

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

JUDUL PENELITIAN

**OPTIMALISASI DAN UJI STABILITAS MADU HUTAN KEFA DAN
PATIKAN KERBAU (*Euphorbia hirta*) SEBAGAI ANTIBAKTERI
DALAM PENGENDALIAN PENYAKIT BAKTERIAL PADA
BUDIDAYA IKAN**

TIM PENGUSUL

Dr.Yuliana Salosso, S.Pi,MP

Dr. Ir. Sunadji MP

Dr. Franchy Christian Liufeto, S.Pi., M.Si

Immaria Fransira S.Pi, MP

**Dilaksanakan Atas dana DIPA Universitas Nusa Cendana dengan Nomor
Surat perjanjian Kerja (SPK) Penelitian 2843/UN15.20.3/LK/2023**



**FAKULTAS PETERNAKAN, KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS NUSA CENDANA
OKTOBER 2023**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Optimalisasi Dan Uji Stabilitas Madu Hutan Kefa Dan Patikan Kerbau (*Euphorbia hirta*) Sebagai Antibakteri Dalam Pengendalian Penyakit Bakterial Pada Budidaya Ikan

Ketua Peneliti

a. Nama : Dr.Yuliana Salosso, S.Pi, MP
b. NIDN : 0001077505
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Program studi : Budidaya Perairan
e. No Hp : 081 339 43 6261
f. Bidang keahlian : Budidaya Perairan

Anggota Tim Peneliti

a. Nama : Dr. Ir. Sunadji,MP
b. NIDN : 0017046506
c. Program studi : Budidaya Perairan

Anggota Tim Peneliti

a. Nama : Dr.Franchy Christian Liufeto S.Pi,M.Si
b. NIDN : 0016047605
c. Program studi : Budidaya Perairan

Anggota Tim Peneliti

a. Nama : Immaria Fransira, S.Pi, M.Si
b. NIP : 19941105 202203 2 017
c. Program studi : Budidaya Perairan

Jangka waktu pelaksanaan : 8 Bulan

Anggaran Yang disetujui : Rp. 50.000.000,- (Lima Puluh Tujuh Juta Rupiah)

Kupang, Oktober 2023


Mengetahui
Dekan FKPK Undana
(Dr. Ir. Arnel E. Manu, MP)
NIP.19680416 199203 1 002


Ketua peneliti
(Dr. Yuliana Salosso, S.Pi, MP)
NIP.19750701 199903 2 001


Mengetahui
Dekan EP2M Undana
(Dr. Ir. Damianus Adar, M.Ec)
NIP.1965113199103 1 002

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Kuasa yang telah memberkati dan melindungi, hingga kami dapat melaksanakan kegiatan penelitian sampai dengan penyusunan laporan akhir ini.

Penelitian sebagai salah satu unsur dari Tri Darma Perguruan Tinggi, merupakan aktivitas yang tidak dapat dilepaskan dari kehidupan segenap civitas akademika di perguruan tinggi. Kegiatan ini merupakan wadah bagi civitas akademika untuk meneliti guna pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Kegiatan ini dapat terselenggara berkat bantuan berbagai pihak, untuk itu pada kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih kepada : Pihak Rektor Undana dan Dekan Fakultas Peternakan, Kelautan dan Perikanan Undana, dan semua pihak yang telah membantu penyelenggaraan kegiatan ini.

Semoga hasil dari penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua pihak utamanya bagi pengembangan ilmu pengetahuan di bidang perikanan khususnya Budidaya Perairan

Kupang, Oktober 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI	iv
RINGKASAN	v
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4. Urgensi Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. State of the art.....	4
2.2. Peta Jalan Penelitian.....	6
BAB III METODE PENELITIAN	8
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	9
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	28

RINGKASAN

Madu yang dikombinasikan dengan patikan kerbau telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A.hydropilla* dan *V.alginolitycus* secara In vitro. Demikian pula secara in vivo telah terbukti menyembuhkan ikan mas yang terinfeksi *A.hydropilla* dan ikan kerapu cantang yang terinfeksi *V.alginolitycus*. Guna mengoptimalkan pemanfaatan kombinasi madu dan patikan kerbau sebagai antibakteri pada ikan, maka perlu diketahui kestabilan aktivitas antibakteri baik madu maupun patikan kerbau jika diambil pada waktu yang berbeda maupun pada waktu penyimpanan yang berbeda. Dari data uji kestabilan aktivitas antibakteri dan kandungan senyawa aktif madu dan patikan kerbau, akan dijadikan dasar dalam melakukan kombinasi madu dan patikan kerbau untuk menghasilkan aktivitas antibakteri yang terbaik dan dapat menyembuhkan ikan yang terinfeksi bakteri.

Tujuan dari penelitian ini adalah menemukan suatu metode pengendalian penyakit bakterial pada budidaya ikan yang lebih aman terhadap ikan, lingkungan, dan manusia sebagai konsumen, murah dan mudah diperoleh dan diterapkan oleh pembudidaya ikan dengan menggunakan bahan alam sehingga masalah kelemahan penggunaan antibiotik sintetis dapat diatasi dan nilai guna madu dan nilai ekonomis patikan kerbau dapat ditingkatkan.

Penelitian ini dilaksanakan selama tahun 2023, yang dibagi dalam 3 tahap penelitian yaitu **Tahap pertama** uji Stabilitas aktivitas antibakteri baik madu maupun patikan kerbau yang diambil pada waktu yang berbeda maupun lama penyimpanan yang berbeda. **Tahap kedua** yaitu uji stabilitas kandungan senyawa kimia dari madu hutan kefa dan patikan kerbau. **Tahap ketiga** yaitu uji antibakteri madu, patikan kerbau dan kombinasinya terhadap ikan mas yang terinfeksi bakteri *A.hydropilla* secara in vivo.

