.	Q5	7,14	7,08	5	2,14	2,08	2,11

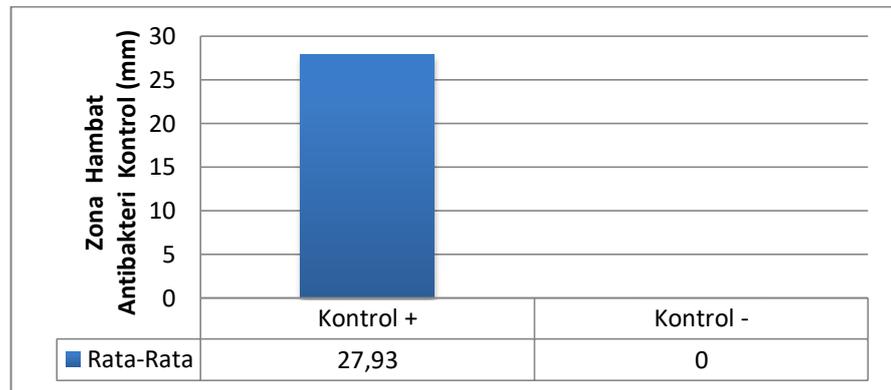
Dari data tabel diatas dapat disajikan rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk dari madu hitam dan madu hutan dapat dilihat pada Gambar 26.



Gambar 26. Rata-rata Diameter Zona Hambat Antibakteri Madu

Gambar diatas menunjukkan madu hitam dan madu hutan memiliki aktivitas antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli*. Hal tersebut terlihat pada diameter zona hambat yang dihasilkan. Madu hitam dan madu hutan yang memiliki zona hambat terbesar yaitu pada madu hitam konsentrasi 100% dengan rata-rata diameter zona bening 12,45 mm termasuk kategori kuat. Madu dengan warna gelap memiliki daya hambat yang optimal daripada madu dengan warna terang. Fitriainingsih (2014: 36) menjelaskan bahwa hambatan pertumbuhan bakteri berhubungan dengan komposisi senyawa hidrogen peroksida dan senyawa fenolik. Madu hitam tinggi hidrogen peroksida dan senyawa fenolik sehingga lebih optimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri dibandingkan jenis madu lainnya.

Penelitian ini menggunakan antibiotik ciprofloxacin 500 mg dengan konsentrasi 0,2% sebagai kontrol positif dan aquades steril sebagai kontrol negatif. Berikut hasil aktivitas antibakteri yang terbentuk dari kontrol uji dapat dilihat pada Gambar 27 dibawah ini.



Gambar 27. Rata-rata Diameter Zona Hambat Antibakteri Kontrol

Pada gambar diatas, kontrol positif menggunakan antibiotik ciprofloxacin 500 mg dengan konsentrasi 0,20% menunjukkan rata-rata zona hambat sebesar 27,93 mm kategori sangat kuat. Kontrol negatif menggunakan aquades steril tidak terdapat adanya zona hambat. Antibiotik ciprofloxacin biasanya digunakan sebagai antibiotik untuk mengatasi penyakit yang diakibatkan oleh berbagai infeksi penyakit diare yang diakibatkan oleh bakteri *E.coli*.

Uji aktivitas antibakteri terhadap madu hitam dan madu hutan dilakukan terhadap bakteri *E.coli* yang bersifat Gram negatif secara *in vitro* dengan metode *disc diffusion*. Dari percobaan uji aktivitas antibakteri madu hitam dan madu hutan terhadap bakteri *E. coli* dilakukan uji statistik untuk melihat apakah terdapat perbedaan perbandingan antara dua kelompok sampel yang diujikan. Uji statistik menggunakan uji *independent sample T-Test*. Data hasil penelitian perbandingan aktivitas antibakteri pada madu hitam dan madu hutan terhadap bakteri *E. coli* dapat dilihat melalui Tabel 10 yang disajikan berikut ini:

Tabel 10. Perbandingan Aktivitas Antibakteri pada Madu

	Sign	Sig. (2-tailed)
Diameter Madu	0,578	0,032

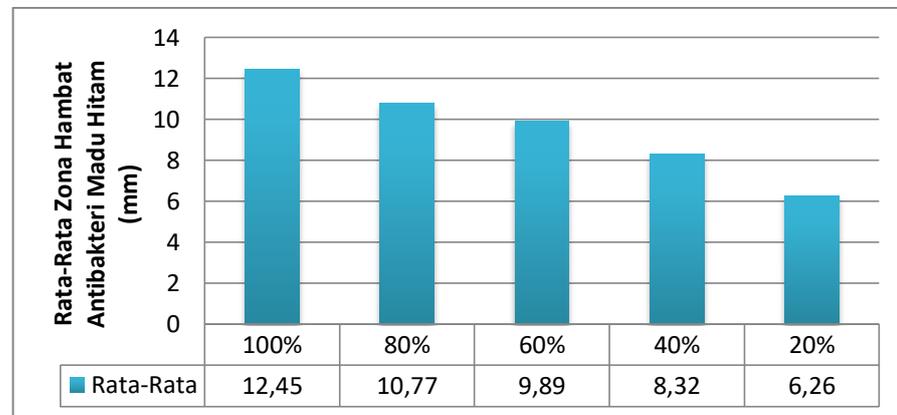
Hasil uji statistik dengan menggunakan uji *independent sample T-Test* pada tabel terlihat bahwa dari hasil perlakuan madu hitam dan madu hutan terhadap bakteri *E.coli* yang diujikan memiliki nilai Sign. (2-tailed) yaitu sebesar 0,032 yang memiliki arti $0,032 < 0,05$. Berdasarkan dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa ada pengaruh perbandingan aktivitas antibakteri madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Pada hasil aktivitas antibakteri madu hitam lebih efektif dibandingkan dengan madu hutan. Penelitian ini sejalan yang dilakukan oleh Suhan (2014) pada madu hitam dan madu murni bahwa terdapat perbandingan aktivitas antibakteri madu hitam dan madu murni. Perbandingan aktivitas antibakteri madu hitam dan madu hutan dipengaruhi oleh kadar antibakteri yang terkandung dalam masing-masing madu.

Nolan *et al* (2019) menerangkan asal madu dapat mempengaruhi jumlah senyawa bioaktif dan kemampuan antibakteri dalam menghambat bakteri. Madu hitam dihasilkan dari nektar pohon mahoni sedangkan asal pakan madu hutan berasal dari berbagai jenis nektar. Sehingga menghasilkan kandungan senyawa antibakteri yang berbeda. Senyawa antibakteri pada madu hitam yang sangat berperan sebagai antibakteri yaitu kandungan senyawa fenol, semakin tinggi kandungan fenol maka semakin tinggi pula kandungan flavonoid pada madu hitam. Madu hitam tinggi kandungan hidrogen peroksida dibandingkan dengan madu hutan. Senyawa fenol dan hidrogen peroksida yang tinggi, madu hitam kaya akan karbohidrat dan vitamin C yang memiliki fungsi lain sebagai zat antibakteri. Madu hutan tinggi senyawa fitokimia dan senyawa non-peroksida seperti flavonoid, glikosida, dan polifenol yang berperan dalam aktivitas antibakteri (Suranto,2008). Walaupun senyawa fenol dan hidrogen peroksida pada madu hutan tidak setinggi senyawa fenol pada madu hutan. Namun, madu hutan tinggi akan vitamin B kompleks seperti riboflavin yang memiliki fungsi lain yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

2. Variasi Konsentrasi Madu Hitam yang Aktif dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *E. coli*

a) Aktivitas Antibakteri Madu Hitam terhadap Bakteri *E. coli*

Aktivitas antibakteri madu hitam dapat dilihat dari diameter zona bening di sekitar cakram yang ditetesi beberapa konsentrasi larutan madu hitam. Diameter zona hambat yang terbentuk dari aktivitas antibakteri pada madu hutan terhadap bakteri *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 28.



