

## ANTIOXIDANT ACTIVITY, ANTIBACTERIAL ACTIVITY, WATER CONTENT, AND ASH CONTENT IN BADUY HONEY

Adri Nora<sup>1\*</sup>, Anjas Wilapangga<sup>1</sup> dan Titta Novianti<sup>1</sup>

Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul, Jakarta<sup>1\*</sup>

[adri.nora@esaunggul.ac.id](mailto:adri.nora@esaunggul.ac.id)

**Abstract.** Indonesia as a tropical country has many different types of honey. Honey was known to have many advantages especially in health promotion as antioxidant and antibacterial. Baduy honey is one of Indonesian forest honey which its nutritional value, antioxidant, and antibacterial activity have not been investigated yet. The purpose of this study to determine antioxidant activity, antibacterial, water content, and also ash content of baduy honey. The research method are DPPH radical scavenging-activity for antioxidant, microplate resazurine assay for antibacterial, qualitative photochemistry analysis, and gravimetric analysis for measuring water and ash content. The result showed that black and yellow baduy honey has water content 18,64% dan 19,32% respectively and ash content 0,32% dan 0,04% respectively. Baduy honey has also containing flavonoid, terpenoid, and alkaloid compounds. Black Baduy honey has higher antioxidant activity than Yellow Baduy honey in which EC 50 values are 1000,79 µg/mL and 1475,28 µg/mL respectively. However, Baduy honey did not show any antibacterial activity againts *Escheria coli* dan *Staphylococcus aureus* because of MIC value for both type of honey are tremendously large with 500000 µg/mL.

Kata Kunci: Antioxidant, Antibacterial, Baduy Honey



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2018 by author.

### 1. PENDAHULUAN

Sebagai negara tropis yang memiliki banyak hutan, maka Indonesia mampu menghasilkan berbagai macam jenis madu hutan. Madu dihasilkan dari lebah yang mampu menghisap nektar yang berasal dari berbagai macam tanaman (Ferreira et al, 2009). Madu di Indonesia memiliki jenis yang berbeda-beda tergantung dari nektar yang diambil oleh lebah pengasilnya (Fitrianingsih dkk, 2017), perbedaan iklim, dan juga cara pengolahannya (Antary dkk, 2013).

Dari penelitian yang ada, diketahui bahwa madu memiliki komponen utama yaitu air, glukosa, fruktosa, sukrosa, garam mineral, dan berbagai macam vitamin seperti Thiamin,

Riboflavin, dan Niacin (Nadhilla, 2014), dan juga berbagai macam metabolit sekunder. Madu memiliki berbagai macam manfaat dalam bidang kesehatan. Diketahui dari penelitian yang dilakukan oleh Rio dkk, 2012 bahwa madu lubuk minturun dan madu sikabu (madu Indonesia) yang berasal dari Sumatra Barat memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian yang dilakukan oleh Ratnayani dkk, 2012 pada madu klengkeng dan madu randu juga membuktikan bahwa kedua madu tersebut mampu menjadi antioksidan yang baik. Kekuatan antioksidan dan antibakteri pada setiap madu berbeda-beda bergantung dari senyawa-senyawa metabolit sekunder yang dimiliki oleh madu dimana senyawa golongan flavonoid dan fenolik dapat mempengaruhi sifat tersebut (Estevinho et al, 2008).

Madu hutan adalah madu yang dihasilkan oleh jenis lebah hutan *Apis dorsata* dan termasuk dalam produk hasil hutan bukan kayu (HHBK) unggulan. Suku Baduy yang bermukim di di Kabupaten Lebak, Banten, saat ini dikenal mampu menghasilkan madu hutan yang didapatkan dari Gunung Kenden. Ada dua jenis madu yang dihasilkan yaitu madu hitam pahit dan madu kuning manis. Madu baduy tersebut telah banyak dijual secara bebas, namun belum ada satu penelitian yang dilakukan atau pustaka yang dimiliki untuk mengetahui mutu dan manfaat dari madu baduy. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dan antibakteri serta penentuan kadar air dan abu pada madu baduy.

## **2. BAHAN DAN METODA**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas laboratorium, Spektrofotometri UV-VIS (Tecan), mikropipet, botol vial, neraca analitik, mikroplat, oven, tanur, dan autoklaf. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel madu baduy hitam pahit dan kuning manis, DPPH, aquades, pereaksi dragendorff, perekasi mayer, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, bakteri *Escheria coli*, bakteri *Staphylococcus aureus*, Mueller Hinton Agar, dan Mueller Hinton Broth. Metoda yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

### **1. Analisis Kadar air dan abu**

#### **1.1 Kadar abu**

Sebanyak 2 gram madu dimasukkan ke dalam cawan porselin yang telah diketahui beratnya. Kemudian dimasukkan ke tanur pada suhu 600°C selama 3 jam dan didinginkan dalam eksikator selama 30 menit. Berat sampel ditimbang dan dilakukan pengulangan pemanasan hingga berat sampel stabil.