Hasil penelitian Tahap I dihasilkan Kandungan senyawa kimia madu hutan kefa tidak banyak berubah pada pengambilan musim yang sama dan tahun yang berbeda sedangkan kandungan senyawa kimia patikan kerbau tidak berbeda pada setiap waktu dan tempat pengambilan namun yang membedakan adalah tempat tumbuh dari patikan kerbau yang mendapat naungan kandungan senyawa aktifnya lebih rendah dari patikan kerbau yang tidak mendapat naungan. Sedangkan penelitian Tahap II dihasilkan aktivitas antibakteri madu tidak berbeda antara madu yang diambil pada musim yang sama, sedangkan aktivitas antibakteri patikan kerbau juga di pengaruhi oleh tempat tumbuh patikan kerbau yang mendapat naungan dan yang tidak mendapat naungan. Untuk Penelitian Tahap III dihasilkan Kombinasi Madu hutan kefa dan Patikan kerbau merupakan perlakuan yang terbaik yang dapat menyembuhkan ikan mas yang terinfeksi bakteri *A.hydropilla* dengan menaikkan sel darah merah dari 1.270.000 sel/mm³ (ikan sakit) menjadi 3.420.000 sel/mm³ (setelah pengobatan), menaikkan Hemoglobin dari 3,35 gr/100 ml (ikan sakit) menjadi 7,0 gr/100 ml (setelah pengobatan) dan menurunkan sel darah putih dari 517.000 sel/mm³ (ikan sakit) menjadi 172.000 sel/mm³(setelah pengobatan).

Kata Kunci : Madu Hutan Kefa, *Euphorbia hirta*, budidaya ikan, *Aeromonas hydropilla*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit bakterial merupakan masalah serius dalam budidaya ikan. *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu jenis bakteri *Aeromonas* yang dapat menyerang semua jenis ikan air tawar (Orsi, et al, 2017) yang menyebabkan penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (Rosidah dkk, 2019a), yang dapat menyebabkan kematian mencapai 100% (Rosidah dkk, 2019b). Kerugian yang timbul akibat serangan penyakit dapat berbentuk kematian, pertumbuhan yang lambat atau produksi benih menurun. Sehingga secara tidak langsung penyakit dapat menurunkan produksi dan menyebabkan kerugian secara ekonomi.

Meskipun penyakit yang disebabkan oleh bakteri pada ikan dapat diatasi dengan antibiotik, tetapi hal ini tidak dianjurkan mengingat sifat resistensi bakteri terhadap antibiotik jika digunakan secara terus menerus, serta dapat merusak lingkungan dan membahayakan manusia yang mengkonsumsi ikan (Maisyaroh dkk, 2018). Oleh karena itu perlu dilakukan pencarian metode lain yang aman bagi ikan dan lingkungannya serta manusia yang mengkonsumsinya yaitu dengan memanfaatkan bahan alami seperti Madu dan tanaman obat yang memiliki aktivitas antibakteri.

Madu hutan Kefa yang dikombinasikan dengan patikan kerbau telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan *V. alginolyticus* secara *in Vitro* (Salosso, 2019a). Demikian pula secara *in vivo* telah terbukti mampu menyembuhkan ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* dan ikan kerapu cantang yang terinfeksi *V. alginolyticus* (Salosso, et al, 2023). Namun pada pengujian secara *in vitro*, belum diketahui kestabilan aktivitas antibakteri baik madu maupun patikan kerbau jika diambil pada waktu yang berbeda maupun lama penyimpanan yang berbeda. Dari data uji stabilitas aktivitas antibakteri dan kandungan senyawa aktif dari madu dan patikan kerbau, akan dijadikan dasar dalam melakukan kombinasi madu dan patikan kerbau untuk menghasilkan aktivitas antibakteri yang terbaik dan dapat menyembuhkan ikan yang terinfeksi bakteri.

1.2. Rumusan Masalah:

1. Bagaimana stabilitas kandungan senyawa aktif madu hutan kefa, patikan kerbau dan kombinasinya, yang dikumpulkan pada waktu dan lama penyimpanan yang berbeda?
2. Bagaimana stabilitas aktivitas antibakteri madu, patikan kerbau dan kombinasinya yang dikumpulkan pada waktu dan lama penyimpanan serta tempat pengambilan yang berbeda, dalam menghambat pertumbuhan Bakteri *A.hydropilla*?
3. Bagaimana perbedaan kemampuan madu, patikan kerbau dan kombinasi madu dan patikan kerbau dalam menyembuhkan ikan mas yang terinfeksi bakteri *A.hydropilla* skala laboratorium.

1.3. Tujuan Khusus

Tujuan yang akan dicapai pada penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui stabilitas kandungan senyawa aktif madu hutan kefa, patikan kerbau dan kombinasinya, yang dikumpulkan pada waktu dan lama penyimpanan yang berbeda.
2. Untuk mengetahui stabilitas aktivitas antibakteri madu, patikan kerbau dan kombinasinya yang dikumpulkan pada waktu dan lama penyimpanan serta tempat pengambilan yang berbeda, dalam menghambat pertumbuhan Bakteri *A.hydropilla*.
3. Untuk mengetahui perbedaan kemampuan madu, patikan kerbau dan kombinasi madu dan patikan kerbau dalam menyembuhkan ikan mas yang terinfeksi bakteri *A.hydropilla* skala laboratorium.

1.4. Urgensi Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi yang nyata bagi : **Pengembangan ilmu pengetahuan**, penelitian ini memiliki arti penting dalam mengungkapkan aktivitas antibakteri madu dan patikan kerbau serta potensinya untuk mengendalikan penyakit bakterial pada budidaya ikan;

Pembangunan nasional, Metode pengendalian penyakit bakterial pada budidaya ikan dengan menggunakan madu dan patikan kerbau akan mengatasi masalah kerugian akibat kematian ikan serta mengatasi masalah kerugian akibat penggunaan

antibiotik sintetik. Dengan demikian produksi petani ikan akan meningkat dan keamanan pangan dalam mengkonsumsi ikan dapat terjamin serta budidaya ikan tidak mencemari lingkungan dan biaya produksi petani ikan akan berkurang sehingga pada akhirnya akan meningkatkan produksi ikan secara nasional.

Pembangunan daerah, penelitian ini memiliki manfaat dan arti strategis dalam mengembangkan potensi daerah NTT, khususnya potensi madu yang merupakan salah satu produk local NTT. Dengan mengembangkan madu sebagai antibakteri pada ikan, maka akan meningkatkan permintaan terhadap madu sehingga nilai jualnya akan meningkat dan akan terbuka usaha baru bagi masyarakat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. State of the art

2.1.1. Penggunaan Madu Sebagai Antibakteri Alami pada Budidaya Ikan

Potensi antibakteri yang terdapat dalam madu disebabkan oleh beberapa mekanisme yaitu adanya senyawa radikal hidrogen peroksida yang bersifat dapat membunuh mikroorganisme patogen (Johnstond et al, 2018; Nadhilla, 2015), tingkat keasaman madu yang tinggi akan mengurangi pertumbuhan dan daya hidup bakteri, sehingga bakteri akan mati (Johnstond et al, 2018), kadar gula yang tinggi akan menghambat bakteri untuk hidup dan berkembang dan adanya senyawa organik yang bersifat antibakteri (Carina et al, 2014).