Gambar 28. Rata-rata Zona Hambat Antibakteri Madu Hitam

Berdasarkan gambar diatas diameter zona hambat yang terbentuk pada madu hitam menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* pada semua larutan yang diujikan. Pengamatan tersebut menunjukkan hasil pada larutan madu hitam dengan konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20%.

Pada larutan madu hitam konsentrasi 100% rata-rata zona hambat yang terbentuk sebesar 12,45 mm termasuk dalam kategori kuat. Pada konsentrasi 80% memiliki rata-rata zona hambat 10,77 mm termasuk kategori kuat. Konsentrasi larutan madu hitam 60% memiliki rata-rata zona hambat 9,89 mm dalam kategori sedang. Pada konsentrasi 40% memiliki rata-rata zona hambat 8,32 mm termasuk kategori sedang. Dalam konsentrasi 20% memiliki rata-rata zona hambat 6,26 mm memiliki kategori sedang. Zona hambat

antibakteri paling besar yang terbentuk pada madu hitam terdapat pada konsentrasi 100% dengan rata-rata zona bening sebesar 12,45 mm. Zona hambat tersebut dalam kategori kuat. Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Apriyani & Cantika (2021) jika semua konsentrasi madu hitam 100% hingga 20% mampu menghambat Madu hitam dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan konsentrasi terbesar pada konsentrasi 100%. Perbedaan diameter zona hambat yang terbentuk pada setiap konsentrasi membuktikan adanya kemampuan madu hitam dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan kadar yang berbeda-beda. Diameter zona hambat terbentuk akibat dari jumlah zat aktif antibakteri yang terkandung dalam madu hitam. Semakin banyak senyawa antibakteri pada madu hitam maka semakin optimal pula kerja madu dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Madu hitam kaya akan kandungan nutrisi seperti tinggi kandungan karbohidrat. Madu hitam memiliki kadar gula pereduksi sebanyak 77,52%. Jenis gula pereduksi yang terkandung dalam madu hitam seperti glukosa dan fruktosa. Kaligis *et al* (2020: 117) menjelaskan jika madu hitam memiliki sifat bakteriostatik terhadap bakteri *E.coli*. Glukosa dalam madu hitam memiliki peran sebagai antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut Chirife *et al* (1983) mekanisme penghambatan bakteri terjadi adanya glukosa dalam konsentrasi tinggi dapat membentuk lingkungan aktivitas air yang rendah sehingga tekanan osmotik meningkat. Penghambatan pertumbuhan bakteri oleh glukosa diakibatkan oleh kompleks kitosan monosakarida yang berasal dari reaksi Maillard (Aminin, 2002). Reaksi Maillard merupakan reaksi antara gugus amino dan gula pereduksi. Produk reaksi Maillard dapat meningkatkan aktivitas antibakteri (Jing, 2002). Dalam reaksi Maillard gugus amino kitosan bereaksi dengan gugus karbonil gula pereduksi (monosakarida). MRPs yang dihasilkan dari pemanasan

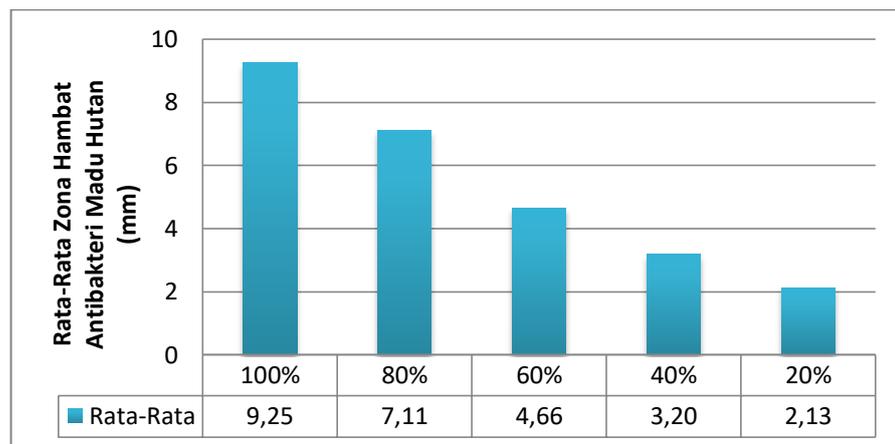
kitosan-glukosa (kompleks kitosan glukosa) menunjukkan aktivitas antibakteri lebih tinggi daripada kitosan atau glukosa saja (Kanatt *et al.*, 2007).

Madu hitam kaya akan vitamin C. Kandungan vitamin C pada madu hitam kurang lebih sebanyak 4 mg per-100 mg madu hitam. Vitamin C dalam madu hitam dapat berfungsi melawan infeksi dan sumber antioksidan. Vitamin C dalam bentuk asam askorbat dapat memiliki sifat antibakteri. Cara kerja vitamin C dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mereduksi *extracellular polymeric substances* (EPS) sehingga menyebabkan kelainan pada pembentukan biofilm bakteri patogen. Bakteri menjadi rentan dan mengalami stress oksidatif. Stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan DNA bakteri. Vitamin C dalam keadaan *in vitro* juga memiliki peran sebagai prooksidan. Sifat prooksidan vitamin C dapat menimbulkan kerusakan DNA bakteri (Vilchèze *et al.*, 2013).

Kemampuan madu hitam dalam menghambat pertumbuhan bakteri diakibatkan dari senyawa aktif dalam madu hitam seperti senyawa flavonoid, hidrogen peroksida, dan senyawa organik lainnya (Kaligis *et al.*, 2020). Madu hitam tinggi kandungan senyawa hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida ini menjadi faktor utama madu sebagai antibakteri. Hidrogen peroksida berfungsi menghambat pembelahan sel bakteri. Hidrogen peroksida bekerja dengan mendenaturasi protein dan menghambat sintesis bakteri menyebabkan kerusakan pada dinding sel dan gangguan sintesis asam nukleat sehingga menghambat pertumbuhan bakteri. Terdapat senyawa alkaloid yang tinggi pada madu hitam. Alkaloid memiliki fungsi untuk mengganggu peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel bakteri tidak berbentuk dengan normal.

b) Aktivitas Antibakteri Madu Hutan terhadap Bakteri *E. coli*

Antibakteri madu hutan dapat dilihat dari diameter zona bening di sekitar cakram yang ditetesi beberapa konsentrasi larutan madu hutan. Diameter zona hambat yang terbentuk dari aktivitas antibakteri pada madu hutan terhadap bakteri *E. coli* dapat dilihat pada gambar 29.



Gambar 29. Rata-rata Zona Hambat Antibakteri Madu Hutan

Berdasarkan gambar diameter zona hambat yang terbentuk pada madu hutan menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* pada semua larutan yang diujikan. Pengamatan tersebut menunjukkan hasil pada larutan madu hutan dengan konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20%.

Pada larutan madu hutan konsentrasi 100% rata-rata zona hambat terbentuk sebesar 9,25 mm termasuk kategori sedang. Pada konsentrasi 80% rata-rata zona hambat 6,89 mm termasuk kategori sedang. Konsentrasi larutan madu hutan 60% rata-rata zona hambat 4,63 mm termasuk kategori lemah. Pada konsentrasi 40% rata-rata zona hambat 3,23 mm termasuk kategori lemah. Konsentrasi 20% rata-rata zona hambat 2,11 mm termasuk kategori lemah. Pada madu hitam terbentuk zona hambat paling besar pada konsentrasi 100% dengan rata-rata zona hambat sebesar 9,25 mm. Konsentrasi 40% dan konsentrasi 20% termasuk dalam kategori sangat lemah. Hal

tersebut dapat terjadi dikarenakan semakin rendah konsentrasi maka jumlah senyawa aktif dalam madu akan semakin sedikit sehingga kemampuan madu dalam menghambat bakteri akan berkurang. Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Sun *et al* (2019) jika semua konsentrasi madu hutan yang diujikan 100% hingga 20% dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan konsentrasi hambat terbesar pada konsentrasi 100%. Perbedaan daya hambat dipengaruhi aktivitas antibakteri madu hutan oleh faktor konsentrasi larutan, kandungan senyawa antibakteri, daya difusi larutan, dan jenis bakteri yang dihambat.

