

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI BERBAGAI JENIS MADU TERHADAP MIKROBA PEMBUSUK  
(*Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070)**

**Skripsi**

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
guna memperoleh derajat Sarjana Teknologi Pertanian  
di Fakultas Pertanian  
Universitas Sebelas Maret  
Jurusan/Program Studi Teknologi Hasil Pertanian**



**Oleh :**

**LELA FITRI HARIYATI**

**H 0606052**

**Pembimbing Utama : Ir. M.A.M. Andriani, MS.**

**Pembimbing Pendamping : Rohula Utami, S.TP, M.P**

**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS SEBELAS MARET  
SURAKARTA**

**2010**

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang**

Madu adalah cairan manis yang berasal dari nektar tanaman yang diproses oleh lebah menjadi madu dan tersimpan dalam sel-sel sarang lebah. Sejak ribuan tahun yang lalu sampai sekarang ini, madu telah dikenal sebagai salah satu bahan makanan atau minuman alami yang mempunyai peranan penting dalam kehidupan. Madu memiliki manfaat dalam berbagai aspek, antara lain dari segi pangan, kesehatan dan kecantikan. Madu sering digunakan sebagai bahan pemanis, penyedap makanan dan campuran saat mengkonsumsi minuman. Selain itu, madu sering pula digunakan untuk obat-obatan. Madu merupakan salah satu obat tradisional tertua yang dianggap penting untuk pengobatan penyakit pernafasan, infeksi saluran pencernaan dan bermacam-macam penyakit lainnya. Madu juga dapat digunakan secara rutin untuk membalut luka, luka bakar dan borok di kulit untuk mengurangi sakit dan bau dengan cepat (Mulu *et.al*, 2004), serta dapat digunakan untuk menghilangkan rasa lelah dan letih. Dari segi kecantikan, madu dapat pula digunakan untuk menghaluskan kulit, serta pertumbuhan rambut (Purbaya, 2002 dan Murtidjo, 1991 dalam Ratnayani dkk., 2008).

Madu merupakan salah satu sumber makanan yang baik. Asam amino, karbohidrat, protein, beberapa jenis vitamin serta mineral adalah zat gizi dalam madu yang mudah diserap oleh sel-sel tubuh. Sejumlah mineral yang terdapat dalam madu seperti magnesium, kalium, potasium, sodium, klorin, sulfur, besi dan fosfat. Madu juga mengandung vitamin, seperti vitamin E dan vitamin C serta vitamin B1, B2 dan B6 (Winarno, 1982 dalam Ratnayani dkk., 2008). Selain itu madu juga mengandung zat antibiotik yang berguna untuk melawan bakteri patogen penyebab penyakit infeksi. Hal ini disebabkan karena pertumbuhan beberapa mikroorganisme yang berhubungan dengan penyakit atau infeksi dapat dihambat oleh madu (Molan, 1992 dalam Anonim, 1998).

Menurut Mundo *et al.* (2004), madu dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, dan *Staphylococcus aureus*. Hal ini terlihat dari zona penghambatan yang dihasilkan oleh madu yang diberikan pada media yang telah ditanam bakteri-bakteri tersebut. Selain itu, madu juga dapat menghambat kerusakan daging kalkun kemas yang telah dilakukan oleh Antony *et al.* (2006). Dengan menambahkan madu dalam konsentrasi tertentu, potongan daging kalkun kemas memiliki umur simpan yang lebih lama daripada potongan daging kalkun kemas tanpa penambahan madu. Dari kedua hasil penelitian ini dapat terlihat bahwa madu dapat berfungsi sebagai antibakteri.

Produksi dan tipe madu yang dihasilkan oleh lebah madu tergantung pada bunga vegetatif alami yang berbunga pada musim yang berbeda. Jadi, bunga dari nektar yang dikumpulkan lebah untuk menghasilkan madu juga akan memberikan pengaruh yang berbeda pada aktivitas antibakteri pada madu. Hal ini telah dibuktikan oleh Taormina *et al.* (2001) yang menggunakan enam jenis madu yang berbeda antara lain Chinaso buckwheat, Montana buckwheat, Blueberry, Avocado, Safflower dan Clover. Dari keenam jenis madu tersebut memberikan aktivitas antibakteri yang berbeda terhadap penghambatan bakteri yang diujikan.

Di Indonesia terdapat beberapa jenis madu berdasarkan jenis flora yang menjadi sumber nektarnya (Suranto, 2007). Madu monoflora merupakan madu yang diperoleh dari satu tumbuhan utama. Madu ini biasanya dinamakan berdasarkan sumber nektarnya, seperti madu kelengkeng, madu rambutan dan madu randu. Madu monoflora mempunyai wangi, warna dan rasa yang spesifik sesuai dengan sumbernya. Sedangkan jenis yang lain yaitu madu poliflora. Madu poliflora merupakan madu yang berasal dari nektar beberapa jenis tumbuhan bunga. Madu ini biasanya berasal dari hutan yang diproduksi oleh lebah-lebah liar. Dari beberapa jenis madu yang berbeda sumber nektarnya ini dimungkinkan akan memiliki aktivitas antibakteri yang berbeda pula. Sumber nektar yang berbeda akan mempengaruhi sifat madu

yang dihasilkan oleh lebah, diantaranya dari segi warna, rasa, dan komponen madu.

Dari beberapa jenis madu yang digunakan, penulis mengharapkan akan dihasilkan salah satu jenis madu yang paling efektif sebagai antibakteri. Dari jenis madu tersebut, akan dapat diaplikasikan sebagai pengawet alami makanan, khususnya sebagai pengawet daging segar. Daging merupakan bahan makanan dengan kandungan gizi yang lengkap sehingga mudah untuk mengalami kerusakan. Madu akan memperlambat proses kerusakan serta memberikan cita rasa khas madu.

## **B. Perumusan Masalah**

Dari latar belakang diatas, dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut

1. Apakah perbedaan jenis madu mempengaruhi aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri pembusuk?
2. Jenis madu apakah yang memberikan efek antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri pembusuk paling efektif?
3. Berapakah konsentrasi penghambatan minimal madu terhadap bakteri pembusuk?

## **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Mengetahui pengaruh perbedaan jenis madu terhadap aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri pembusuk.
2. Mengetahui jenis madu yang memberikan efek antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri pembusuk paling efektif.
3. Mengetahui konsentrasi penghambatan minimal madu terhadap bakteri pembusuk.

## **D. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah yang bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang pangan, khususnya tentang manfaat madu sebagai antibakteri dan dapat diaplikasikan oleh masyarakat sebagai bahan pengawet makanan yang alami, misalnya pemanfaatan madu sebagai pengawet daging sapi.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tinjauan Pustaka**

##### **1. Madu**

Madu adalah cairan manis yang berasal nektar tanaman yang diproses oleh lebah menjadi madu dan tersimpan dalam sel-sel sarang lebah. Madu merupakan hasil sekresi lebah, karena madu ditempatkan dalam bagian khusus di perut lebah yang disebut perut madu yang terpisah dari perut besar. Nektar yang dihisap madu mengandung 60% air sehingga lebah harus menurunkan menjadi 20% atau lebih rendah lagi untuk membuat madu. Penurunan kadar air ini melalui proses fisika dan kimia. Proses fisika penurunan kadar air mulai terjadi saat lebah menjulurkan lidahnya (*proboscis*) untuk memindahkan madu dari perut madu ke sarang lebah, di sarang kadar air terus diturunkan melalui putaran sayap-sayap lebah yang menyirkulasikan hawa hangat ke dalam sarang lebah. Sedangkan proses kimianya terjadi di dalam perut lebah dimana enzim invertase mengubah sukrosa (disakarida) menjadi glukosa dan fruktosa yang keduanya merupakan monosakarida (Anonim, 2006).