Madu mengandung banyak senyawa biologis yang memiliki efek farmakologis yang berbeda seperti sebagai antibakteri, antioxindant, anti-inflammatory, dan imunostimulan (Dewi dkk, 2017). Aktivitas antioksidan dari madu *Trigono insica* telah dibuktikan oleh Gunawan, dkk (2018) dan tiga jenis madu pohon yang berasal dari New Zealand, Jerman, dan Algeria juga telah dibuktikan oleh Alzahrani et al (2012). Sedangkan aktivitas imunostimulan madu telah dibuktikan oleh Rosidah dkk (2019)a, yang dapat meningkatkan system kekebalan tubuh ikan mas Koi terhadap serangan bakteri *A.hydropilla*. Fuandila et al (2019) juga telah membuktikan kemampuan imunostimulan madu pada udang Vannamei yang ditantang dengan bakteri *Vibrio parahamoyliticus*. Demikian pula Orsi et al (2017) telah membuktikan imunostimulan ekstrak etanol dari propolis lebah *Apis mellifera* asal Brazil terhadap ikan nila yang ditantang dengan bakteri *A.hydropilla*.

Selain aktivitas antioksidan dan imunostimulan madu yang telah dibuktikan oleh peneliti terdahulu, madu juga telah dibuktikan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri pathogen pada ikan. Stratev et al (2015) telah membuktikan bahwa madu Rapa dan Royal jeli asal Bulgaria berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *A.hydropilla*. Ramalivhana el al, (2014) telah membuktikan bahwa madu asal Afrika Selatan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *A.hydropilla*.

2.1.2. Penggunaan Patikan kerbau sebagai Antibakteri pada Ikan

Patikan kerbau (*Euphorbia hirta*) merupakan suatu tumbuhan liar yang banyak ditemukan di daerah yang beriklim tropis. Patikan kerbau mengandung senyawa fenolik, flavanoid, tanin dan triterpenoid¹¹, yang memungkinkan untuk dikembangkan sebagai antibakteri alami pada budidaya ikan. Kandungan senyawa kimia patikan kerbau tidak sama pada semua tempat. Patikan kerbau yang berasal dari Malaysia mengandung flavanoid, tannin, fenolik, saponin, steroid, alkaloid dan terpenoid²¹. Di Tamilude India mengandung Flavanoid, tannin, fenolik, saponin dan steroid²², di cina mengandung Flavanoid, tannin, fenolik alkaloid dan terpenoid²³. Demikian pula yang berasal dari Indonesia juga memiliki kandungan senyawa aktif yang berbeda-beda, patikan kerbau yang berasal dari lampung mengandung saponin, tannin, Flavanoid dan terpenoid²⁴, yang berasal dari Denpasar mengandung flavanoid, Tanin, triterpenoid dan steroid²⁵.

Telah dibuktikan aktivitas antibakteri patikan kerbau terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *shigella dysenteriae*, dan *Basillus suptilis*²¹. Aktivitas antibakteri patikan kerbau terhadap bakteri *E. coli*, *S. aureus*, *B. suptilis*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris* dan *Micrococcus luteus* juga telah dibuktikan²⁶. Aktivitas antibakteri pada bakteri pathogen pada ikan telah dilakukan oleh Assidqi, Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa Ekstrak daun patikan kebo (*E. hirta*) memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap *A. hydrophila* secara *in vitro*. Konsentrasi minimum ekstrak daun patikan kebo (*E. hirta*) yang dapat menghambat bakteri *A. hydrophila* adalah 0,156% dan Konsentrasi minimum yang dapat membunuh bakteri *A. hydrophila* adalah 0,312%²⁷.

Pada penelitian Salosso dan jasmanindar, telah didapatkan Konsentrasi minimum ekstrak air daun patikan kerbau yang dapat menghambat pertumbuhan (MIC) bakteri *A. hydrophila* dan *V. harveyi* adalah 0,156 % sedangkan konsentrasi minimum yang mematikan (MBC) kedua bakteri tersebut adalah 0,625%. Kemampuan patikan kerbau, dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginoliticus* dimungkinkan karena senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman tersebut yang terlarut dalam pelarut polar yaitu pelarut air dan metanol¹¹.

2.2. Peta Jalan Penelitian

2.2.1. Penelitian Yang Telah Dilakukan

Salosso dan Jasmanindar (2013) melakukan penelitian tentang kajian potensi antibakteri sepuluh jenis tanaman obat yang tidak ekonomis yang ada di NTT, hasilnya menunjukkan bahwa tanaman patikan kerbau dan patikan cina merupakan tanaman yang berpotensi sebagai antibakteri karena dapat menghambat dan mematikan bakteri *A. hydrophilla* dan *V. alginolitycus* secara in vitro.

Selanjutnya diteliti kandungan fitokimia, metode ekstraksi senyawa aktif, analisis HPLC ekstrak aktif, konsentrasi minimum yang dapat menghambat dan mematikan *A. hydrophilla* dan *V. alginolitycus* serta toksisitas patikan kerbau terhadap ikan lele dan kerapu tikus. Hasilnya menunjukkan bahwa patikan kerbau mengandung senyawa fenolik, tanin, flavanoid, dan triterpenoid yang menyebabkan Ekstrak air patikan kerbau dapat menghambat bakteri *A. hydrophilla* dan *V. alginolitycus* pada Konsentrasi minimum 0,156 % dan konsentrasi minimum yang mematikan adalah 0,625% serta aman digunakan pada ikan lele dan kerapu tikus pada dosis 1% ke bawah yang direndam selama 5 menit. Selain itu, pada ekstrak methanol didapatkan masih terdapat 8 jenis senyawa (Hasil analisis HPLC).

Penelitian tentang pemanfaatan *Madu* asal NTT sebagai antibakteri alami dalam pengendalian penyakit bakterial pada budidaya ikan telah dilakukan oleh penulis mulai dari tahap *in vitro* sampai skala laboratorium. **Secara in vitro**, Uji aktivitas antibakteri madu terhadap bakteri *A. hydrophilla* dan *V. alginolitycus* telah dilakukan. Hasilnya menunjukkan bahwa, madu yang memiliki aktivitas antibakteri terbaik adalah madu **semut asal semau** kemudian disusul **madu hutan asal kefa**, namun yang lebih berpotensi untuk dikembangkan sebagai antibakteri adalah madu hutan asal kefa karena tidak bersifat musiman sedangkan madu semut bersifat musiman.