Madu hutan mengandung karbohidrat tinggi dan memiliki lemak yang rendah. Kandungan gula pada madu hutan mencapai lebih dari 80%. Komponen zat gizi tersebut menjadikan madu menjadi makanan fungsional yang baik untuk dikonsumsi. Kandungan karbohidrat yang tinggi pada madu hutan menjadikan madu tersebut memiliki potensi probiotik yang baik bagi tubuh dalam bentuk oligosakarida. Probiotik merupakan komposisi bahan makanan yang mampu memberikan dampak kesehatan karena dapat mendorong pertumbuhan bakteri baik dalam kolon yang dapat meningkatkan kesehatan tubuh. Probiotik memiliki fungsi dapat menangkal radikal bebas dan menghambat pertumbuhan patogen (Prasetyo, 2019). Produksi metabolit pencernaan karbohidrat oleh probiotik dapat menghambat patogen dengan menurunkan pH intraluminal, dengan menghambat perlekatan dan translokasi dari bakteri dan memproduksi peptida antimikroba. Efek pada mikrobiota yang kompleks membantu disbiosis usus, dan mengurangi bakteri. Ikatan antara probiotik dengan mukosa usus, dengan menghasilkan penghambatan ikatan secara kompetitif dan mencegah meningkatnya bakteri patogen (Ganesha, 2014).

Madu hutan mengandung prebiotik yang menjadi makanan dari probiotik. Menurut Davis & Milner (2009), prebiotik merupakan

bahan pangan yang tidak dapat dicerna dalam saluran pencernaan sehingga akan memacu pertumbuhan mikroflora (*Bifidobacteria* dan *Lactobacillus*) pada usus besar. Jenis prebiotik yang umum terdapat terdapat pada makanan adalah inulin, oligosakarida, fruktooligosakarida, galaktooligosakarida, laktulose dan pati resisten. Prebiotik yang tidak mampu dicerna oleh tubuh seperti oligosakarida dapat menjadi sumber karbon untuk bakteri baik. Fermentasi oligosakarida oleh bakteri baik akan menjadi produk berupa asam laktat, asetat, butirat, dan propionat dari lemak rantai pendek (SCFA) (Ringo *et al.*, 2010). Produk tersebut dapat meningkatkan probiotik dan meningkatkan resistensi terhadap bakteri patogen.

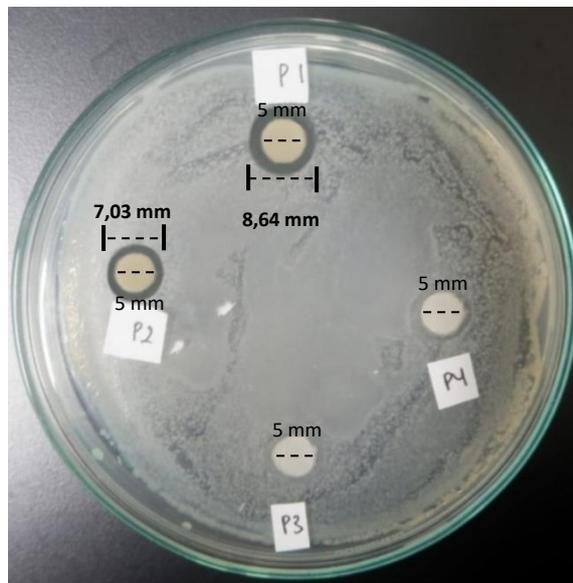
Kandungan lain pada madu hutan yaitu vitamin, mineral, dan senyawa fenolik. Madu hutan mengandung vitamin B kompleks yang tinggi seperti thiamin dan riboflavin. Madu multiflora memiliki kandungan thiamin dan riboflavin yang lebih tinggi dibandingkan dengan jenis madu monoflora. Riboflavin memiliki fungsi dapat menonaktifkan pertumbuhan pertumbuhan berbagai mikroba sehingga riboflavin berpotensi sebagai antibakteri. Vitamin tersebut mampu memanipulasi respon imun inang terhadap mikroba yang menyerang melalui beberapa mekanisme, yang dapat meningkatkan pembersihan patogen dari sel inang dan meningkatkan resistensi inang terhadap infeksi mikroba. Mekanisme ini termasuk stimulasi multiplikasi monosit dan neutrofil, aktivasi dan peningkatan fungsi makrofag, penekanan sitokin pro-inflamasi dan produksi oksida nitrat, dan pengurangan kerusakan jaringan akibat peradangan berlebihan pada sel inang (Farah *et al.*, 2022). Riboflavin memiliki fungsi lain sebagai zat antibakteri yang dapat mendukung nutrisi lain dalam mencegah pertumbuhan bakteri.

Senyawa aktif terdapat pada madu memiliki fungsi antibakteri yang dapat menghambat perkembangan bakteri *E. coli*.

Senyawa flavonoid pada madu hutan memiliki fungsi sebagai penghambat metabolisme sintesis asam nukleat, penghambat fungsi membran sitoplasma, dan penghambat metabolisme energi dari bakteri.

3. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Madu Hitam dan Madu Hutan

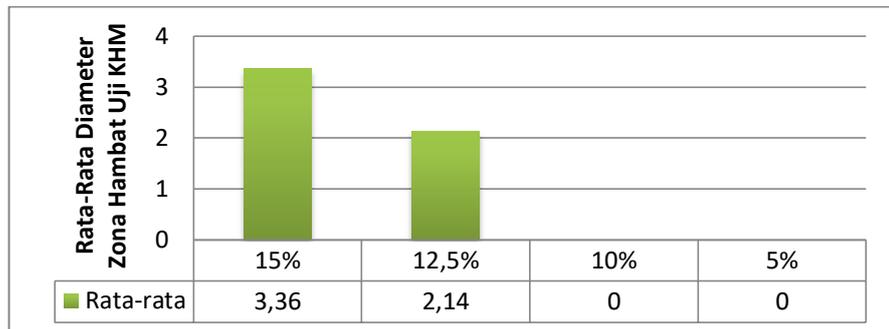
Uji KHM menggunakan metode *disc diffusion* pada madu hitam dan madu hutan dengan menurunkan konsentrasi terendah yang masih aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Berikut hasil penelitian KHM pada madu hitam dilihat pada Gambar 30 dibawah ini.



Gambar 30. Uji KHM Madu Hitam

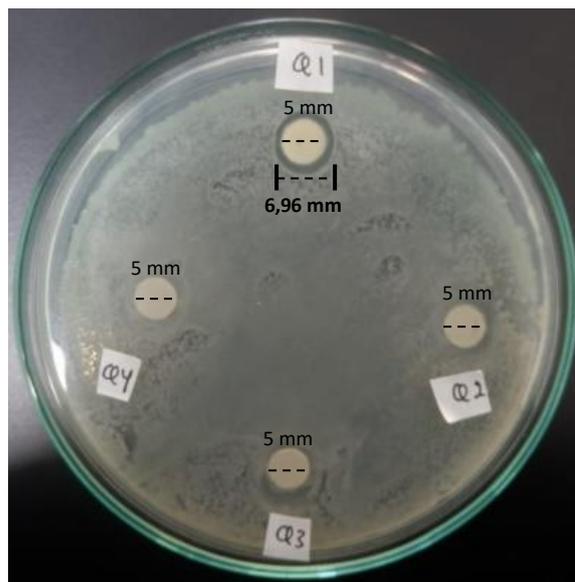
(P1 : madu hitam 15% ; P2 : madu hitam 12,5% ; P3 : madu hitam 10% ; P4 : madu hitam 5%)

Terlihat pada gambar diatas menunjukkan jika konsentrasi pada madu hitam yang masih aktif yaitu pada konsentrasi 15% dan 12,5%. konsentrasi hambat minimum madu hitam pada konsentrasi 12,5%. Pada madu hitam konsentrasi 10% dan 5% sudah tidak timbul zona bening sehingga pada konsentrasi tersebut tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk pada uji KHM madu hitam dapat dilihat pada Gambar 31.