Madu merupakan salah satu sumber makanan yang baik. Madu bermanfaat sebagai makanan kesehatan yang dapat meningkatkan stamina tubuh sebagai energi seketika. Selain itu madu juga dapat digunakan sebagai pengganti gula atau suplementasi nutrisi (Anonim, 2008). Produk lebah ini dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti jantung, paru-paru, lambung, sistem pencernaan, influenza, katarak, luka infeksi, dan masih banyak lagi khasiat dari madu. Winarno, Kepala Pusat Pengembangan Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor dalam Intanwidya (2008), menyatakan bahwa gula dan mineral dalam madu berfungsi sebagai tonikum bagi jantung. Antioksidan madu diyakini mampu mencegah terjadinya kanker, penyakit jantung, dan penyakit lainnya. Selain itu madu juga dapat membunuh dan mencegah kuman

untuk berkembang sehingga madu dipercaya dapat menyembuhkan berbagai macam luka seperti luka bakar, luka infeksi, luka setelah operasi dan lain-lain. Madu juga banyak sekali digunakan dalam dunia kosmetika, baik dalam bentuk sabun, masker, dan krim pelembut. Madu dapat menjaga kelembaban kulit dan memberinya nutrisi yang dibutuhkan.

Komposisi kimia madu bervariasi tergantung pada sumber tanaman, musim dan metode produksi. Kondisi penyimpanan juga bisa mempengaruhi komposisi akhir, dengan peningkatan proporsi disakarida selama waktu penyimpanan berlangsung. Fruktosa (sekitar 38% w/w) dan glukosa (sekitar 31%) adalah dua gula utama yang terdapat pada madu secara umum, dengan jumlah sukrosa yang kurang (sekitar 1%), serta disakarida dan oligosakarida yang lain. Potassium merupakan mineral utama pada madu. Selain itu mineral yang juga terkandung dalam madu adalah Ca, P, Fe, Mg, dan Mn. Madu mengandung beberapa vitamin antara lain vitamin E dan vitamin C serta vitamin B1, B2 dan B6. Madu memiliki keasaman yang rendah dengan pH sekitar 3,9. Kandungan air madu sekitar 17%, dengan aktivitas air antara 0,56-0,62. Asam glukonat dan jumlah protein yang kecil serta asam amino juga terdapat pada madu (White, 1975 dalam Anonim, 1998).

Madu mengandung beberapa senyawa organik, yang telah teridentifikasi antara lain seperti polyphenol, flavonoid, dan glikosida (Kamaruddin, 1997 dalam Anonim, 2009). Selain itu, di dalam madu juga terdapat berbagai jenis enzim, antara lain enzim glukosa oksidase dan enzim invertase yang dapat membantu proses pengolahan sukrosa untuk diubah menjadi glukosa dan fruktosa yang keduanya mudah diserap dan dicerna. Begitu pula enzim amilase dan enzim lipase dan minyak volatil, seperti hidroksi metil furfural. Madu juga mengandung dekstrosa (gula yang ditemukan dalam tumbuhan), lilin, gen pembiakan, dan asam formik (Hamad, 2007).

Di Indonesia jenis lebah yang paling banyak digunakan sebagai penghasil madu adalah lebah lokal (*Apis cerana*), lebah hutan (*Apis*

*dorsata*) dan lebah Eropa (*Apis mellifera*). Ada banyak jenis madu menurut karakteristiknya. Karakteristik madu dapat dibedakan berdasarkan sumber nektar, letak geografi, dan teknologi pemrosesannya. Jenis madu berdasarkan sumber nektarnya dapat dibagi menjadi dua, yaitu monoflora dan poliflora. Madu monoflora merupakan madu yang diperoleh dari satu tumbuhan utama. Madu ini biasanya dinamakan berdasarkan sumber nektarnya, seperti madu kelengkeng, madu rambutan dan madu randu. Madu monoflora mempunyai wangi, warna dan rasa yang spesifik sesuai dengan sumbernya. Madu monoflora juga disebut madu ternak, karena madu jenis ini pada umumnya ditenakkan. Sedangkan madu poliflora merupakan madu yang berasal dari nektar beberapa jenis tumbuhan bunga. Lebah cenderung mengambil nektar dari satu jenis tanaman dan baru mengambil dari tanaman lain bila belum mencukupi. Contoh dari madu jenis ini adalah madu hutan. Madu hutan adalah madu yang diproduksi oleh lebah liar. Madu ini berasal dari lebah liar yang bernama *Apis dorsata*. Sumber pakan dari lebah ini adalah tumbuh-tumbuhan obat yang banyak tumbuh di dalam hutan hujan tropis di Indonesia. Madu hutan juga sangat baik untuk kesehatan karena mengandung antibiotik alami yang diproduksi oleh lebah-lebah liar.

Madu juga bisa dicirikan sesuai dengan letak geografis dimana madu tersebut diproduksi, seperti madu Timur Jauh, madu Yaman, dan madu Cina. Selain itu, jenis madu berdasarkan teknologi perolehannya dibedakan menjadi madu peras (diperas langsung dari sarangnya) dan madu ekstraksi (diperoleh dari proses sentrifugasi) (Suranto, 2007).

Terdapat beberapa perbedaan antara madu ternak dan madu hutan. Menurut Anonim (2007) perbedaan itu diantaranya adalah :

a. Jenis lebah

Lebah madu hutan dari jenis *Apis dorsata* sedangkan madu ternak dari jenis *Apis cerana* atau *Apis mellifera*. Sehingga jenis sarang yang dihasilkan juga berbeda. Sarang tersebut menempati jenis tanaman yang berbeda, sehingga nektar yang akan dihisap oleh lebah



juga akan berbeda. Jenis nektar yang berbeda tersebut pada akhirnya akan memberikan perbedaan rasa dan warna madu yang mereka hasilkan.

b. Perlakuan

Madu hutan didapat dari jenis lebah liar yang sampai saat ini belum bisa ditangkarkan, sedangkan madu ternak berasal dari madu yang telah ditangkarkan.

c. Kadar air

Karena lebah hutan membuat sarang di tempat terbuka (batang pohon, batu karang), sehingga sarang lebah hutan lebih terpengaruh oleh perubahan musim dibanding sarang lebah ternak yang berada di dalam kotak. Kadar air madu hutan sekitar 24% sedangkan kadar air madu ternak sekitar 21%.

Madu mempunyai banyak keunggulan karena karakteristiknya. Karakteristik fisis madu menurut Suranto (2007) adalah sebagai berikut :

a. Kekentalan (viskositas)

Madu yang baru diekstrak berbentuk cairan kental. Kekentalannya tergantung dari komposisi madu, terutama kandungan airnya. Bila suhu madu meningkat, kekentalan madu akan menurun.

b. Kepadatan (densitas)

Madu memiliki ciri khas yaitu kepadatannya akan mengikuti gaya gravitasi sesuai berat jenis. Bagian madu yang kaya akan air (densitasnya rendah) akan berada di atas bagian madu yang lebih padat dan kental. Oleh karena itulah, madu yang disimpan terlihat memiliki lapisan.

c. Sifat menarik air (higroskopis)

Madu bersifat menyerap air sehingga akan bertambah encer dan akan menyerap kelembaban udara sekitarnya.

d. Tegangan permukaan (*surface tension*)

Madu memiliki tegangan permukaan yang rendah sehingga sering digunakan sebagai campuran kosmetik. Tegangan permukaan madu bervariasi tergantung sumber nektarnya dan berhubungan dengan kandungan zat koloid. Sifat tegangan permukaan yang rendah dan kekentalan yang tinggi membuat madu memiliki ciri khas membentuk busa.

e. Suhu

Madu memiliki sifat lambat menyerap suhu lingkungan yang tergantung dari komposisi dan derajat pengkristalannya. Dengan sifat yang mampu menghantarkan panas dan kekentalan yang tinggi menyebabkan madu mudah mengalami *overheating* (kelebihan panas) sehingga pengadukan dan pemanasan madu harus dilakukan secara hati-hati.

f. Warna

Warna madu bervariasi dari transparan hingga tidak berwarna seperti air dan dari warna terang hingga hitam. Warna dasar madu adalah kuning kecoklatan seperti gula karamel. Warna madu dipengaruhi oleh sumber nektar, usia madu, dan penyimpanan. Madu yang berasal dari pengumpulan nektar dengan proses yang cepat akan berwarna lebih terang daripada yang prosesnya lambat. Warna madu juga ditentukan oleh subspecies lebah dan kualitas sarang. Adapun bening tidaknya madu ditentukan oleh partikel yang tercampur, misalnya ada tidaknya pollen. Pada madu yang mengkristal, akan terjadi perubahan warna madu menjadi lebih terang akibat putihnya kristal glukosa yang dikandungnya.