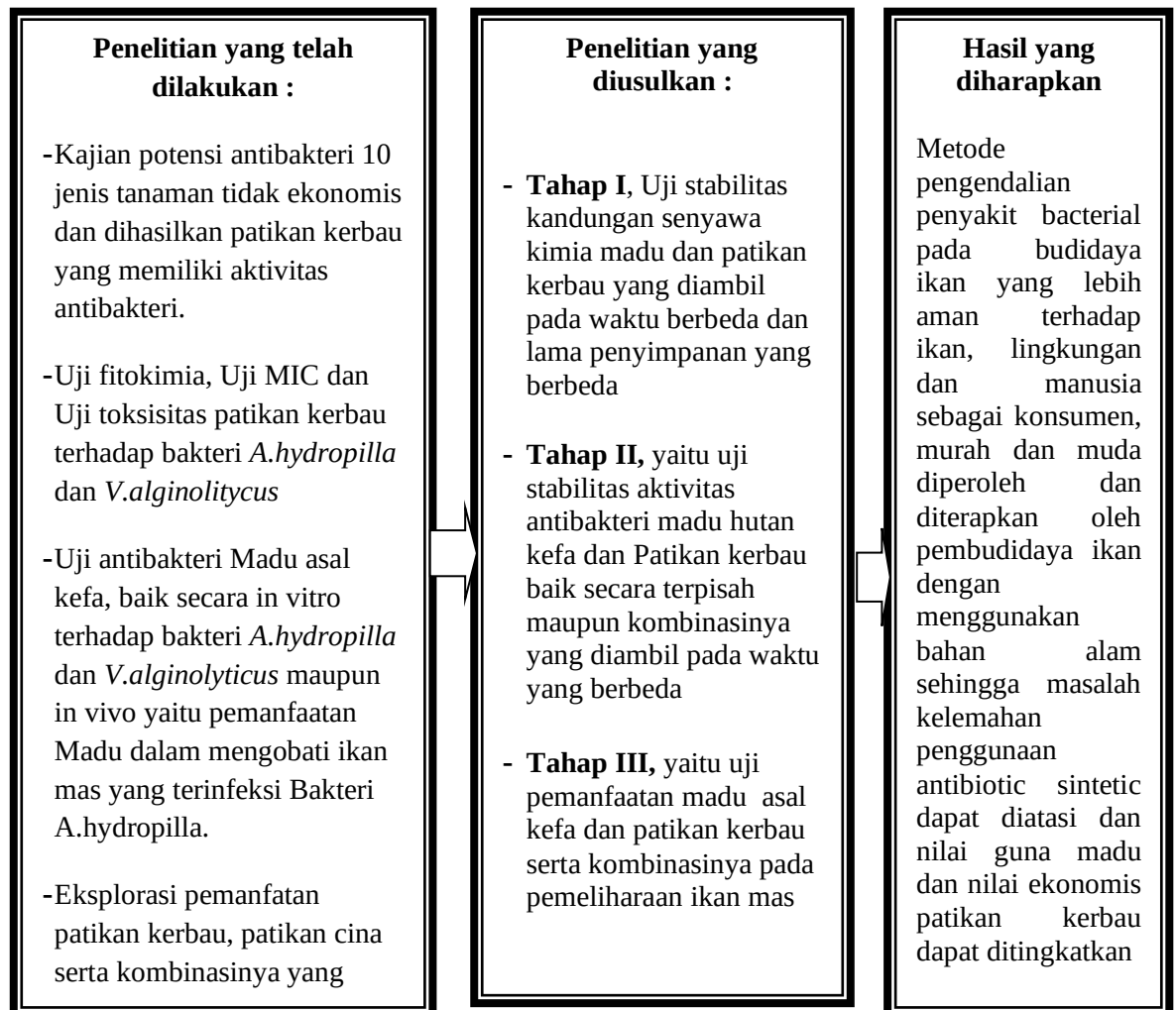
Pada skala laboratorium, telah diuji pemanfaatan madu terhadap ikan mas. Pada pemeliharaan ikan mas, didapatkan bahwa madu semut (Salosso, 2018) dan madu hutan asal kefa dapat menyembuhkan ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophilla* dengan metode perendaman selama 3 hari pada konsentrasi perbandingan madu (1) : air (4) (Salosso, 2020).

Hasil penelitian Salosso dan jasmanindar (2013) dan Salosso dkk (2018) inilah yang dijadikan dasar untuk mengeksplorasi pemanfaatan patikan kerbau,

patikan cina serta kombinasinya yang dicampur dengan madu kefa sebagai antibakteri pada budidaya ikan (Salosso, 2021). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi madu dan patikan kerbau dapat bersifat antibakteri terhadap bakteri *A.hydropilla* dan *V.alginolitycus* secara in vitro dan In vivo.

2.2.2. Penelitian Yang diusulkan

Masih perlu diuji kestabilan kandungan senyawa aktif dan aktivitas antibakteri dari madu, dan patikan kerbau yang diambil pada waktu yang berbeda dan waktu penyimpanan yang berbeda (Tahap 1 dan 2). Selain itu perlu diketahui perbedaan kemampuan madu, patikan kerbau dan kombinasi madu dan patikan kerbau dalam menyembuhkan ikan mas yang terinfeksi bakteri *A.hydropilla* skala laboratorium (Tahap 3).



Gambar 1. Peta Jalan Penelitian

BAB III

METODE PENELITIAN

Berdasarkan tujuan yang akan dicapai, maka penelitian ini dibagi dalam 3 tahap yaitu Tahap I, II dan III yang dilaksanakan selama satu tahun.