#### **1.2 Kadar air**

Sebanyak 2 gram madu dalam *aluminium dish* yang telah diketahui beratnya dikeringkan dalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam dan didinginkan di dalam eksikator selama

30 menit. Berat sampel ditimbang dan dilakukan pengulangan pemanasan hingga berat sampel stabil

## 2. Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui kandungan senyawa alkaloid, Flavonoid, Terpenoid, Steroid, Tanin, dan Saponin. Metoda ini mengacu pada metoda yang digunakan oleh Harborne (1996)

## 3. Aktivitas Antioksidan

Pembuatan larutan DPPH dilakukan dengan melarutkan serbuk DPPH 4,9 mg dalam metanol p.a dan diencerkan hingga 25 mL (DPPH 0,5 M). Pengujian dilakukan pada konsentrasi madu 2, 5, 10, 20, 40 µg/mL dimana madu dilarutkan di dalam metanol p.a. Larutan madu sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH (0,5M), dikocok dengan vortex hingga homogen dan diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit (Molyneux, 2004). Kontrol negatif (Blanko) menggunakan 2 mL metanol p.a dengan 2 mL DPPH. Selanjutnya, absorbansi diukur pada panjang gelombang 517nm. Aktivitas antioksidan ditentukan dengan cara menghitung persen penangkapan radikal bebas DPPH oleh sampel madu, yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ perendaman} = \frac{A \text{ Blanko} - A \text{ Sampel}}{A \text{ Blanko}} \times 100\%$$

## 4. Aktivitas Antibakteri

Pengujian antibakteri dilakukan terhadap terhadap bakteri gram positif dan negatif secara *in vitro* dengan menggunakan metode Microplate Resazurin Assay (MRA) untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum (*Minimum Inhibitory Concentration = MIC*). Digunakan larutan stok kloramfenikol sebagai kontrol positif (10.000 µg/L), madu yang dilarutkan dalam DMSO, dan juga DMSO sebagai kontrol negatif. Dengan menggunakan mikrotelat 96 sumuran, suspensi bakteri dimasukkan ke dalam sumur mikrotelat yang sebelumnya telah dimasukkan kontrol positif, kontrol negatif, dan juga madu. Madu yang dimasukkan memiliki variasi konsentrasi antara 500.000 µg/L – 250 µg/L. Kemudian sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Larutan Resazurin (0.015%) ditambahkan setelah 24 jam inkubasi dan dilihat perubahan warnanya. Kolom yang tidak berubah warnanya (tetap biru) maka dapat dinyatakan konsentrasinya sebagai nilai MIC.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Uji Kadar Air dan Abu

Dari hasil pengujian kadar air dan kadar abu dapat dilihat dari Tabel 1 yang menunjukkan bahwa madu hitam pahit memiliki kadar air sebanyak 18,64% dan madu kuning manis memiliki kadar air sebanyak 19,32%. Standar Nasional Indonesia (SNI) menetapkan bahwa kadar air untuk madu adalah dibawah 22% (BSN, 2004).

Tabel 1. Kadar Air dan Abu pada Madu Baduy

Nama Sampel	Kadar Air (%)	Kadar Abu (%)
Madu Hitam Pahit 1	18,89	0,31
Madu Hitam Pahit 2	18,38	0,32
Rata-Rata	18,64	0,32
Madu Kuning Manis 1	19,36	0,05
Madu Kuning Manis 2	19,28	0,03
Rata-Rata	19,32	0,04

Penetapan angka ini berdasarkan kepada waktu simpan dari madu. Jika kadar air madu lebih dari 22% maka madu hanya dapat disimpan dalam waktu yang singkat, sedangkan jika kadar air pada madu kurang dari 22% maka madu dapat disimpan dalam waktu yang lama. Hal ini dimungkinkan terjadi karena semakin banyak kadar air dalam madu maka semakin mudah terjadi proses fermentasi yang dilakukan oleh yeast alami dalam madu. Kadar air pada madu baduy sudah memenuhi SNI untuk madu, namun kadar air ini biasanya dapat berubah-ubah tergantung dari musim saat madu dipanen. Pada musim penghujan biasanya madu baduy memiliki kadar air yang lebih tinggi dibandingkan dengan musim kemarau. Pada pengujian kadar abu didapatkan bahwa kadar abu pada madu hitam pahit adalah 0,32% sementara pada madu kuning manis adalah 0,04%. SNI menetapkan bahwa kadar abu pada madu adalah maksimal 0,5%. Banyaknya kadar abu pada madu menunjukkan jumlah mineral yang terkandung dalam madu (Antary dkk, 2013). Semakin banyak kadar abunya maka semakin banyak juga mineral yang dimiliki oleh madu. Madu baduy telah memenuhi SNI, tetapi kadar abu pada madu baduy cukup rendah yang dapat diartikan bahwa madu tersebut tidak memiliki banyak mineral terutama pada madu kuning manis.

#### Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan untuk menguji adanya senyawa-senyawa metabolit sekunder yang dapat mendukung potensi dari madu baduy untuk menjadi antioksidan dan antibakteri. Dari Tabel 2 dapat terlihat bahwa pada madu hitam pahit dan kuning manis memiliki senyawa alkaloid, flavonoid, dan juga terpenoid. Namun madu ini tidak memiliki

senyawa steroid, saponin, atau tanin. Dapat disimpulkan bahwa walaupun rasa dan warna dari madu ini berbeda, namun tetap memiliki senyawa metabolit sekunder yang sama. Dari hasil analisis fitokimia madu baduy ini menunjukkan bahwa madu ini memiliki komponen yang sama dengan madu-madu Indonesia lainnya.

Tabel 2. Analisis Fitokimia Kualitatif pada Madu Baduy

Senyawa	Madu Hitam Pahit	Madu Kuning Manis
Alkaloid	+	+
Flavonoid	+	+
Terpenoid	+	+
Saponin	-	-
Tanin	-	-
Steroid	-	-

### Aktivitas Antioksidan

Pengujian antioksidan telah dilakukan pada kedua madu dengan menggunakan metoda DPPH. Pada Tabel 3 menunjukkan bahwa madu hitam pahit dan madu hitam manis masing-masing memiliki nilai EC50 yaitu 1000,79 µg/ml dan 1476,28 µg/ml. Nilai EC 50 ini diartikan sebagai konsentrasi efektif yang dapat menangkap DPPH sebanyak 50%. Semakin rendah nilai EC50 maka semakin berpotensi menjadi antioksidan yang baik. Dari kedua madu tersebut, madu hitam pahit memiliki nilai antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan madu hitam manis. Madu dapat berpotensi menjadi antioksidan yang baik jika memiliki nilai EC50 kurang dari sama dengan 1000 µg/mL (Molyneux, 2004). Sehingga, dapat dikatakan bahwa madu hitam pahit dapat berpotensi menjadi suatu antioksidan.

Tabel 3. Persamaan Regresi antara Konsentrasi Madu dengan Penangkapan radikal bebas oleh DPPH dan nilai EC50

Sampel	Persamaan Kuadrat	R <sup>2</sup>	EC50 (µg/mL)
Madu Baduy Hitam Pahit	$y = 0,0489x + 1,0614$	0,9944	1000,79
Madu Baduy Kuning Manis	$y = 0,0333x + 0,847$	0,9531	1475,28
Madu Tesso Nilo	$y = 0,0273x - 0,1607$	0,9909	1825,61
Madu Danau Sentarum	$y = 0,0155x + 0,0636$	0,9965	3221,70
Madu Ujung Kulon	$y = 0,0096x + 0,6629$	0,9806	5139,28
Madu Sumbawa	$y = 0,0114x + 2,5613$	0,8122	4161,28

Selanjutnya, jika dibandingkan dengan beberapa madu hutan Indonesia lainnya yang telah diuji oleh Sari dkk, 2013 pada Tabel 3 terlihat bahwa madu baduy lebih baik dibandingkan madu hutan lainnya, dimana madu tesso nilo dari Riau memiliki nilai EC50 yang hampir mendekati dengan madu baduy sebesar 1825,61 µg/ml. Adanya perbedaan

kekuatan antioksidan pada setiap madu dimungkinkan karena adanya perbedaan komposisi dari senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam setiap madu.