Dalam dunia industri, warna madu menentukan harga dan kegunaannya. Misalnya madu yang berwarna gelap lebih sering digunakan untuk industri, sedangkan madu berwarna terang banyak dipilih sebagai makanan atau minuman.

g. Aroma

Aroma madu yang khas disebabkan oleh kandungan zat organiknya yang mudah menguap (volatil). Komposisi zat aromatik dalam madu bisa bervariasi sehingga wangi madu pun menjadi unik dan spesifik. Aroma madu bersumber dari zat yang dihasilkan sel kelenjar bunga yang tercampur dalam nektar dan juga proses fermentasi dari gula, asam amino, dan vitamin selama pematangan madu. Zat aromatik madu berupa minyak esensial, campuran karbonil (formaldehid, asetaldehid, propionaldehid, aseton, metil etil keton, dan sebagainya), ikatan alkohol (propanol, etanol, butanol, isobutanol, pentanol, benzyl alkohol, dan sebagainya), serta ikatan ester (asam benzoat atau propionat). Aroma madu cenderung tidak menetap karena zat ini akan menguap seiring waktu terutama bila madu tidak disimpan dengan baik.

h. Rasa

Rasa madu yang khas disebabkan oleh kandungan asam organik dan karbohidratnya, serta jenis nektarnya. Sebagian besar madu mempunyai rasa manis dan agak asam. Tingkat kemanisan madu ditentukan oleh rasio karbohidrat yang terkandung dalam nektar tanaman yang menjadi sumber madu. Rasa madu bisa berubah bila disimpan pada kondisi yang tidak cocok dan suhu yang tinggi yaitu menjadi kurang enak dan masam.

i. Sifat mengkristal (kristalisasi)

Madu cenderung mengkristal pada proses penyimpanan di suhu kamar. Banyak orang berpikir bila madu mengkristal berarti kualitas madu buruk atau sudah ditambahkan gula.

Madu yang mengkristal merupakan akibat dari pembentukan kristal glukosa monohidrat yang tergantung dari komposisi dan kondisi penyimpanan madu. Makin rendah kandungan airnya dan makin tinggi kadar glukosanya, makin cepet terjadi pengkristalan. Selama mengkristal, kandungan air dalam madu tidak terikat dan mengakibatkan terjadinya fermentasi madu.

Menurut Taormina *et al.* (2001), madu dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* dan *Staphylococcus aureus*. Hal ini terlihat dari zona penghambatan yang dihasilkan oleh madu yang diberikan pada media yang telah ditanam bakteri-bakteri tersebut. Selain itu, madu juga dapat menghambat kerusakan daging kalkun kemas yang telah dilakukan oleh Antony *et al.* (2006). Dengan menambahkan madu dalam konsentrasi tertentu, potongan daging kalkun kemas memiliki umur simpan yang lebih lama daripada potongan daging kalkun kemas tanpa penambahan madu.

Aktivitas antibakteri yang dimiliki madu disebabkan karena beberapa hal, menurut Molan (1992) dalam Jeffrey (1997) diantaranya adalah sebagai berikut :

a. Efek osmotik

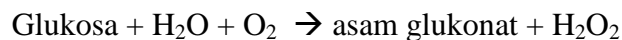
Madu adalah larutan gula yang kental atau super kental. Interaksi yang kuat antara molekul gula dengan molekul air meninggalkan molekul air yang sangat sedikit yang tersedia bagi mikroorganisme. Air bebas ini terukur sebagai aktivitas air ( $a_w$ ). Nilai  $a_w$  madu adalah sekitar 0,56-0,62. Aktivitas air madu terlalu rendah untuk mendukung pertumbuhan banyak spesies mikroba.

b. Keasaman

Madu memiliki karakter yang cukup asam (pH 3,2-4,5). Kisaran nilai keasaman tersebut cukup rendah untuk dijadikan sebagai penghambat bakteri. Ini terjadi pada madu yang masih kental atau belum diencerkan.

c. Hidrogen peroksida

Aktivitas antibakteri yang lain pada madu adalah hidrogen peroksida yang dihasilkan secara enzimatis pada madu. Enzim glukosa oksidase dikeluarkan dari kelenjar hipofaring lebah ke dalam nektar untuk membantu pembentukan madu dari nektar. Hidrogen peroksida dan keasaman dihasilkan dari reaksi :



d. Faktor fitokimia

Beberapa senyawa fitokimia diduga juga berperan pada aktivitas antibakteri madu. Beberapa kandungan kimia dengan aktivitas antibakteri telah diidentifikasi pada madu, antara lain : pinocembrin, terpenes, benzyl alcohol, 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid (syringic acid), methyl 3,5 dimethoxy-4-hydroxybenzoate (methyl syringate), 3,4,5-trimethoxybenzoic acid, 2-hydroxy-3-phenylpropionic acid, 2-hydroxybenoic acid dan 1,4-dihydroxybenzene. Tetapi jumlah senyawa fitokimia tersebut dalam madu juga kecil, sehingga pengaruh terhadap aktivitasnya juga kecil.

**2. *Pseudomonas sp.***

Mikroorganisme tersebar luas di alam lingkungan, dan sebagai akibatnya produk pangan jarang sekali yang steril dan umumnya tercemar oleh berbagai jenis mikroorganisme. Bahan pangan selain merupakan sumber gizi bagi manusia, juga sebagai sumber makanan bagi perkembangan mikroorganisme. Pertumbuhan mikroorganisme di dalam atau pada makanan dapat mengakibatkan berbagai perubahan fisik maupun kimiawi yang tidak diinginkan, sehingga bahan pangan tersebut tidak layak untuk dikonsumsi lagi. Apabila hal ini terjadi, produk pangan tersebut dinyatakan sebagai bahan pangan yang busuk (Buckle *et al.*, 1985).

Pembusukan makanan oleh bakteri terjadi sebagai konsekuensi pertumbuhan bakteri pada makanan atau pelepasan enzim intra dan ekstra seluler (mengikuti kerusakan sel) pada lingkungan makanan. Salah satu bakteri yang berkaitan dengan pembusukan makanan adalah *Pseudomonas*. Selain itu bakteri yang juga berperan dalam pembusukan makanan antara lain *Aeromonas sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Aspergillus niger*.

*Pseudomonas* merupakan penyebab berbagai jenis kerusakan bahan pangan yang sebagian besar berhubungan dengan kemampuan spesies ini dalam memproduksi enzim yang dapat memecah baik komponen lemak maupun protein dari bahan pangan. Banyak organisme *Pseudomonas* yang dapat berkembang dengan cepat pada suhu lemari es dan sering menyebabkan terbentuknya lendir dan pigmen pada permukaan daging yang didinginkan. *Pseudomonas fluorescens* menghasilkan pigmen berwarna kehijauan dan beberapa spesies seperti *Pseudomonas nigrificans* membentuk pigmen hitam pada makanan yang mengandung protein (Anonim, 2008).

Bakteri genus *Pseudomonas* termasuk dalam kelompok Gram-negatif yang tidak menghasilkan spora, berbentuk batang, hampir semuanya bersifat aerobik dan bergerak menggunakan flagella kutub. Anggota genus *Pseudomonas* bersifat fluorescent, bergerak dan mudah beradaptasi secara nutrisi. Menurut Bergey's Manual of Systematic Bacteriology genus ini memiliki lebih dari 40 spesies di antaranya *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. cichorii*, *P. viridiflava* dan *P. syringae* (Buckle *et al.*, 1985).