TAHUN 2023				
Tahapan	Kegiatan	Target	Indikator	keterangan
I	Pengumpulan madu hutan asal kefa pada setiap panen	Dihasilkannya madu pada setiap penen (mewakili musim kemarau dan hujan)	Tersedianya madu pada Tiap musim yang siap diuji antibakteri	Luaran dari tahap I dan II adalah data stabilitas senyawa kimia dan aktivitas antibakteri madu hutan asal kefa dan patikan kerbau
	Pengujian kandungan senyawa fitokimia	Diketuinya kandungan senyawa kimia dari madu pada setiap musim	Data kandungan Fitokimia madu hutan asal kefa	
	Pengujian kandungan air, pH, H ₂ O ₂ total gula	Diketuinya kandungan air, pH dan total gula, H ₂ O ₂ madu pada setiap musim	Data kandungan air, gula, pH dan H ₂ O ₂ madu pada setiap musim	
	Pengujian antioksidan dan vitamin C patikan kerbau	Diketahui stabilitas kandungan gula dan mineral madu pada setiap musim	Data kandungan jenis gula dan mineral madu pada setiap musim	
II	Pengujian aktivitas antibakteri madu dan patikan kerbau	Diketahui stabilitas antibakteri madu hutan kefa dan patikan kerbau pada setiap musim	Data aktivitas antibakteri Madu dan patikan kerbau pada setiap musim	
III	Pengumpulan madu hutan asal kefa dan patikan kerbau	Dihasilkannya madu hutan asal kefa dan patikan kerbau	Tersedianya madu hutan asal kefa dan patikan kerbau yang akan digunakan pada tahap II	Luaran Tahap III adalah metode pemanfaatan madu pada budidaya ikan yang akan
	Uji pemanfaatan madu, patikan kerbau dan kombinasinya dalam pengobatan ikan mas yang diinfeksi dengan bakteri <i>A.hdropilla</i>	Diketuinya perbedaan kemampuan madu, patikan kerbau dan kombinasi madu dan patikan kerbau dalam menyembuhkan ikan mas yang terinfeksi bakteri <i>A.hdropilla</i> skala laboratorium	• Data Hematologi • Data sintasan ikan mas • Data morfologi	

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Uji kandungan senyawa kimia madu, patikan kerbau dan kombinasinya

4.1.1. Madu

Hasil uji kandungan total gula, air, aktivitas air (Aw), pH madu yang diambil pada waktu yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji kandungan total gula, air, Aw, pH madu pada waktu pengambilan yang berbeda

No	Parameter	Waktu pengambilan	
		Juli 2022	Mei 2023
1	Total gula (%)	61,55	61,21
2	Air (%)	27,9	27,94
3	Aw	0,745	0,582
4	pH	3,8	5,8
5	Vitamin C (mg/100g)	70,34	114,60
6	Antioksidan IC50 (mg/ml)	6,59	5,85

Pada Tabel 1 terlihat bahwa madu yang disimpan selama 1 tahun (panen Juli 2022), tidak terlalu mengalami perubahan kandungan gula dan air sedangkan Aw mengalami penurunan pada madu yang baru dipanen (Panen Mei 2023), sebaliknya pada pH mengalami peningkatan. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun madu disimpan selama 1 tahun tidak terlalu mengalami perubahan. Sebagaimana yang dikatakan oleh Wulandari (2017), bahwa kadar air yang rendah akan menjaga madu dari kerusakan untuk jangka waktu yang relative lama.

Madu hutan asal kefa baik yang baru panen maupun yang telah disimpan 1 tahun, memiliki kandungan total gula yang tinggi yaitu berkisar 61,55% - 61,21%. Kandungan total gula madu hutan asal kefa ini tidak berbeda jauh dengan kandungan total gula madu hutan asal Soe yaitu 74,37% (Salosso , 2019a) dan madu batu asal Timor yaitu 74,22% (Salosso, 2019b). Namun lebih tinggi dari madu batu asal semau yaitu hanya 66,2% (Salosso, 2019b). Walaupun pulau semua merupakan bagian dari NTT, seperti soe dan kefa namun memiliki kandungan gula madu yang agak berbeda, hal ini dapat disebabkan karena perbedaan iklim pulau Timor dan pulau Semau yang mempengaruhi jenis tanaman yang tumbuh disekitar hutan tempat madu bersarang. Demikian pula ,jika dibandingkan dengan kandungan total gula dari madu provinsi lain, seperti madu pohon karet asal

kabupaten Bangka Tengah mengandung total gula 74,77 % (Evahelda dkk, 2017). Perbedaan ini dapat disebabkan oleh perbedaan lokasi pengambilan madu, dimana setiap lokasi memiliki tanaman atau hutan yang merupakan sumber nektar yang berbeda. Sebagaimana yang dikemukakan oleh Parwata dkk, (2010) bahwa, Madu memiliki komposisi kandungan senyawa kimia yang berbeda-beda termasuk total gulanya berdasarkan sumber pakan nektarnya.

Perbedaan kandungan air madu dipengaruhi oleh beberapa factor seperti faktor iklim, penanganan pasca panen, jenis nektar yang dikumpulkan, tingkat kematangan madu, proses produksi dan penyimpanan (Baroni, et al, 2009). Hal ini telah dibuktikan dengan adanya perbedaan kandungan air Madu hutan asal kefa yang berkisar 27,9%-27,94% dengan tempat lain. Kandungan air madu asal kefa lebih besar dari kandungan air yang ditemukan oleh Nadhila (2014) yaitu berkisar 15%-21% dan Stratev et al (2015) yaitu 16,8%. Demikian pula kandungan air madu hitam pahit dan madu hitam manis asal Kalimantan tengah yaitu masing-masing 16,19% dan 15,40% (Fitrianingsih dkk, 2014), serta beberapa madu asal Indonesia berkisar 17,8% – 21,0% (Dewi dkk, 2017). Namun tidak jauh berbeda dengan Kandungan air madu dari nektar pohon karet asal kabupaten Bangka Tengah adalah 24,25 % (Evahelda dkk, 2017).

Nilai pH madu hutan asal kefa baik yang baru maupun yang telah disimpan adalah berkisar 3.8 – 5.8. Nilai kisaran pH madu hutan asal kefa ini cenderung sama dengan nilai pH madu yang berasal dari tempat lain di Indonesia seperti madu karet asal Bangka yaitu 3,92 (Evahelda dkk, 2017), madu randu mempunyai nilai pH 3,8, rambutan 4,21, lengkung 4,48, dan madu *kaliandara* 4,37 (Chayati, 2008). Demikian pula di Negara lain seperti madu asal India nilai pHnya 4,1 (Veeraputhiran et al, 2013) dan madu Rafe asal Bulgaria nilai pHnya 3,232 (Stratev, et al, 2015). Menurut Gulfranz et al., (2010), perbedaan nilai pH madu dapat disebabkan perbedaan kandungan mineral dan asam pada madu. Selanjutnya menurut Buba dkk (2013), kandungan mineral madu dipengaruhi oleh kondisi tanah, letak geografis dan kondisi iklim tempat tumbuh tanaman yang menjadi sumber nektar.