Gambar 31. Rata-rata Zona Hambat Uji KHM Madu Hitam

Rata-rata diameter pada konsentrasi 15% madu hitam sebesar 3,36 mm. Rata-rata diameter pada konsentrasi 12,5% madu hitam sebesar 2,14 mm. Rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk pada uji KHM madu hutan dapat dilihat pada gambar 32.

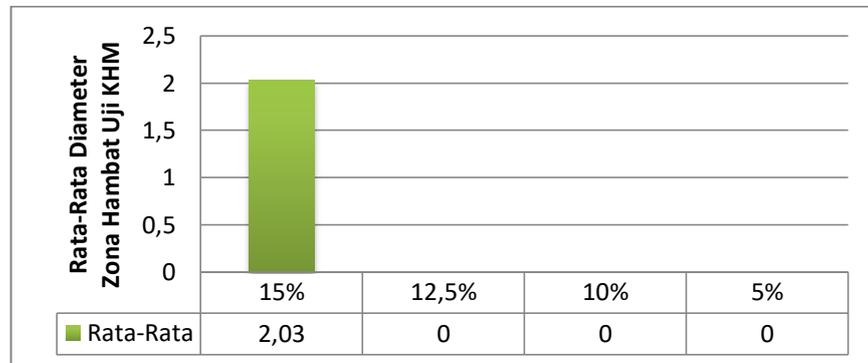


Gambar 32. Uji KHM Madu Hutan

(Q1 : madu hutan 15%; Q2 : madu hutan 12,5%; Q3 : madu hutan 10%; Q4 : madu hutan 5%)

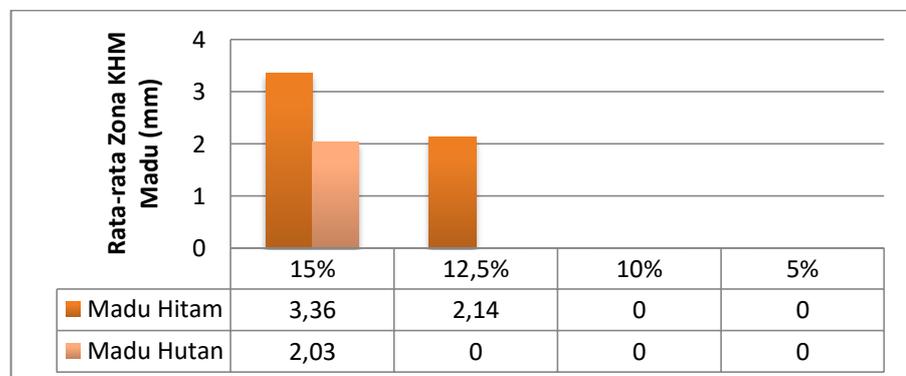
Pada gambar diatas menunjukkan jika konsentrasi pada madu hutan yang masih aktif yaitu pada konsentrasi 15%. konsentrasi hambat minimum madu hutan pada konsentrasi 15%. Pada madu hutan konsentrasi 12,5%, 10%, dan 5% sudah tidak muncul zona bening sehingga pada konsentrasi tersebut tidak menunjukkan aktivitas

antibakteri. Diameter zona hambat yang terbentuk pada uji KHM madu hutan dapat dilihat pada Gambar 33.



Gambar 33. Rata-rata Zona Hambat Uji KHM Madu Hutan

Rata-rata diameter pada konsentrasi 15% madu hutan sebesar 2,03 mm. Uji KHM dilakukan dengan melihat zona bening yang masih terbentuk pada cakram dalam menghambat bakteri *E. coli*. Rata-rata dari hasil pengamatan konsentrasi hambat minimum dengan kadar sampel madu hitam dan madu hutan dapat dilihat pada Gambar 34.



Gambar 34. Rata-rata Diameter Zona Hambat Uji KHM Madu

Hasil tersebut menunjukkan jika konsentrasi hambat minimum pada madu hitam pada konsentrasi 12,5%. Madu hutan memiliki konsentrasi hambat minimum terhadap bakteri pada konsentrasi 15%. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil yang ditemukan oleh Kaligis *et al* (2020: 15) dengan melakukan uji KHM madu terhadap beberapa bakteri yang berbeda dengan metode dilusi menghasilkan konsentrasi

minimum pada madu sebesar 12,5%. Penelitian ini tidak sejalan dengan penelitian *Sun et al* (2019: 72) dengan hasil nilai KHM madu hutan sebesar 40%. Letak perbedaan hasil ini karena faktor dari jenis dan asal madu yang digunakan sebagai sampel memiliki karakteristik yang berbeda serta metode uji yang digunakan juga berbeda sehingga memberikan hasil penelitian yang berbeda. Hasil konsentrasi hambat minimum yang berbeda pada madu hitam dan madu hutan dipengaruhi oleh kadar gula madu yang terkandung pada tiap madu. Semakin tinggi kadar gula maka semakin tinggi pula kemampuan madu dalam menghambat perkembangan bakteri (Fadhmi *et al.*, 2017: 12). Hal tersebut terjadi akibat pengaruh tekanan osmosis. Interaksi yang terjadi mengakibatkan molekul air tertinggal sangat sedikit untuk kelangsungan hidup bakteri. Air yang telah mencapai titik minimum hingga turun secara drastis untuk perkembangan bakteri maka bakteri akan kehilangan kemampuan hidupnya.

Madu termasuk salah satu bahan pangan yang halal. Umat islam meyakini jika madu dapat menjadi makanan dan obat sekaligus yang halal dan *thayyib* (bergizi dan baik). Hal ini dijelaskan dalam hadits Ibnu Mas'ud jika madu menjadi penyembuh segala penyakit dan Al-Qur'an menjadi penyembuh yang ada di dalam dada (Sholahuddin, 2020: 10).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian yang dilakukan peneliti di laboratorium mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang dan analisa data uji statistik menggunakan uji *independent sample T-Test*, berikut ini adalah kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan pada madu hitam dan madu hutan terhadap bakteri *E. coli* terkait perbandingan aktivitas antibakteri madu hitam dan madu hutan dengan difusi agar sebagai berikut :

1. Hasil uji *independent sample T-Test* menunjukkan bahwa terdapat perbandingan aktivitas antibakteri antara madu hitam dan madu hutan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.
2. Variasi konsentrasi madu hitam yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yaitu pada konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20% dengan zona hambat dalam kategori kuat – sedang yaitu 12,45 mm – 6,26 mm. Konsentrasi terbesar madu hitam pada konsentrasi 100% dengan rata-rata zona hambat 12,45 mm.
Variasi konsentrasi madu hutan yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yaitu pada konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20% dengan zona hambat dalam kategori sedang – lemah yaitu 9,25 mm – 3,23 mm. Konsentrasi terbesar madu hutan pada konsentrasi 100% dengan rata-rata zona hambat 9,25 mm.
3. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada madu hitam yang masih aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yaitu pada konsentrasi 12,5% dengan diameter zona hambat sebesar 2,14 mm sedangkan KHM madu hutan yang masih aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yaitu pada konsentrasi 15% dengan diameter zona hambat sebesar 2,03 mm.

B. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat digunakan menjadi dasar penelitian mengenai aktivitas antibakteri pada madu terhadap bakteri terutama bakteri *E.coli*. Saran peneliti untuk penelitian selanjutnya yaitu dapat mengembangkan metode uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan jenis bakteri dan jenis madu yang berbeda. Serta dilakukan pengujian kandungan senyawa aktif pada madu untuk data pendukung penelitian. Saat melakukan penelitian perlu adanya pengendalian jumlah sel bakteri *E.coli* dengan memperhatikan standar *Mc Farland* (10^7 - 10^8 CFU/ml) agar zona hambat yang dihasilkan lebih optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, R. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas L*) dan Gambir (*Uncaria gambir Roxb*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Universitas Islam Negeri Raden Intan Lampung.
- Agus, A., Joko, T. (2021). Literature Review : Faktor Risiko Kejadian Diare pada Balita di Indonesia. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*, 11(1), 1–7. <https://doi.org/10.47718/jkl.v10i2.1166>.
- Al Fady, M. (2015). Madu dan Luka Diabetik. Gosyen Publishing.
- Amin, L. Z. (2015). Tatalaksana Diare Akut. *Continuing Medical Education*, 42, 504–508. https://doi.org/10.5005/jp/books/12945_8
- Aminin, A., Ambarsari, L., Mochtar, H. M. (2002). Produk Reaksi Maillard (MRP) sebagai Antibakteri dan Pengendali Kadar Dekstran dalam Nira. *Jurnal JKSA*, 5(3), 7–10.
- Aprilliana, R. D. (2017). Hubungan antara Luas Sisiran Sarang Polen dan Jumlah Lebah Pencari Pakan oleh Lebah Madu Apis Mellifera. Univeritas Brawijaya.
- Apriyani, R. K., Cantika, S. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Madu Hitam Pahit dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* di Laboratorium Analis Kesehatan Politeknik Piksi Ganesha Bandung. *Jurnal INFOKES-Politeknik Piksi Ganesha*, 5(1), 82–91.
- Atmojo, T. (2016). Media Mueller Hinton Agar - Indonesian Medical Laboratory. <https://medlab.id/media-mueller-hinton-agar/> tanggal 20 Maret 2022.
- Bakri, Z., Hatta, M., Massi, M. N. (2015). Deteksi Keberadaan Bakteri *Escherichia coli* O157:H7 pada Feses Penderita Diare dengan Metode Kultur dan PCR. *Jst Kesehatan*, 5(2).
- Boukraâ, L. (2013). *Honey in Traditional and Modern Medicine*. CRC Press.
- Budi, Y. (2016). Pengaruh pH dan Suhu terhadap Produksi Antibiotik dari Isolat Bakteri Endofitik pada Tumbuhan Andalas. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Andalas.
- Budiwijono, T. (2012). Identifikasi Produktivitas Koloni Lebah Apis Mellifera melalui Mortalitas dan Luas Eraman Pupa di Sarang pada Daerah dengan Ketinggian Berbeda. *Jurnal GAMMA*, 7, 111–123.
- Chayati, I. (2008). Sifat Fisikokimia Madu Monoflora dari Daerah Istimewa Yogyakarta dan Jawa Tengah. *ARITECH*, 28(1), 9–14.

- Cunha, Y., Salosso, Y., Liufeto, F. C. (2020). Eksplorasi Aktivitas Antibakteri Madu Hutan Asal Pulau Timor Terhadap Bakteri *Vibrio Alginolyticus* Secara in Vitro. *Jurnal Aquatik*, 79–85.
- Denata. (2021). Kenali Manfaat Madu Hitam bagi Kesehatan Kita. <http://ners.unair.ac.id/site/index.php/news-fkp-unair/30-lihat/1197-kenali-manfaat-madu-hitam-bagi-kesehatan-kita> tanggal 18 Maret 2022.
- Dwidjoseputro. (2010). Dasar-dasar Mikrobiologi. Djambatan.
- Dwinanda, R. (2019). Ada 20 Juta Kasus Keracunan Pangan per Tahun di Indonesia. <https://www.republika.co.id/berita/q0qmtn414/ada-20-juta-kasus-keracunan-pangan-per-tahun-di-indonesia> tanggal 2 April 2022.
- Eleazu, M. (2013). *Determination of the Physico-Chemical Composition, Microbial Quality and Free Radical Scavenging Activities of Some Commercially Sold Honey Samples in Aba, Nigeria: 'The Effect of Varying Colours.'* *International Journal of Biomedical Research*, 4(1), 32–41. <https://doi.org/10.7439/ijbr>
- Fadhmi, M., Syaokani, E. (2017). Perbandingan Daya Hambat Madu Seulawah dengan Madu Trumon terhadap *Staphylococcus aureus* secara in Vitro. *BIOTIK: Jurnal Ilmiah Biologi Teknologi Dan Kependidikan*, 3(1), 9. <https://doi.org/10.22373/biotik.v3i1.986>
- Farah, N. (2022). *Riboflavin as a Promising Antimicrobial Agent ? A Multi-Perspevtive Review Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100111. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100111>
- Firmansyah, S. B., Firmansyah, A., Hayati, N. (2016). Aktivitas Antioksidan dan Ekstrak Metanol Rumput Laut Antibakteri (*Sargassum Duplicatum* J . Agardh) dan Potensinya sebagai Alternatif Pengawet Alami Telur Asin. *JNSMR Walisongo*, 2(1), 133–142.
- Fitrianingsih, S. P., Khairat, A., Choestrina, R. (2014). Aktivitas Antibakteri Madu Pahit dan Madu Hitam Manis terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmasi Galenika*, 1(2), 32–37.
- Ganesha, I. (2014). Probiotik. Fakultas Medicane. Universitas Udayana.
- Ganiswarana, S. (1995). Farmakologi dan Terapi, Edisi IV.
- Gillespie, S. H., Hawkey, P. M. (2006). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology Second Edition. British Library Cataloguing in Publication Data.*
- Huda, M. (2013). Pengaruh Madu terhadap Pertumbuhan Bakteri Gram Positif (*Staphylococcus aureus*) dan Bakteri Gram Negatif (*Escherichia coli*). *Jurnal Analis Kesehatan*, 2(2), 250–259. ejurnal.poltekkes-tjk.ac.id

- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A. (2005). Mikrobiologi Kedokteran Buku 1. Penerbit Salemba Medika.
- Kaligis, C. J., Nangoy, E., Mambo, C. D. (2020). Uji Efek Antibakteri Madu Hutan dan Madu Hitam terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Unsrat*, 8(1), 112–119.
- Kurniati, W. D. (2020). Keamanan Produk Brem Salak Padat. *Journal of Islamic Studies and Humanities*, 5(1), 61–71. <https://doi.org/10.21580/jish.v5i1.6720>.
- Kusumaningrum, R. (2012). Analisis Usaha Lebah Madu Anggota Paguyuban Peternak Lebah Bunga Alam Lestari Kabupaten Batang. Fakultas Pertanian. Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Lismayeni, F., Hazelina, S. F., Yasmin, N. Z., Minarni. (2018). Karakterisasi Sifat Fisika dan Kimia Madu Asli Riau menggunakan Metode Optik. *Prosiding Seminar Nasional Fisika Universitas Riau*, 22–26.
- Liu, D. (2019). *Escherichia coli*. *Encyclopedia of Microbiology*, 171–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02291-1>
- Marantika, I. (2018). Aktivitas Madu Pohon Sialang dan Madu Pohon Rambutan terhadap Petumbuhan Bakteri *Methcillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Muslim, Z., Mahardika, R. P., Welkriana, P. W. (2020). *Antibiotic Sensitivity of Acute Respiratory Infection Patients in Bhayangkara Hospital Bengkulu*. *Jurnal Teknologi Dan Seni Kesehatan*, 11(1), 31–40.
- Nadhilla, N. F. (2014). *The Activity of Antibacterial Agent of Honey Against Staphylococcus aureus*. *Majority*, 3(7), 94–101.
- Naibaho, F. F. (2018). Evaluasi Penggunaan Antibiotik Pada Pasien Anak Diare dengan Metode Gyssens di Instalasi Rawat Inap RSSV Singkawang. Fakultas Farmasi. Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Ngajow, M., Jemmy, A., Vanda. (2013). Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara *In Vitro*. *Jurnal MIPA UNSRAT*. 128-132.
- Nolan, V. C., Harrison, J., Cox, J. A. G. (2019). *Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey*. *Antibiotics*, 8(4), 1–16.
- Nora, A., Novianti, T., Biomed, S. S. M. (2018). Pengujian Antibakteri dan Aktivitas Antioksidan pada Madu Baduy. Universitas Esa Unggul.