Spesies utama genus *Pseudomonas* yang berperan dalam pembusukan makanan antara lain *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. viridiflava*, *P. fragi* dan *P. lundensis*. Strain pektolitik dari *P. fluorescens* dan *P. viridiflava* berhubungan dengan pembusukan buah-buahan dan sayuran. Sedangkan strain proteolitik dan lipolitik dari *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. lundensis*, *P. putida* berhubungan dengan pembusukan produk hewan seperti daging, susu dan ikan. Pembusukan yang disebabkan oleh bakteri ini ditandai dengan penampakan berlendir atau tampak lembek, berbau serta kerusakan sebagian dan menyeluruh jaringan tumbuhan atau hewan.

Karakteristik spesies utama *Pseudomonas* yang paling sering dikaitkan memiliki peran penting dalam pembusukan makanan asal tumbuhan maupun hewan menurut Harsono (2009) adalah sebagai berikut:

1. Suhu

*Pseudomonas* yang berhubungan dengan pembusukan makanan pada suhu refrigerator bersifat psikrotrofik dan mampu membentuk koloni pada suhu 0–7°C. *P. fluorescens* dan *P. viridiflava* pektolitik yang berhubungan dengan pembusukan produk segar dapat tumbuh pada produk segar yang biasanya disimpan pada suhu 10°C atau lebih rendah.

## 2. Komposisi atmosferik

Pertumbuhan dan daya tahan mikroba pembusuk sangat dipengaruhi oleh komposisi gas atmosfer di lingkungan makanan. Konsentrasi CO<sub>2</sub> yang tinggi (sampai 10%) menghambat pertumbuhan *P. fluorescens* dan *P. fragi* pada daging merah, karkas ayam dan fillet ikan. Pengemasan daun bayam pada kantung yang mengandung CO<sub>2</sub> konsentrasi tinggi atau O<sub>2</sub> konsentrasi rendah dilaporkan dapat menurunkan jumlah *Pseudomonas*. Efek penghambatan CO<sub>2</sub> konsentrasi tinggi pada pertumbuhan *Pseudomonas* di brokoli terjadi pada suhu 4°C tetapi tidak pada suhu 10°C.

## 3. Aktifitas air/ water activity (a<sub>w</sub>)

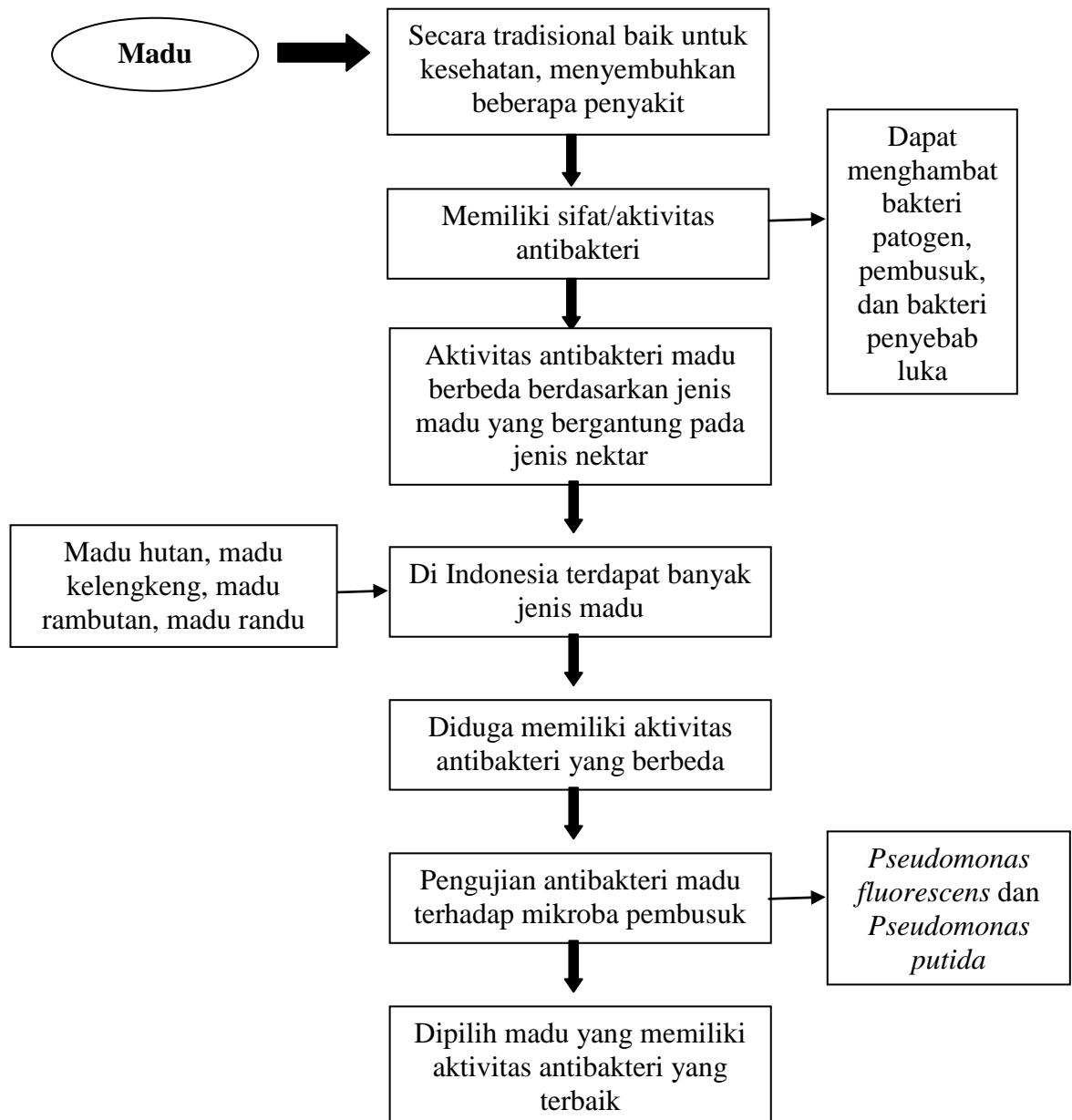
Aktifitas air merupakan faktor penting yang membatasi daya tahan dan pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen di makanan atau di lingkungan. Bakteri yang berhubungan dengan pangan umumnya lebih peka terhadap a<sub>w</sub> rendah dibandingkan dengan a<sub>w</sub> tinggi. *Pseudomonas* lebih sering dijumpai pada permukaan daging segar, ikan dan sayuran dengan a<sub>w</sub> tinggi (0,99 atau lebih tinggi). Nilai a<sub>w</sub> minimal yang diperlukan untuk pertumbuhan *Pseudomonas* berkisar pada 0,91–0,95.

## 4. pH

Sebagian besar bahan pangan mempunyai pH 5–7 yang cocok untuk pertumbuhan bakteri pembusuk maupun patogen. Nilai pH minimum untuk pertumbuhan *P. fragi* adalah 5,0. *Pseudomonas* peka

terhadap pH rendah. Sedikit perbedaan pH pada pangan sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri dan proses pembusukan.

## B. Kerangka Berpikir



## C. Hipotesis

Penggunaan jenis madu yang berbeda (madu hutan, madu randu, madu kelengkeng, dan madu rambutan) akan menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri pembusuk yang berbeda pula.



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Pangan dan Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta. Penelitian ini telah dilakukan selama bulan April - Juni 2010.

#### **B. Bahan dan Alat**

##### **1. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain madu. Madu yang digunakan terdiri dari empat jenis yaitu madu hutan, madu kelengkeng, madu randu dan madu rambutan. Madu yang digunakan adalah madu dengan merk "Madu Perhutani". Sedangkan untuk uji antibakteri digunakan bakteri antara lain *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070 yang mewakili jenis bakteri pembusuk. Kedua jenis bakteri ini diperoleh dari koleksi FNCC (*Food Nutrition and Culture Collection*) Yogyakarta. Bahan yang digunakan sebagai media untuk mengembangbiakkan bakteri adalah *Nutrient Agar* (NA).