4.1.2. Patikan kerbau

Hasil uji kandungan Vitamin C dan aktivitas antioksidan *E.hirta* pada waktu pengambilan berbeda dapat di lihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji kandungan Vitamin C dan aktivitas antioksidan *E.hirta* yang diambil pada waktu yang berbeda dan tempat yang sama

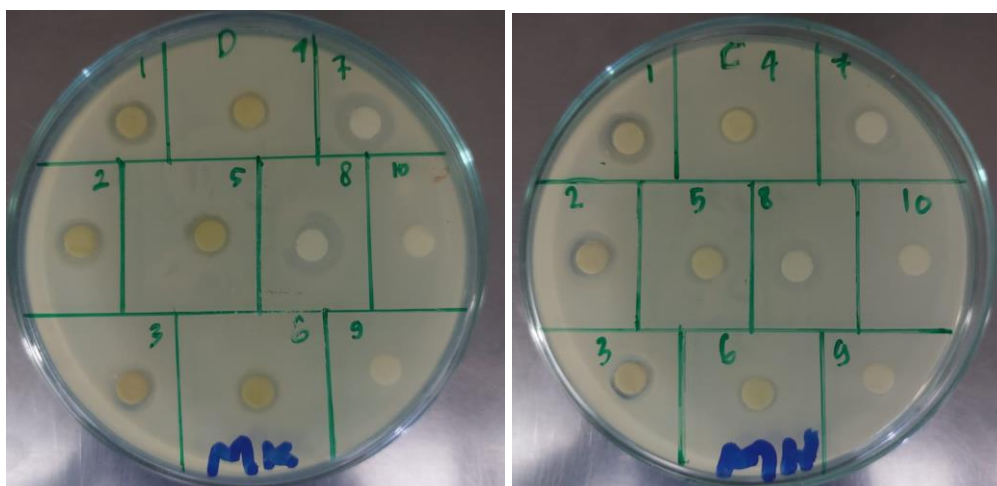
No	Parameter	Waktu pengambilan	
		Juli 2022	Maret 2023
1	Vitamin C (mg/100g)	13,26	12,58
2	Antioksidan IC50 (mg/ml)	1,49	0,78

Tabel 2 terlihat bahwa kombinasi madu dan *E.hirta* mengandung vitamin C 6,73 mg/100g yang lebih tinggi dari kandungan vitamin C madu yaitu 3,28 mg/100g. sedangkan antioksidan LC 50 kombinasi madu dan *E.hirta* lebih rendah dari madu.

4.2 Hasil Uji Antivitas antibakteri, madu, Patikan kerbau dan kombinasinya

4.2.1. Madu

Hasil Uji antibakteri madu hutan asal Kefa yang diambil pada waktu berbeda terhadap bakteri *A.hydropilla* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Uji antibakteri madu hutan asal Kefa yang diambil pada waktu berbeda terhadap bakteri *A.hydropilla*

Madu hutan asal kefa, baik yang baru maupun yang telah disimpan selama 1 tahun tetap memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *A.hydropilla* yang

merupakan bakteri patogen pada ikan (Gambar 2). Besar kecilnya zona hambat yang dihasilkan menunjukkan kekuatan antibakteri dari madu tersebut. Jika dibandingkan dengan zona hambat yang dihasilkan madu hutan musi rawas terhadap bakteri *E. coli* pada konsentrasi yang sama yaitu 100% (madu murni) yang mencapai 31 mm (Huda, 2013), maka kekuatan antibakteri dari madu hutan asal kefa terhadap bakteri *A. hydrophilla* masih jauh lebih rendah yang hanya 13 mm dan 12 mm. Demikian pula jika dibandingkan dengan zona hambat yang dihasilkan madu asal bandung terhadap bakteri *S. aureus* berkisar 21,33 mm -13,76 mm dan *E. coli* berkisar 14,93 mm - 19,67 mm (Dewi dkk, 2017). Demikian pula yang dihasilkan madu asal Tamil Nadu, India, terhadap 10 jenis bakteri gram negatif dan gram positif, yaitu madu Konbu berkisar 22-34, madu Malan berkisar 17-26, madu komersil 17-22 (Kalidasan et al, 2017).

Aktivitas antibakteri madu, baik yang baru dipanen maupun yang telah disimpan, dapat disebabkan oleh beberapa mekanisme seperti tingkat keasaman madu yang tinggi (Johnstond *et al.*, 2018; Carina *et al.*, 2014; Nadhilla, 2014), kadar gula yang tinggi, serta adanya senyawa organik yang bersifat antibakteri (Carina et al, 2014). Selain itu juga karena adanya senyawa radikal hidrogen peroksida (H_2O_2) yang bersifat dapat membunuh mikroorganisme patogen (Johnstond *et al.*, 2018; Nadhilla, 2014; Carina *et al.*, 2014).

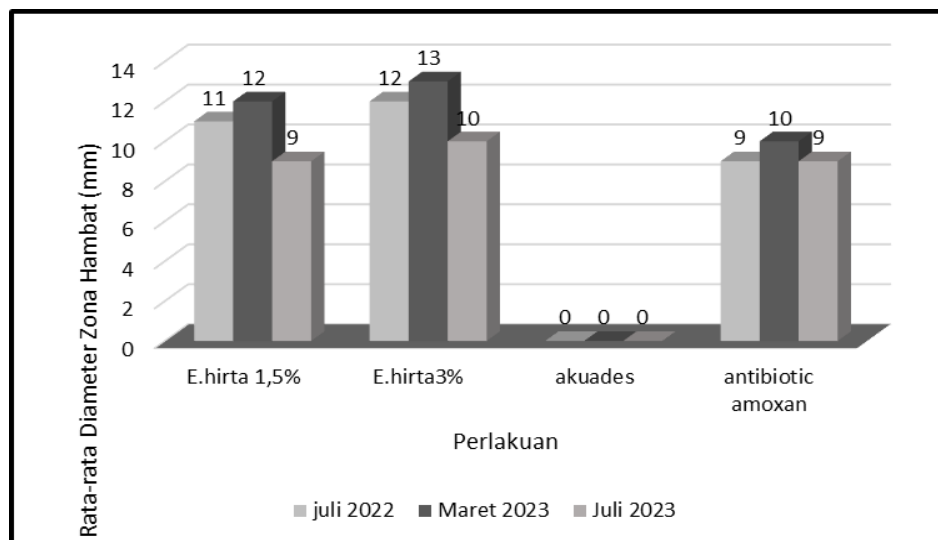
Madu memiliki nilai pH rendah, sehingga dapat mencegah pertumbuhan berbagai macam bakteri karena bakteri dapat berkembang pada pH netral atau tidak asam (Garedew, et al, 2003). Keasaman memiliki pengaruh yang besar terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup bagi sel bakteri. Setiap spesies memiliki 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.