Dari hasil analisis fitokimia diketahui bahwa madu baduy mengandung senyawa flavonoid yang termasuk dalam golongan fenolik. Senyawa fenolik diketahui dapat menjadi antioksidan yang baik pada madu dengan cara yaitu dengan menangkap radikal bebas, penangkapan logam, dan juga pendonor elektron (Ratnayani dkk, 2012)

### Aktivitas Antibakteri

Pengujian antibakteri dilakukan kepada kedua madu hitam pahit dan madu hitam manis dengan menggunakan kontrol positif yaitu kloramfenikol. Kloramfenikol adalah senyawa antibakteri yang termasuk dalam golongan penisilin. Dari hasil pengujian antibakteri dengan menggunakan metoda MRA, pada Tabel 4 menunjukkan bahwa madu baduy memiliki nilai MIC sebesar 500000 µg/mL pada bakteri *Escheria coli* maupun *Staphylococcus aureus*. Jika dibandingkan dengan kloramfenikol yang memiliki nilai MIC sebesar 2,44 µg/mL maka madu baduy dapat dikatakan tidak berpotensi sama sekali menjadi antibakteri. Hal ini dimungkinkan terjadi karena madu baduy tidak memiliki metabolit sekunder yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, walaupun dari hasil analisis fitokimia terdapat senyawa metabolit sekunder yang mampu berperan sebagai antibakteri.

Tabel 4 Nilai MIC Madu Baduy dengan Kontrol Positif Kloramfenikol

Sampel	Bakteri	MIC (µg/mL)
Madu Hitam Pahit	<i>Escheria coli</i>	500000
	<i>Staphylococcus aureus</i>	500000
Madu Kuning Manis	<i>Escheria coli</i>	500000
	<i>Staphylococcus aureus</i>	500000
Kloramfenikol	<i>Escheria coli</i>	2,44
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,44

## 4. KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa madu baduy memenuhi standar mutu dari madu oleh SNI dengan kadar air sebesar 18,64% (madu hitam pahit) dan 19,32% (madu kuning manis) dan kadar abu sebesar 0,32% (madu hitam pahit) dan 0,04% (madu kuning manis). Hasil analisis fitokimia secara kualitatif menunjukkan bahwa madu baduy mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, dan terpenoid. Madu baduy berpotensi menjadi antioksidan yang baik dengan nilai EC50

sebesar 1000,79 µg/ml (madu hitam pahit) dan 1476,28 µg/ml (madu kuning manis), namun madu ini tidak memiliki potensi sebagai antibakteri.

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah dapat melakukan isolasi terhadap senyawa metabolit sekunder yang ada di dalam madu baduy. Selain itu, nilai mutu pada madu baduy dapat lebih diteliti lebih dalam lagi agar didapatkan data yang lebih lengkap tentang mutu dari madu baduy.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian RISTEKDIKTI yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Dosen Pemula (PDP) tahun anggaran 2018.

### Daftar Pustaka

- Antary, P. *et al.* 2013. Nilai Daya Hantar Listrik, Kadar Abu, Natrium, dan Kalium pada Madu Bermerek di Pasaran dibandingkan dengan Madu Alami (Lokal), *Jurnal Kimia*, 7(2), 172–180.
- BSN (Badan Standarisasi Nasional). 2004. Standar Nasional Indonesia, 01-3545-2004, *Madu*, Jakarta
- Estevinho, L. *et al.* 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3774–3779.
- Ferreira, I. C. F. R. *et al.* 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract, *Food Chemistry*, 114(4), 1438–1443.
- Fitrianingsih, S. P. *et al.* 2017. Aktivitas Antibakteri Madu Hitam Pahit dan Madu Hitam Manis Terhadap *Escheria coli* dan *Staphylococcus aureus*, *Jurnal Farmasi Galenika*, 1(2), 32-37.
- Harborne. 1996. *Metoda Fitokimia: Penemuan cara modern menganalisis tumbuhan*. Bandung: Institut Teknologi Bandung
- Molyneux P. 2004. The Use of Stable Free Radical Dipenylpicyl-Hidarzil (DPPH) for Estimazing Antioxidant Activity, *J Sci Technol*, 26, 211-219.
- Nadhilla, N. F. 2014. The Activity of Antibacterial Agent of Honey Againts *Staphylococcus aureus*, *Medical Journal of Lampung University*, 3(7), 94–101.
- Ratnayani, K, et al. 2012. Kadar Total Senyawa Fenolat pada Madu Randu dan Madu Klengkeng Serta Uji aktivitas AntiRadikal Bebas dengan Metoda DPPH (Difenilpicril Hidrazil), *Jurnal Kimia*, 6(2), 163-168.
- Rio, Y.B.P., Djamal, A., Asterina. 2012. Perbandingan Efek Antibakteri Madu Asli Sikabu dengan Madu Lubuk Minturun terhadap *Escherichia Coli* dan *Staphylococcus Aureus* secara In Vitro, *Jurnal Kesehatan Andalas*, 1(2), 59–62.
- Sari, R.K., Bertoni, R., Praptami, T.A. 2013. Kajian Mutu, Nilai Gizi Serta Potensi Antibakteri Dan Antioksidan (Manfaat) Madu Hutan Indonesia. Laporan Uji Laboratorium JMHI. <http://www.jmhi.info/?cat=26>