##### **2. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain autoklaf, cawan petri, gelas ukur, tabung reaksi, erlenmeyer, pipet ukur, mikro pipet, pro pipet, *laminar flow*, bunsen, *oose*, *hotplate*, vortex, dan inkubator.

#### **C. Tahapan Penelitian**

##### **1. Pembiakan bakteri**

Masing-masing bakteri, *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070, disubkultur pada agar miring *Nutrient Agar*. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Setelah melalui masa inkubasi, bakteri dipanen dengan cara menambahkan larutan garam

fisiologis NaCl 0,9% dan mengikis permukaan agar miring dengan oose. Kultur kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril. Hasil ini ditampung dan digunakan sebagai stok, serta dihitung jumlahnya dengan metode *plating*. Kemudian kultur bakteri ini ditumbuhkan ke dalam media NA untuk dilakukan uji aktivitas antibakteri madu terhadap bakteri pembusuk.

## 2. Pengujian aktivitas antibakteri

Metode yang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri adalah metode *well diffusion*. Kedua bakteri pembusuk yaitu *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070 yang telah disiapkan diinokulasi dalam media *Nutrient Agar* (NA). Media NA dibuat dengan dua lapis, lapisan bawah menggunakan agar 3,3% (*hard agar*), sedangkan lapisan atas menggunakan agar 2,8% (*soft agar*) yang telah berisi bakteri  $10^6$  sel/ml. *Soft agar* ini merupakan agar dengan konsentrasi yang sebenarnya yang tertera pada kemasan media bubuk. Setelah mengeras, kemudian dibuat empat sumur dengan diameter 5 mm pada permukaan masing-masing menggunakan pipet tetes. Madu murni dengan jenis yang berbeda, yaitu madu hutan, madu randu, madu rambutan dan madu kelengkeng dimasukkan ke dalam masing-masing sumur tersebut sebanyak 50  $\mu$ l. Setelah itu cawan petri diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, akan muncul zona penghambatan. Kemudian dilakukan pengukuran diameter zona penghambatan (Jin Woo Kim, 2001; Allaf *et al*, 2009). Diameter zona penghambatan dihitung sebesar diameter zona bening yang terbentuk.

## 3. Analisis dengan metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

*Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) menunjukkan konsentrasi terendah dari madu yang dapat melakukan penghambatan terhadap kedua bakteri pembusuk (*Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070). Metode ini ditujukan pada madu yang telah menunjukkan hasil positif pada uji aktivitas antibakteri. Pada analisis ini juga dilakukan dengan metode *well diffusion*. Secara teknis analisis ini

sama seperti pada pengujian aktivitas antibakteri, hanya saja madu yang ditambahkan diberikan variasi konsentrasi madu. Konsentrasi madu yang ditambahkan antara lain 25%; 30%; 35%; dan 40%.

#### D. Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan 2 jenis bakteri pembusuk (*Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070) dan 4 jenis madu (madu hutan, madu kelengkeng, madu randu dan madu rambutan). Percobaan ini akan menghasilkan nilai dalam bentuk diameter zona penghambatan (mm). Percobaan ini dilakukan dengan 3 kali ulangan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan General Linear Model Univariate Analysis of Variance ( $\alpha = 0,05$ ). Rancangan percobaan disusun seperti yang terlihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Rancangan Percobaan Uji Aktivitas Antibakteri Madu

Madu	Bakteri	<i>Pseudomonas fluorescens</i> FNCC 0071	<i>Pseudomonas putida</i> FNCC 0070
	Hutan		(mm)
Randu		(mm)	(mm)
Rambutan		(mm)	(mm)
Kelengkeng		(mm)	(mm)

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *well diffusion* atau difusi sumur terhadap dua jenis bakteri yaitu *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070, yang keduanya merupakan bakteri Gram negatif. Penggunaan kedua bakteri tersebut didasarkan pada kedua bakteri tersebut yang merupakan penyebab berbagai jenis kerusakan bahan pangan. Karakteristik dari *Pseudomonas* yang penting yang berhubungan dengan pangan adalah : (1) kemampuan mereka untuk memanfaatkan komponen karbon nonkarbohidrat untuk energi; (2) kemampuan mereka untuk menghasilkan beberapa produk yang akan mempengaruhi flavor yang mengganggu; (3) kemampuan mereka untuk mensintesis faktor pertumbuhan mereka sendiri atau vitamin; (4) aktivitas proteolitik dan lipolitik; (5) kecenderungan aerob, memungkinkan untuk tumbuh dengan cepat dan menghasilkan produk yang teroksidasi dan kotor pada permukaan makanan; (6) kemampuan mereka untuk tumbuh dengan baik pada suhu dingin (Frazier and Westhoff, 1988). Oleh karena itu, aktivitas antibakteri yang diujikan diharapkan memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri pembusuk dari kedua jenis bakteri tersebut.

Pada metode difusi sumur, pertumbuhan bakteri pada agar dihambat oleh antibakteri yang ada dalam sumur, yang pada penelitian kali ini digunakan madu sebagai antibakteri. Terdapat empat jenis madu yang digunakan yaitu madu hutan, madu randu, madu kelengkeng, dan madu rambutan. Penggunaan empat jenis madu tersebut diduga akan memberikan aktivitas penghambatan yang berbeda. Untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri maka jumlah madu dan aquades netral yang dimasukkan ke dalam sumuran berjumlah sama, yaitu 50 mikroliter.

Penggunaan volume dan kondisi inkubasi yang sama bertujuan untuk menciptakan aktivitas mikroba bisa dibandingkan satu dengan yang lain (Davidson dan Parish, 1989).

Terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri uji. Zona penghambatan bakteri dinyatakan dalam milimeter (mm) yang diukur dari diameter zona bening yang terbentuk (diameter sumuran terhitung). Semakin luas zona bening menunjukkan semakin tinggi aktivitas antibakteri madu. Hasil analisis aktivitas antibakteri madu dapat ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Zona Penghambatan Aktivitas Antibakteri Beberapa Jenis Madu

Jenis Madu	Jenis Bakteri	
	<i>P. fluorescens</i> FNCC 0071	<i>P. putida</i> FNCC 0070
Hutan	10.2667 <sup>b</sup> mm	10.6000 <sup>b</sup> mm
Randu	12.1667 <sup>c</sup> mm	13.1000 <sup>c</sup> mm
Kelengkeng	5.5333 <sup>a</sup> mm	5.6000 <sup>a</sup> mm
Rambutan	5.5000 <sup>a</sup> mm	5.7333 <sup>a</sup> mm

Keterangan :

- Angka – angka zona penghambatan yang terukur termasuk sumur yang berdiameter 5 mm
- Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf alfa 0,05

Dari hasil analisis statistik terhadap diameter hambat bakteri *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070 oleh beberapa jenis madu pada tingkat kepercayaan 0,05 menunjukkan bahwa diameter hambat yang dihasilkan oleh madu hutan berbeda nyata dengan madu randu, madu kelengkeng dan madu rambutan. Madu kelengkeng dan madu rambutan menghasilkan diameter hambat yang tidak berbeda nyata. Dari data tersebut dapat diketahui pula bahwa madu randu memiliki nilai diameter hambat terbesar diantara ketiga madu lainnya. Sedangkan madu rambutan memiliki nilai diameter hambat yang terkecil. Dari data Tabel 4.1 menunjukkan bahwa jenis bakteri yang digunakan tidak berpengaruh terhadap nilai hambat. Hal tersebut terlihat pada diameter hambat yang dihasilkan oleh *Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070 memiliki nilai yang tidak berbeda nyata.