Menurut Evahelda dkk, (2017), tingginya kandungan gula akan menyebabkan madu menjadi pekat atau kental, sehingga membuat madu memiliki sifat higroskopis. Sifat higroskopis pada madu ditentukan oleh fruktosa. Hal ini dikarenakan fruktosa bersifat lebih mudah larut dibandingkan glukosa (Buba dkk., 2013). Selanjutnya menurut Erguder (2008), Kadar gula pada madu yang terdiri dari campuran glukosa dan fruktosa menyebabkan madu memiliki sifat osmotik dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Aktivitas antibakteri yang lain pada madu adalah hidrogen peroksida yang dihasilkan secara enzimatis pada madu. Adanya senyawa radikal Hidrogen peroksida (H_2O_2) yang bersifat membunuh mikroorganisme patogen (Fadhmi, 2014). Selanjutnya Yuliati (2017), menjelaskan bahwa proses antimikroba dari hydrogen feroksida karena kemampuan pengoksidasian serta formasi radikal bebas hidroksil yang lebih toksik dari peroksida sehingga memudahkan terjadinya kerusakan sel-sel bakteri (Yuliati, 2017).

4.2.2. Patikan Kerbau

Hasil uji antibakteri patikan kerbau pada konsnetrasi 1,5% dan 3%, yang diambil pada waktu yang berbeda, dapat dilihat pada Gambar 3.

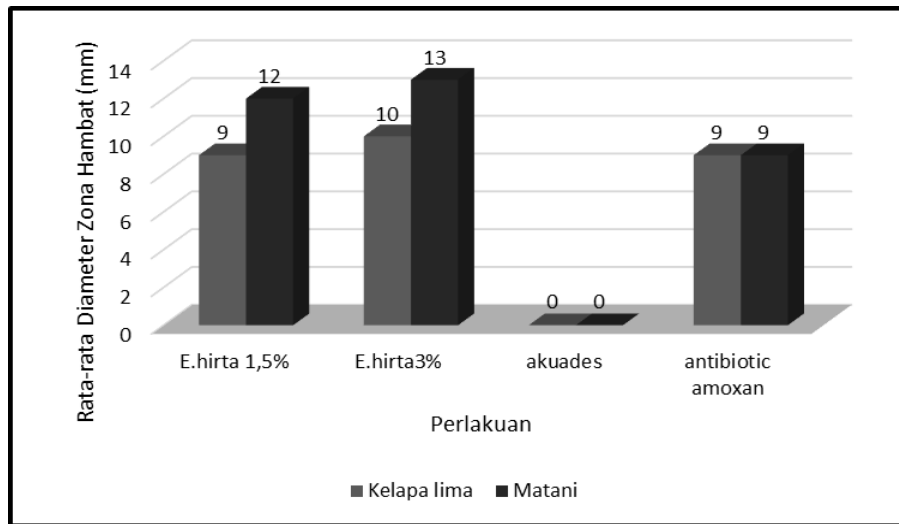


Gambar. 3. Rata-rata Diameter Zona Hambat Patikan kerbau pada berbagai konsentrasi terhadap bakteri *A.hydropilla*.

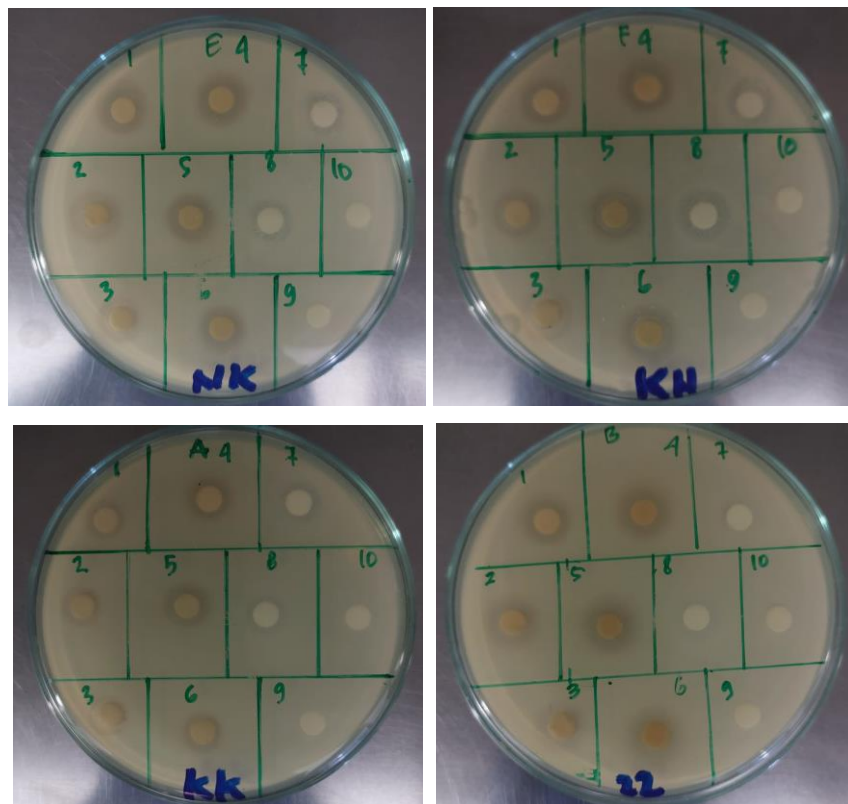
Pada Gambar 3 terlihat bahwa aktivitas antibakteri *E.hirta* paling tinggi yang diambil pada Bulan Maret 2023 dan paling rendah pada pengambilan bulan Juli 2023. Perbedaan ini dipengaruhi oleh keterlindungan dari *E.hirta*. Pada bulan Juli 2023, *E.hirta* yang diambil pada tempat yang agak terlindung, sehingga warna daunnya lebih hijau dari pada patikan kerbau yang di ambil pada bulan Maret 2023 dan Bulan Juli 2022.