- Nuraini, D. M., Andityas, M., Paramarta, A., Najib, N. R., Wijayanti, A. D. (2020). Isolasi dan Identifikasi *Escherichia coli* dari Sumber Air Minum Kandang Broiler serta Uji Aktivitas Antibakteri Lidah Buaya. *Jurnal Ilmu Peternakan Dan Veteriner Tropis*, 10(2), 106–112.
- Patton, T., Barrett, J., Brennan, J., Moran, N. (2006). *Use of a Spectrophotometric Bioassay for Determination of Microbial Sensitivity to Manuka Honey*. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), 84–95.
- Prasetyo, Agung Dwi., Rustanti, Ninik. (2019). Total Bakteri Asam Laktat, Aktivitas Antioksidan, dan Uji Penerimaan *Soyghurt* Herbal dengan Penambahan Jahe Merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*). *Jurnal Nutri-Sains*, 3(1), 18-27.
- Pratiwi, W., Darmawati, S., Prastiyanto, M. E. (2017). Perbedaan Uji Kepekaan Bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan Media Mueller Hinton Agar dan Nutrient Agar terhadap Antibiotik *Eritromisin*, *Vancomusin*, dan *Chloramphenico*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Prestianti, I. (2017). Uji Aktivitas Ekstrak Sarang Lebah dan Madu Hutan dari Kolaka terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Jurusan Kimia Pada Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Alauddin Makassar.
- Pribadi, A., Wiratmoko, M. E. (2019). Karakter Madu Lebah Hutan (*Apis dorsata Fabr.*) dari berbagai Bioregion di Riau. *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 37(3), 185–200. <https://doi.org/10.20886/jpjh.2019.37.3.184-196>
- Primadi, O. (2020). Profil Kesehatan Indonesia. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. https://doi.org/10.5005/jp/books/11257_5
- Putri, N. A., Asparini, R. R. (2017). Peran Madu Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Pada Luka Bakar. *Saintika Medika*, 13(2), 63. <https://doi.org/10.22219/sm.v13i2.5413>
- Putri, S., Susanto, H., Tambun, S. H., Oktiarso, T. (2022). Uji Aktivitas Antibakteri pada Macam-macam Madu pada Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Agar dan Dilusi Cair. *Sainsbertek Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi*, 2(2), 85–97.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. C., Leonard, F. C. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbiology Disease*. Blackwell Publishing.

- Rahayu, W. P., Nurjanah, S., Komalasari, E. (2018). *Escherichia coli*: Patogenesis, Analisis, dan Kajian Risiko (Edisi 1). PT Penerbit IPB Press.
- Rahmah, C. (2021). Pengaruh Pemberian Madu terhadap Perbaikan Kerusakan Mukosa Gaster dan Penyembuhan Luka pada Penderita Ulkus Peptikum. *Scripta Score Scientific Medical Journal*, 3(1), 61–67.
- Rahmawati, A. (2021). Campuran Infusa Kentang (*Solanum tuberosum L.*) dan Kacang Kedelai (*Glycine max (L.) Merril*) sebagai Media Alternatif Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Yogyakarta.
- Rao, P. V., Krishnan, K. T., Salleh, N., Gan, S. H. (2016). *Biological and Therapeutic Effects of Honey Produced by Honey Bees and Stingless Bees: A Comparative Review*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(5), 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.012>
- Safira, M., Aisy, R. (2020). Studi Literatur Perbedaan Karakteristik Fisik, Kimia dan Kandungan Alkaloid pada Madu Hitam Pahit. 965–971.
- Sahputra, A. (2014). Uji Efektifitas Ekstrak Madu Karet dalam Menghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Sakri, F. (2015). Madu dan Khasiatnya. Diandara Pustaka Indonesia.
- Shihab, Q. M. (2002). Tafsir Al-Misbah. Penerbit Lentera Hati.
- Sholahuddin, M. (2020). Aplikasi Madu Sebagai Bahan Halal Pengganti Pengawet Berformalin Produk Fillet Ikan pada Masa Transportasi. *Journal of Halal Product and Research*, 3(1), 9-18.
- Songer, J. G., Post, K. (2005). *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. Elsevier Saunders.
- Suhan, Rania Yuani. (2014). Aktivitas Antibakteri Madu Pahit dan Madu Manis Murni terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif serta Uji Potensi Antibiotiknya terhadap Tetrasiklin. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Islam Bandung.
- Sun, D. M., Rini, D. I., Nurina, R. L. (2019). Uji Aktivitas Antibakteri Larutan Madu Hutan terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* secara in Vitro. *Cendana Medical Journal*, 16(4), 66–73.
- Suranto, A. (2008). Khasiat dan Manfaat Madu Herbal. Agromedia Pustaka.
- Syahrurachman, A. (1994). Mikrobiologi Kedokteran (Staff Pengajar Bagian Mikrobiologi (ed.); Edisi Revisi). Binarupa Aksara Publisher.

- Syawalludin, R. (2019). Kemampuan Madu Hitam dalam menghambat Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Ilmu Kedokteran Dan Kesehatan*, 6(4), 309–317.
- Utomo, S. B., Fujiyanti, M., Lestari, W. P., Mulyani, S. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa C-4-Metoksifenilkaliks Resorsinarena Termodifikasi Hexadecyltrimethylammonium-Bromide terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *JKPK (Jurnal Kimia Dan Pendidikan Kimia)*, 3(3), 201. <https://doi.org/10.20961/jkpk.v3i3.22742>
- Vilchèze, C., Hartman, T., Weinrick, B., Jacobs, W. R. (2013). *Article Mycobacterium Tuberculosis is Extraordinarily Sensitive to Killing by a Vitamin C-Induced Fenton Reaction*. <https://doi.org/10.1038/ncomms2898>
- Wardhana, B. K. (2014). Efektivitas Ekstrak Madu Karet dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatul.
- Widayanti, M. A. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L.*) dan Bunga Seaptu Kuncup (*Malvaviscus arboreus Cav.*) terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus aureus*. Universitas Sebelas Maret.
- Winen, E., Rasyid, R., Alioes, Y. (2014). Perbandingan Daya Hambat Madu Alami dengan Madu Kemasan secara *In Vitro* terhadap *Streptococcus beta hemolyticus Group A* sebagai Penyebab Faringitis. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 3(3), 376–380.
- Wulansari, D. (2018). Madu sebagai Terapi Komplementer. *Graha Ilmu*.
- Yustejo. (2014). *Ensiklopedia Anatomi Lebah Madu Berbasis Multimedia*. Fakultas Teknologi Industri. Universitas Islam Indonesia Yogyakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Angket Wawancara dan Observasi