Menurut Mundo *et. al* (2004), ada beberapa faktor yang menyebabkan madu memiliki aktivitas antibakteri, antara lain keasaman, tekanan osmotik, dan hidrogen peroksida. Komponen tambahan pada madu seperti asam aromatik dan komponen fenol juga berperan dalam aktivitas antibakteri. Taormina *et. al* (2001) juga menjelaskan faktor nonperoksida juga berperan dalam aktivitas antibakteri madu. Komponen seperti lisozim, asam fenolik dan flavonoid juga terdapat dalam madu. Komponen fenolik lainnya pada nektar juga memiliki aktivitas antioksidan. Antioksidan fenolik diketahui dapat untuk menghambat bakteri Gram positif dan Gram negatif.

Keasaman memiliki pengaruh yang besar terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup bagi sel bakteri. Setiap spesies memiliki kisaran optimum keasaman untuk pertumbuhan. Ketika pH turun sampai batas terendah untuk pertumbuhan bakteri, tidak hanya sel bakteri yang akan berhenti pertumbuhannya, tetapi bakteri juga akan

kehilangan kemampuan hidupnya. Keasaman yang tinggi dapat berpengaruh pada komponen sel dan memberikan pengaruh yang merugikan terhadap struktur sel. Dengan keasaman yang tinggi, jumlah konsentrasi ion hidrogen juga akan meningkat, dimana hal ini akan mengganggu gradien transmembran proton dari sel bakteri. Untuk mengatasi ini, sel akan membawa proton melalui pompa proton yang menyebabkan kehabisan energi dan penurunan pH. Struktur pada permukaan sel, membran terluar atau dinding sel, membran dalam atau membran sitoplasma, dan periplasma juga terbuka oleh  $H^+$ . Hal ini dapat memberikan pengaruh yang merugikan pada ikatan ion makromolekul dan hal itu dapat mengganggu struktur tiga dimensi dan beberapa fungsi. Pada  $pH < 5$ , molekul yang tak terdissosiasi dari beberapa asam dapat menjadi sangat tinggi. Mereka menjadi lipofilik, masuk secara bebas melewati membran. Beberapa anion dibentuk oleh beberapa bakteri sebagai sumber C. Jika mereka tidak termetabolisme, anion dikeluarkan dari dalam sel. Nilai pH yang rendah juga akan berperan pada komponen selular dan merugikan struktur (dengan mengganggu ikatan ion). Perubahan ini dapat mengganggu transport nutrisi dan pembaruan energi (Ray, 1996). Madu hutan, madu randu, madu rambutan, dan madu kelengkeng yang digunakan dalam penelitian berturut-turut memiliki pH sebesar 3,78; 3,56; 3,81; dan 4,09. Bakteri yang berasal dari golongan *Pseudomonas* memiliki pH minimum 5,6 (Buckle *et al* 1985).

Faktor kedua yang menyebabkan madu memiliki aktivitas antibakteri adalah efek osmotik. Madu merupakan larutan gula yang kental atau super kental. Interaksi yang kuat antara molekul gula dengan molekul air meninggalkan molekul air yang sangat sedikit yang tersedia bagi bakteri. Air bebas terukur sebagai aktivitas air/ $a_w$  (Molan 1992 dalam Jeffrey 1997). Air bebas dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri. Air bebas dibutuhkan untuk transpor nutrisi dan membuang sisa metabolit, mengeluarkan reaksi enzimatik, mensintesis bahan-bahan sel, dan melakukan reaksi biokimia yang lain (Ray, 1996). Semua kegiatan ini

membutuhkan air, dan apabila air tersebut mengalami kristalisasi atau terikat secara kimiawi dalam larutan gula, maka air tersebut tidak dapat digunakan oleh bakteri. Ketika  $a_w$  menurun sampai tingkat minimum untuk pertumbuhan bakteri, sel tetap hidup untuk sementara. Tetapi jika  $a_w$  menurun secara drastis, bakteri akan kehilangan kemampuan hidupnya, pada umumnya akan sangat cepat awalnya dan kemudian akan lebih lambat.

Bakteri menahan  $a_w$  yang cukup rendah dalam sel dibandingkan lingkungan luar untuk mempertahankan tekanan turgor, dan hal ini penting untuk pertumbuhan sel. Jika  $a_w$  di lingkungan berkurang oleh perpindahan air atau dengan penambahan larutan yang tidak dapat masuk ke dalam sel, air bebas dalam sel mengalir keluar dengan tujuan mempertahankan keseimbangan. Kehilangan air akan menyebabkan *osmotic shock* dan plasmolisis. Selama dalam keadaan itu sel tidak dapat tumbuh. Masing-masing mikroba memiliki  $a_w$  minimum untuk pertumbuhan (Ray, 1996). Bakteri dari golongan *Pseudomonas* memiliki  $a_w$  minimum 0,91 (Todar, 2000). Dari hasil analisis nilai  $a_w$  pada masing-masing madu, madu hutan memiliki  $a_w$  sebesar 0,71; madu randu sebesar 0,67; madu kelengkeng sebesar 0,68; dan madu rambutan sebesar 0,66. Jadi, aktivitas air madu tersebut cukup rendah untuk mendukung pertumbuhan banyak bakteri.

Di dalam madu juga diindikasikan terdapat senyawa fenol yang bersifat antibakteri (Jeffrey, 1997). Beberapa senyawa fenol tersebut adalah pinocembrin, terpenes, benzyl alcohol, syringic acid, methyl syringate, 1,4-dihydroxybenzene dan flavonoid. Mekanisme senyawa fenol sebagai zat antibakteri adalah dengan cara meracuni protoplasma, merusak dan menembus dinding sel, serta mengendapkan protein sel mikroba. Komponen fenol juga dapat mendenaturasi enzim yang bertanggung jawab terhadap germinasi spora atau berpengaruh terhadap asam amino yang terlibat dalam proses germinasi. Senyawa fenolik



bermolekul besar mampu menginaktifkan enzim esensial di dalam sel mikroba meskipun pada konsentrasi yang sangat rendah. Senyawa fenol mampu memutuskan ikatan peptidoglikan saat menerobos dinding sel. Ikatan peptidoglikan ini secara mekanis memberi kekuatan pada sel bakteri. Kedua jenis bakteri uji merupakan bakteri Gram negatif dengan dinding sel terdapat peptidoglikan yang sedikit sekali dan berada diantara selaput luar dan selaput dalam dinding sel. Dinding sel bakteri Gram negatif mengandung fosfolipid, lipopolisakarida, dan lipoprotein. Setelah menerobos dinding sel, senyawa fenol akan menyebabkan kebocoran isi sel dengan cara merusak ikatan hidrofobik komponen membran sel (seperti protein dan fosfolipida) serta larutnya komponen-komponen yang berikatan secara hidrofobik yang berakibat meningkatnya permeabilitas membran. Terjadinya kerusakan pada membran sel mengakibatkan terhambatnya aktivitas dan biosintesis enzim-enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi metabolisme (Naidu, 2000 dalam Yulianti, 2009). Kandungan total fenol dalam madu hutan, madu randu, madu rambutan, dan madu kelengkeng yang digunakan dalam penelitian berturut-turut adalah 0,255; 0,244; 0,191; dan 0,193.

White dan Subbers (1963) dalam Jeffrey (1997) melaporkan bahwa hidrogen peroksida yang dihasilkan oleh glukosa oksidase madu dapat menjadi komponen penghambat melawan bakteri. Glukosa oksidase dikeluarkan dari kelenjar hipofaring lebah ke dalam nektar untuk membantu pembentukan madu dari nektar. Tetapi, telah diketahui bahwa sejumlah bakteri dapat menghasilkan katalase yang akan mengeliminasi hidrogen peroksida. Meskipun demikian, katalase aktif dengan konsentrasi hidrogen peroksida yang tinggi. Bakteri dari golongan *Pseudomonas* merupakan bakteri yang bersifat katalase positif (Kusnandar dkk., 2003). Oleh sebab itu, dalam kasus ini penghambatan yang dihasilkan oleh madu terhadap kedua bakteri uji ini kecil kemungkinan yang disebabkan oleh adanya hidrogen peroksida. Faktor keasaman, efek osmotik dan senyawa fenol dalam madu lebih berperan.