LEMBAR OBSERVASI
PENGAMBILAN SAMPEL MADU HITAM

Hari/Tanggal : Rabu, 22 Juni 2022
 Waktu : 10.00
 Tempat : Tengah hutan, Desa kedawung, Batang
 Jenis Lebah : Apis mellifera

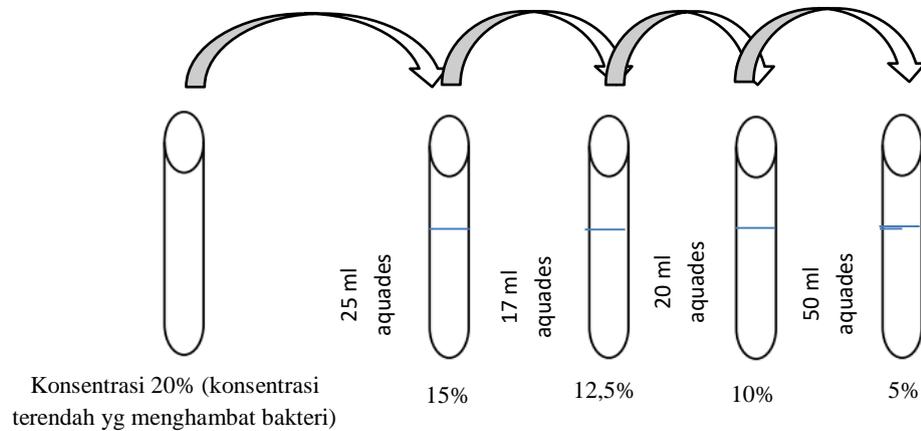
No	Aspek	Indikator	Catatan
1.	Koloni madu	Kondisi koloni madu	koloni lebah dengan kondisi baik, dan menghasilkan banyak madu
2.	Lokasi Pembiakan madu	Sumber Pakan lebah	<input type="checkbox"/> Semua jenis tanaman <input checked="" type="checkbox"/> Salah satu jenis tanaman (mahoni) Lain-lain :
		Kebutuhan air	<input checked="" type="checkbox"/> Dekat sumber mata air <input type="checkbox"/> Jauh dari sumber mata air Lain-lain :
		Kondisi kandang lebah	<input checked="" type="checkbox"/> Terawat dan bersih <input type="checkbox"/> Tidak terawat dan tidak bersih Lain-lain :
		Lingkungan pembiakan lebah	<input checked="" type="checkbox"/> Bebas hama dan pestisida <input type="checkbox"/> Terdapat hama dan pestisida Lain-lain :
3.	Pengambilan madu	Perlengkapan pengambilan madu	Menggunakan perlengkapan seadanya dan tidak menggunakan perlengkapan dan pelindung khusus
4.	Pengolahan madu pasca panen	Penyimpanan madu	disimpan didalam ember dan ditutup seadanya
		Pengemasan madu	Dikemas manual menggunakan botol
5.	Uji Organoleptik	Bau	bau seperti madu
		Rasa	sedikit pahit
		Warna	coklat tua sedikit hitam
		Kebersihan	Madu bersih dan bening
6.	pH madu	SNI pH madu 3,9	pH 4

LEMBAR OBSERVASI
PENGAMBILAN SAMPEL MADU HUTAN

Hari/Tanggal : Rabu, 22 Juni 2022
 Waktu : 13.00
 Tempat : Hutan Karet, Desa Kedawung, Bertung
 Jenis Lebah : Apis mellifera

No	Aspek	Indikator	Catatan
1.	Koloni madu	Kondisi koloni madu	koloni lebah banyak dengan kondisi baik, dan menghasilkan banyak madu
2.	Lokasi Pemiakan madu	Sumber Pakan lebah	<input checked="" type="checkbox"/> Semua jenis tanaman <input type="checkbox"/> Salah satu jenis tanaman Lain-lain :
		Kebutuhan air	<input checked="" type="checkbox"/> Dekat sumber mata air <input type="checkbox"/> Jauh dari sumber mata air Lain-lain :
		Kondisi kandang lebah	<input checked="" type="checkbox"/> Terawat dan bersih <input type="checkbox"/> Tidak terawat dan tidak bersih Lain-lain :
		Lingkungan pemiakan lebah	<input checked="" type="checkbox"/> Bebas hama dan pestisida <input type="checkbox"/> Terdapat hama dan pestisida Lain-lain :
3.	Pengambilan madu	Perlengkapan pengambilan madu	Menggunakan perlengkapan seadanya tanpa perlindungan khusus
4.	Pengolahan madu pasca panen	Penyimpanan madu	disimpan didalam ember dan ditutup Manual
		Pengemasan madu	dikemas didalam botol secara manual
5.	Uji Organoleptik	Bau	seperti madu
		Rasa	Manis
		Warna	coklat kekuningan
		Kebersihan	Bersih
6.	pH madu	SNI pH madu 3,9	pH 5

Lampiran 2. Pembuatan Larutan Konsentrasi Uji KHM



1. Konsentrasi 15%

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 20\% = 100 \times 15\%$$

$$V1 = \frac{15 \times 100}{20}$$

$$V1 = 75 \text{ ml}$$

Sebanyak 75 ml konsentrasi 20% ditambahkan aquades steril hingga mencapai volume 100 ml.

2. Konsentrasi 12,5%

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 15\% = 100 \times 12,5\%$$

$$V1 = \frac{12,5 \times 100}{15}$$

$$V1 = 83 \text{ ml}$$

Sebanyak 83 ml konsentrasi 15% ditambahkan aquades steril hingga mencapai volume 100 ml.

3. Konsentrasi 10%

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 12,5\% = 100 \times 10\%$$

$$V1 = \frac{10 \times 100}{12,5}$$

$$V1 = 80 \text{ ml}$$

Sebanyak 80 ml konsentrasi 12,5% ditambahkan aquades steril hingga mencapai volume 100 ml.

4. Konsentrasi 5%

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 10\% = 100 \times 5\%$$

$$V1 = \frac{5 \times 100}{10}$$

$$V1 = 50 \text{ ml}$$

Sebanyak 50 ml konsentrasi 10% ditambahkan aquades steril hingga mencapai volume 100 ml.

Lampiran 3. Hasil Uji Laboratorium

A. Hasil Penelitian Aktivitas Antibakteri pada Madu

No.	Sampel Penelitian	Daerah Zona Hambat Total (mm)		Diameter Paper Disk (mm)	Daerah Zona Hambat (mm)		Rata-rata Zona Bening (mm)
		U1	U2		U1	U2	
1.	Kontrol Positif	31,68	34,18	5	26,68	29,18	27,93
2.	Kontrol Negatif	0	0	5	0	0	0
3.	P1	17,57	17,32	5	12,57	12,32	12,45
4.	P2	15,72	15,81	5	10,72	10,81	10,77
5.	P3	14,94	14,83	5	9,94	9,83	9,89
6.	P4	13,35	13,29	5	8,35	8,29	8,32
7.	P5	11,78	10,74	5	6,78	5,74	6,26
8.	Q1	14,22	14,28	5	9,22	9,28	9,25
9.	Q2	12,33	11,44	5	7,33	6,44	6,89
10.	Q3	9,68	9,57	5	4,68	4,57	4,63
11.	Q4	8,17	8,28	5	3,17	3,28	3,23
12.	Q5	7,14	7,08	5	2,14	2,08	2,11

B. Hasil Penelitian Uji KHM pada Madu

No	Sampel Penelitian	Daerah Zona Hambat Total (mm)			Diame- ter Paper Disk (mm)	Daerah Zona Hambat (mm)			Rata- rata Zona Bening (mm)
		U1	U 2	U3		U1	U2	U3	
1.	Madu Hitam 15%	8,64	8,3	8,15	5	3,64	3,3	3,15	3,36
2.	Madu Hitam 12,5%	7,03	7,4	7	5	2,03	2,4	2	2,14
3.	Madu Hitam 10%	0	0	0	5	0	0	0	0
4.	Madu Hitam 5%	0	0	0	5	0	0	0	0
5.	Madu Hutan 15%	6,96	7	7,13	5	1,96	2	2,13	2,03
6.	Madu Hutan 12,5%	0	0	0	5	0	0	0	0
7.	Madu Hutan 10%	0	0	0	5	0	0	0	0
8.	Madu Hitam 5%	0	0	0	5	0	0	0	0

Lampiran 4. Hasil Uji SPSS

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Madu Hitam	.159	5	.200*	.991	5	.982
Mau Hutan	.177	5	.200*	.961	5	.816

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
Diameter Madu	Equal variances assumed	.336	.578	2.592	8	.032	4.310	1.663
	Equal variances not assumed			2.592	7.716	.033	4.310	1.663

Lampiran 5. Dokumentasi Peneliti

A. Pengambilan Sampel Madu

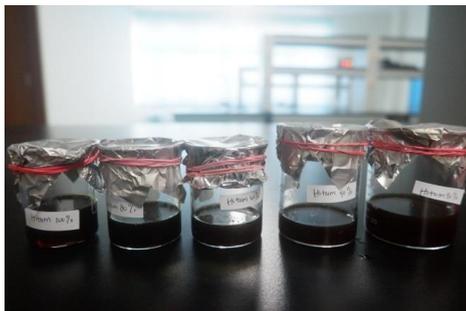


Link Vidio Pengambilan Sampel : <https://youtu.be/dEcUQjoAoGc>

B. Persiapan Alat dan Bahan Penelitian



C. Pembuatan Konsentrasi Madu

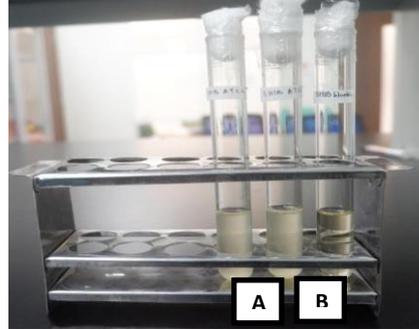


Konsenterasi Madu Hitam



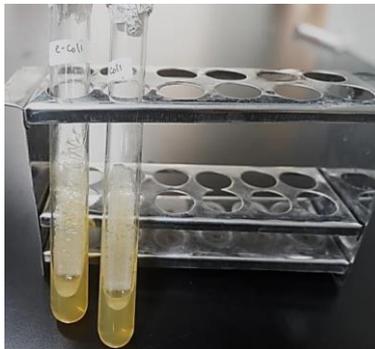
Konsenterasi Madu Hutan

D. Pembuatan Media



Media Pembiakan Bakteri (BHIB)

(A : BHIB ditanam *E. coli*; B : BHIB *blank*)



Media Pembiakan Bakteri (NA)

(Bakteri *E. coli* tumbuh dalam media pembiakan)

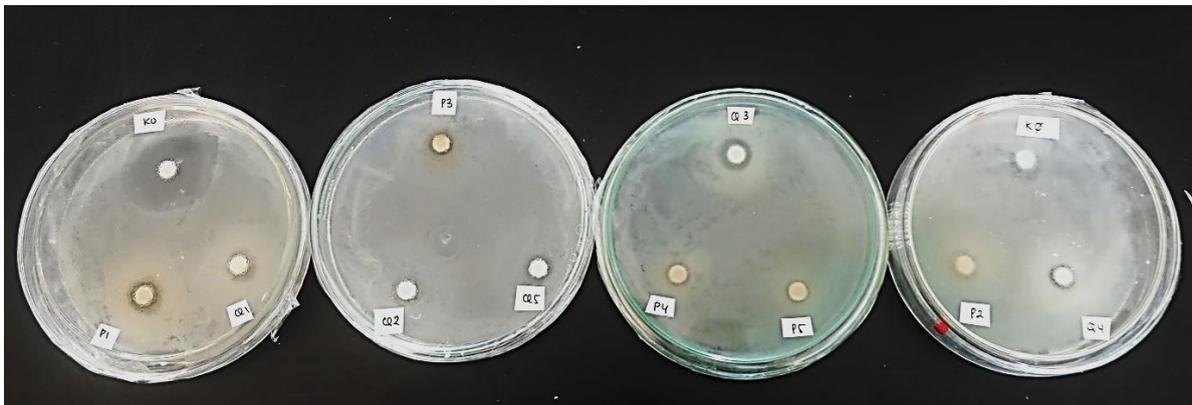


Media Uji Aktivitas Antibakteri (MHA)

E. Pembuatan Suspensi Bakteri dan Pengujian Aktivitas Antibakteri

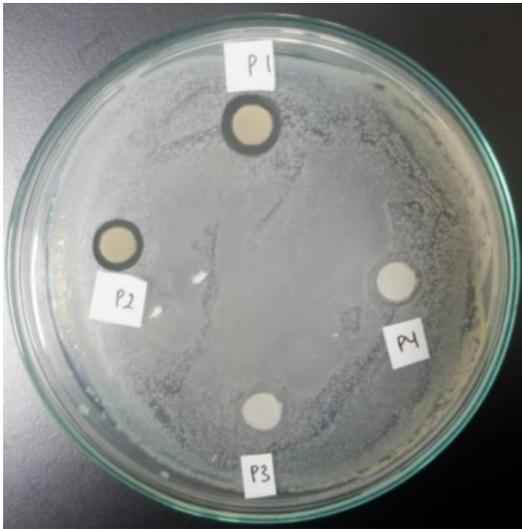


F. Hasil Aktivitas Antibakteri

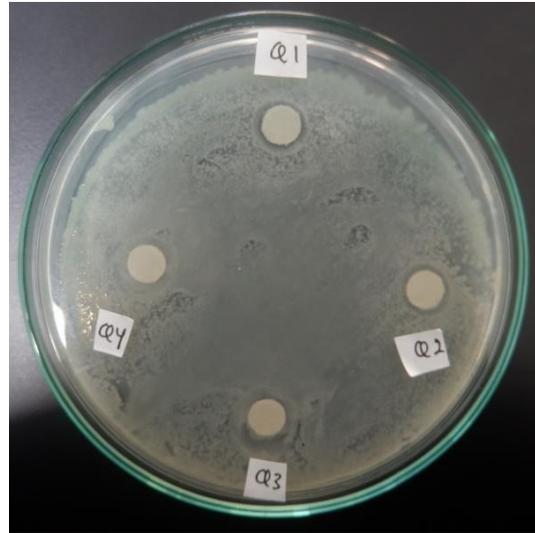


Hasil Uji Aktivitas Antibakteri pada Madu Hitam dan Madu Hutan

G. Hasil Uji KHM



Uji KHM pada Madu Hitam



Uji KHM pada Madu Hutan

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

- 1. Nama Lengkap : Julieta Wulandari
- 2. Tempat & Tanggal Lahir : Semarang, 4 Juli 2000
- 3. Alamat Rumah : Jl. Prembaen No. 947, Semarang
- HP : 0895329420004
- Email : wulandarijulieta@gmail.com

B. Riwayat Pendidikan

- 1. Pendidikan Formal :
 - a. TK PGRI 50 (2004 – 2006)
 - b. SD Kembang Sari 02 (2006 – 2012)
 - c. SMPN 7 Semarang (2012 – 2015)
 - d. SMAN 5 Semarang (2015 – 2018)
- 2. Pendidikan Non-Formal :

-

C. Prestasi Akademik

-

D. Karya Ilmiah

-

Semarang, 15 September 2022

Julieta Wulandari

(1807026064)