Dari hasil penelitian, rata-rata diameter zona penghambatan terhadap bakteri uji dari ketiga jenis sampel madu adalah madu hutan terhadap *P. fluorescens* FNCC 0071 10,27 mm dan *P. putida* FNCC 0070 10,60 mm; madu randu terhadap *P. fluorescens* FNCC 0071 12,17 mm dan *P. putida* FNCC 0070 13,10 mm; madu rambutan terhadap *P. fluorescens* FNCC 0071 5,50 mm dan *P. putida* FNCC 0070 5,73 mm; madu kelengkeng terhadap *P. fluorescens* FNCC 0071 5,53 mm dan 5,60 mm. Sehingga dapat disimpulkan bahwa dalam penelitian ini aktivitas antibakteri pada madu randu > madu hutan > madu rambutan > madu kelengkeng. Aktivitas antibakteri ini bersumber dari komponen – komponen antibakteri yang telah dijabarkan sebelumnya. Beberapa komponen antibakteri tersebut bekerja saling melengkapi untuk menghasilkan aktivitas penghambatan. Selain itu, sumber nektar juga berperan dalam perbedaan aktivitas antibakteri pada madu. Perbedaan jenis tumbuh-tumbuhan yang cairan bunganya menjadi makanan lebah untuk memproduksi madu akan mempengaruhi karakteristik dari madu, seperti flavor, aroma, warna, dan komposisi dalam madu (Mulu, 2004).

Tabel 4.2 Hasil Pengujian Nilai pH,  $a_w$  dan Total Fenol Beberapa Jenis Madu

Jenis Madu	Nilai pH	Nilai $a_w$	Nilai Total Fenol
Hutan	3,78	0,71	0,25
Randu	0	0	5
Rambuta	3,56	0,67	0,24
	0	0	4

n	3,81	0,66	0,19
Kelengke	0	0	1
ng	4,09	0,68	0,19
	0	0	3

Secara umum zona hambat yang dihasilkan oleh madu terhadap kedua bakteri uji tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Hal ini disebabkan karena kedua bakteri berasal dari golongan yang sama, yaitu *Pseudomonas*. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang pendek atau panjang, dapat bergerak, umumnya berflagella polar tunggal dan mempunyai tipe metabolisme yang oksidatif (Buckle *et.al* 1985). Dari Tabel 4.2 dapat diketahui nilai pH,  $a_w$ , dan total fenol dari keempat jenis madu. Ketiga parameter tersebut bekerja bersama-sama untuk menghasilkan aktivitas antibakteri. Ketiga parameter dari madu rambutan dan madu kelengkeng memiliki nilai yang tidak berbeda nyata, oleh sebab itu kedua madu tersebut juga menghasilkan nilai zona penghambatan yang tidak berbeda nyata pula. Sedangkan pada madu hutan dan randu memiliki nilai pH yang lebih rendah dan nilai total fenol yang lebih tinggi daripada madu rambutan dan madu kelengkeng. Oleh sebab itu madu hutan dan madu randu juga menghasilkan nilai zona penghambatan yang lebih besar daripada kedua jenis madu lainnya. Akan tetapi zona penghambatan yang terbesar dihasilkan oleh madu randu, dimana hal ini disebabkan madu randu memiliki nilai pH dan  $a_w$  yang lebih rendah dari ketiga jenis madu lainnya, meskipun nilai total fenol sedikit lebih rendah daripada madu hutan. Tetapi ketiga parameter ini bersinergi untuk menghasilkan nilai zona penghambatan yang terbesar.

Dilaporkan oleh Tumin *et.al* (2005), dalam penelitiannya digunakan beberapa jenis merk madu yang diperoleh dari sumber nektar yang berbeda. Jenis madu tersebut antara lain "Tualang", "Hutan",

“Gelang”, “Pucuk Daun” dan “Ee Feng Gu”. Beberapa bakteri patogen yang digunakan untuk uji antibakteri antara lain *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923). Dari pengujian tersebut menunjukkan bahwa madu “Ee Feng Gu” memberikan penghambatan yang paling efektif terhadap semua strain bakteri yang digunakan. Madu “Tualang” dan “Pucuk Daun” juga memberikan efek antibakteri tetapi tidak pada semua strain. Sedangkan pada kedua madu lainnya, yaitu “Gelang” dan “Hutan” tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada semua strain. Dari hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa sumber nektar berperan dalam perbedaan aktivitas antibakteri pada madu.

Tabel 4.3 Zona Penghambatan Minimum Madu terhadap Bakteri Pembusuk dengan Metode MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Konsentrasi	<i>P. putida</i> FNCC 0070		<i>P. fluorescens</i> FN
	randu	hutan	randu
40%	7,30 mm	6,56 mm	6,70 mm
35%	6,15 mm	5,63 mm	5,96 mm
30%	5,20 mm	5,29 mm	5,53 mm
25%	5,00 mm	5,00 mm	5,00 mm

Keterangan :

- Angka – angka zona penghambatan yang terukur termasuk sumur yang berdiameter 5 mm

*Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dilaporkan sebagai konsentrasi minimum yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba (Mulu, 2004). Cara yang digunakan untuk melakukan uji MIC sama dengan uji aktivitas antibakteri, hanya saja dalam uji MIC ini digunakan beberapa konsentrasi madu untuk menentukan konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Konsentrasi yang digunakan dalam uji MIC pada penelitian ini adalah 25%, 35%, 30% dan 40%. Kisaran angka – angka tersebut didapatkan setelah dilakukan percobaan secara berulang. Telah dilakukan percobaan dengan kisaran konsentrasi yang lebih kecil, tetapi tidak menghasilkan aktivitas penghambatan. Untuk jenis madu yang digunakan dalam uji MIC ini adalah madu hutan dan madu randu saja. Hal ini dilakukan karena pada uji aktivitas antibakteri sebelumnya madu kelengkeng dan madu rambutan menghasilkan diameter hambat yang sangat kecil.

Dari Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa konsentrasi minimum penghambatan kedua jenis bakteri uji terhadap madu hutan dan madu randu adalah 30%. Di Ethiopia, studi yang dilakukan oleh Mogessie Ashenafi (1994) dalam Demera dan Angert (2004) melaporkan bahwa madu tazmamar yang diproduksi oleh lebah *Apis mellipodae* ditemukan efektif menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Konsentrasi minimum penghambatan yang dilakukan pada *S. typhimurim*, *S. enteritidis* dan *E. coli* sebesar 15 dan 20%, sedangkan yang dilakukan pada *B. cereus* dan *S. aureus* sebesar 10%. Dilaporkan pula madu yang diproduksi oleh lebah madu *Apis mellifera*, didapatkan konsentrasi minimum penghambatan sebesar 2,5 – 7,5%. Hal ini dapat terjadi karena perbedaan spesies lebah, dimana lebah ini akan menghasilkan perbedaan produksi dan tipe madu. Selain itu perbedaan hasil tersebut juga disebabkan karena perbedaan mikroorganisme yang digunakan.

Dari penelitian lain dihasilkan aktivitas antibakteri dari jenis madu yang berbeda. Dari penelitian tersebut dihasilkan nilai MIC yang

bervariasi dari jenis madu yang diuji terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Dihasilkan konsentrasi minimum penghambatan bakteri uji oleh madu manuka, madu heather, dan madu khadikraft sebesar 10%, sedangkan dengan madu lokal dihasilkan konsentrasi minimum penghambatan sebesar 11%. Dari hasil tersebut dapat terlihat bahwa perbedaan jenis madu akan memberikan pengaruh terhadap nilai MIC (Mullai dan Menon, 2007).

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian Aktivitas Antibakteri Berbagai Jenis Madu Terhadap Mikroba Pembusuk (*Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070) ini adalah :

1. Madu menunjukkan memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri uji (*Pseudomonas fluorescens* FNCC 0071 dan *Pseudomonas putida* FNCC 0070). Beberapa faktor yang menyebabkan madu memiliki aktivitas antibakteri, antara lain keasaman, efek osmotik, komponen fenol dan hidrogen peroksida.
2. Diameter zona penghambatan terhadap bakteri uji dari ketiga jenis sampel madu adalah madu hutan terhadap *P. fluorescens* FNCC 0071 10,27 mm dan *P. putida* FNCC 0070 10,60 mm; madu randu terhadap *P. fluorescens* FNCC 0071 12,17 mm dan *P. putida* FNCC 0070 13,10 mm; madu rambutan terhadap *P. fluorescens* FNCC 0071 5,50 mm dan *P. putida* FNCC 0070 5,73 mm; madu kelengkeng terhadap *P. fluorescens* FNCC 0071 5,53 mm dan 5,60 mm. Madu randu memiliki nilai diameter hambat terbesar dibandingkan dengan madu hutan, madu kelengkeng, dan madu rambutan.
3. Konsentrasi minimum penghambatan kedua jenis bakteri uji oleh madu hutan dan madu randu adalah 30%.

## **B. Saran**

Masih perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengujian *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) menggunakan metode turbidimetri. Selain itu penelitian ini perlu disempurnakan dengan penelitian lebih lanjut mengenai aplikasi madu sebagai pengawet pada daging.



## DAFTAR PUSTAKA

- Allaf, M.A.H., Al-Rawi and A.T. Al-Mola, 2009. *Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Minced Beef Meat Against Some Pathogenic Bacteria*. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, Vol. 23: 115-117.
- Anonim, 1998. *Honey (Scientific Report)*. Office of Complementary Medicines. Edisi Desember 1998.
- Anonim, 2006. *Kuman Tidak Mampu Melawan Madu*. <http://masbudi.blogspot.com/2006/06/05/kuman-tidak-mampu-melawan-madu/trackback/> (Diakses pada tanggal 12 September 2009).
- Anonim, 2007. *Apa Bedanya Madu Hutan dan Ternak?*. [www.maduhutan.blogspot.com/.../apa-bedanya-madu-hutan-dan-ternak.html](http://www.maduhutan.blogspot.com/.../apa-bedanya-madu-hutan-dan-ternak.html). (Diakses pada tanggal 18 September 2009).
- Anonim, 2008. *Kerusakan Bahan Pangan Oleh Mikroorganisme*. [www.blog.unpad.ac.id/.../mikropangan03.pdf](http://www.blog.unpad.ac.id/.../mikropangan03.pdf). (Diakses pada tanggal 18 September 2009).
- Anonim, 2008. *Madu Alam Murni*. [www.madu-perhutani.com](http://www.madu-perhutani.com). (Diakses pada 5 Februari 2010).
- Anonim, 2009. *Madu Sumber Gizi dan Obat Segala Penyakit*. [www.ardi33.web.id/.../madu-sumber-gizi-dan-obat-segala.html](http://www.ardi33.web.id/.../madu-sumber-gizi-dan-obat-segala.html). (Diakses pada tanggal 5 Februari 2010).
- Antony, S., J.R. Rieck, J.C. Acton, I.Y. Han, E.L. Halpin, dan P.L. Dawson, 2006. *Effect of Dry Honey on the Self Life of Packaged Turkey Slice*. Poultry Science 85 : 1811-1820.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet, dan M. Wootton, 1985. *Ilmu Pangan (Terjemahan Hari Purnomo dan Adiono)*. Jakarta : Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Hal : 23, 29.
- Dastouri, M.R., Kamran, J. Shayeg, Sharaf, Valilou, dan Naser, 2008. *Evaluating Antibacterial Activity of the Iranian Honey Through MIC Method on Some Dermal and Intestinal Pathogenic Bacteria*. Journal of Animal and Veterinary Advances 7 (4): 409-412.
- Davidson and Parish, 1989. *Antimicrobial Activity of Essensial Oils and Ether Plants Extract*. Jurnal Appl Microbiology 86 : 985-990.

- Demera, J.H and E.R. Angert. 2004. *Comparison of The Antimicrobial Activity of Honey Produced by Tetragonisca angustula (Meliponinae) and Apis Mellifera from Different Phytogeographic Regions of Costarica*. Original Article Apidologie 35 (2004) : 411-417.
- Frazier W.C dan D.C. Westhoff. 1988. *Food Microbiology*. New York. McGraw Hill Book. Page : 43.
- Hamad, S. 2007. *Terapi Madu*. Jakarta : Pustaka Iman. Hal : 30.
- Harsono, W. 2009. *Bakteri Pembusuk Pada Makanan*. [Http://www.indomedia.com/intisari/2009/Bakteri Pembusuk.htm](http://www.indomedia.com/intisari/2009/Bakteri_Pembusuk.htm). (diakses pada tanggal 11 Juli 2010).
- Intanwidya, Y. 2008. *Analisa Madu dari Segi Kandungannya Berikut Khasiatnya Masing-masing*. [www.mail-archive.com/forum@alumni.../msg01046.html](http://www.mail-archive.com/forum@alumni.../msg01046.html) - (Diakses pada tanggal 29 Januari 2010).
- Jeffrey, A.E. dan C.M. Echazaretta, 1997. *Medical Uses of Honey*. Rev Biomed 1996 ; 7:43-49.
- Kim, Jin-Woo and S.N. Rajagopal, 2001. *Antibacterial Activities of Lactobacillus crispatus ATCC 33820 and Lactobacillus gasseri ATCC 33323*. The Journal of Microbiology, p.146-148.
- Kusnandar F, P. Hariyadi dan N. Wulandari. 2003. *Applied Microbiology 5*. [www.sub-topik-6-karakteristikmikroba.pdf](http://www.sub-topik-6-karakteristikmikroba.pdf). (diakses pada tanggal 10 Juli 2010)
- Mullai, V. and T. Menon. 2007. *Bactericidal Activity of Different Types of Honey Against Clinical and Environmental Isolates of Pseudomonas aeruginosa*. The Journal Of Alternative And Complementary Medicine Volume 13, Number 4, 2007, pp. 439–441.
- Mulu, A., B. Tessema, and F. Derby, 2004. *In vitro Assesment of The Antimicrobial Potential of Honey on Common Human Pathogens*. Ethiop. J. Health Dev. 2004:18 (2).
- Mundo, M.A., Olga I. Padilla-Zakour, and R.W. Worobo, 2004. *Growth Inhibition of Food Pathogens and Food Spoilage Organisms by Selected Raw Honeys*. International Journal of Microbiology 97 : 1-8
- Ratnayani, K., N.M.A. D. Adhi S., dan I G.A.M.A.S. Gitadewi, 2008. *Penentuan Kadar Glukosa dan Fruktosa Madu Randu dan Madu Kelengkeng*

*dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Jurnal Kimia 2 (2) : 77-86.*

Ray, B. 1996. *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press: New York. Page : 410-411, 402-403.

Suranto, A. 2007. *Terapi Madu*. Jakarta : Penebar Plus. Hal : 27-28, 30-32.

Taormina, P.J., B.A. Niemira, Larry R. Beuchat, 2001. *Inhibitory Activity of Honey Against Foodborne Pathogens as Influenced by The Presence of Hydrogen Peroxide and Level of Antioxidant Power*. International Journal of Food Microbiology 69 (2001) 217-225.

Todar, K. 2000. *Physical Requirements continued*. University of Wisconsin-Madison.  
[www.lecturer.ukdw.ac.id/dhira/NutritionGrowth/temperature.html](http://www.lecturer.ukdw.ac.id/dhira/NutritionGrowth/temperature.html)–  
(diakses pada tanggal 11 Juli 2010).

Tumin, N. N., A. Arsyiah, Halim, M. Shahjahan, N. J. Noor Izani, A. Munavvar, Sattar, Abdul Hye Khan dan S. J. Mohsin, 2005. *Antibacterial Activity of Local Malaysian Honey*. Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 3, No. 2, 1–10 (2005)

Yulianti, O.N., 2009. Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba *Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang, dan Daun Tanaman Jarak Pagar (Jatropha curcas L.)*. Skripsi S1 Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.