Selain itu, uji antibakteri juga dilakukan pada Patikan kerbau pada berbagai konsentrasi yang diambil pada tempat yang berbeda. Hasil uji antibakteri patikan

kerbau pada berbagai konsnetrasi dan diambil pada tempat berbeda dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar. 4. Rata-rata Diameter Zona Hambat Patikan kerbau pada berbagai konsentrasi terhadap bakteri *A.hydrophilla*



Gambar. 5. Diameter Zona Hambat Patikan kerbau pada berbagai konsentrasi terhadap bakteri *A.hydrophilla*

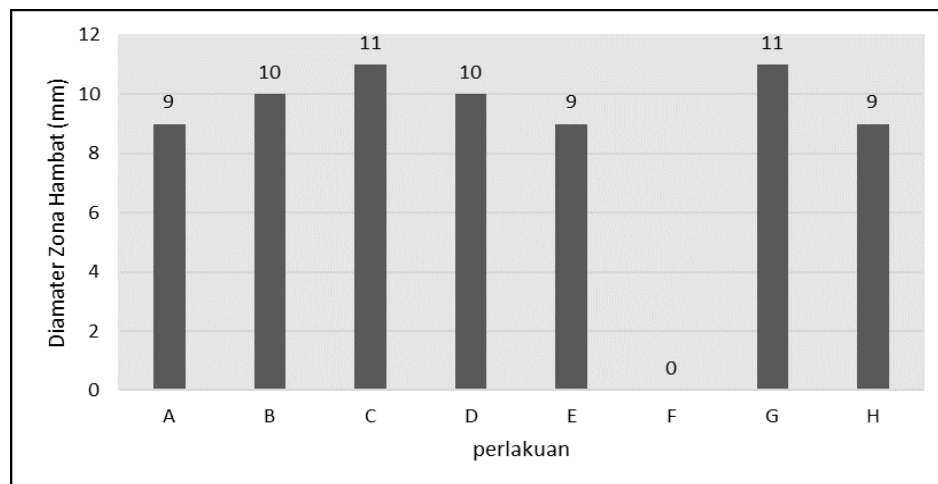
Rata-rata diameter zona hambat patikan kerbau terhadap bakteri *A.hydrophilla* (Gambar 5), paling tinggi pada konsentrasi 3%, namun lebih rendah dari antibiotic.

Konsentrasi patikan kerbau yang dikombinasikan dengan madu adalah 3%. Kemampuan patikan kerbau sebagai antibakteri disebabkan karena kandungan senyawa aktifnya seperti Flavanoid, tannin, fenolik (kader *et al*, 2013; Poornima and Prabakaran, 2012; Shih and Cherng, 2012), saponin dan steroid (kader *et al*, 2013; Poornima and Prabakaran, 2012), alkaloid dan terpenoid (kader *et al*, 2013; Shih and Cherng, 2012).

Mekanisme penghambatan atau mematikan bakteri dari ekstrak air patikan kerbau yang mengandung beberapa senyawa aktif bersinergis dalam menghambat bahkan mematikan bakteri. Mekanisme tersebut dapat berupa kerusakan dinding sel, kebocoran membran sitoplasma, penghambatan aktifitas enzim dan adanya metabolit serta penghambatan sintesa protein, penghambatan terhadap pembentukan dan pertumbuhan spora (Pelczar dan chan ,2005).

4.2.3. Kombinasi madu dan patikan kerbau

Hasil pengujian kombinasi madu dan *E.hirta* terhadap bakteri *A.hydopilla* dapat dilihat pada Gambar 6.



Keterangan :

- A Madu 100% + E.hirta 3 % (perbandingan 1 : 1)
- B Madu 50% + E.hirta 3 % (perbandingan 1 : 1)
- C Madu 100% + E.hirta 3 % (perbandingan 1 : 2)
- D Madu 50% + E.hirta 3 % (perbandingan 1 : 2)
- E Antibiotik
- F akuades
- G E.hirta
- H Madu

Gambar 6. Rata-rata Diameter Zona Hambat kombinasi madu dan *E.hirta* terhadap bakteri *A.hydopilla*

Pada Gambar 6, terlihat kombinasi madu dan *E.hirta* pada berbagai perbandingan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *A.hdropilla*. Aktivitas antibakteri *E.hirta* (perbandingan 0 : 3) menghasilkan zona bening yang paling rendah yaitu 10 mm dan paling tinggi dihasilkan pada madu (perbandingan 3 : 0) yaitu 20 mm, yang terjadi pada bakteri *V.alginoliticus* dan *A.hdropilla*.

Senyawa aktif yang terkandung dalam kombinasi patikan kerbau (*E.hirta*) dan madu hutan asal kefa dapat menyebabkan kombinasi madu dan patikan kerbau memiliki aktivitas antibakteri. Senyawa turunan fenolik seperti flavanoid dan tanin bersifat antibakteri dengan mekanisme merusak membran sel bakteri. Gugus hidroksil yang terdapat pada senyawa flavanoid dan tanin dapat berinteraksi dengan protein membran sel bakteri melalui ikatan hydrogen, sehingga protein tersebut kehilangan fungsinya (Cowan, 1999).

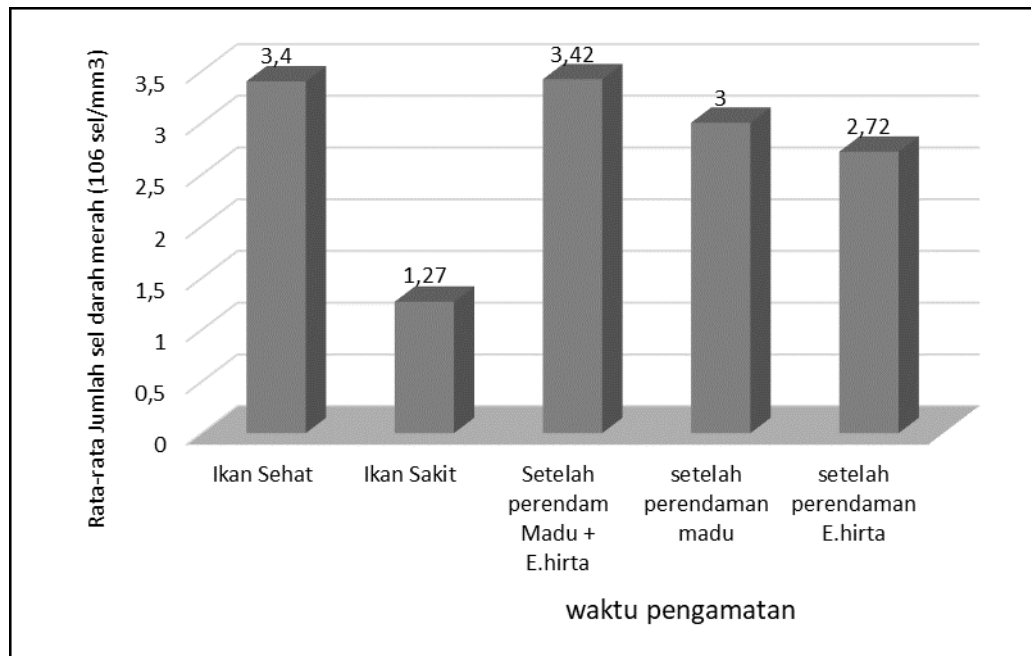
Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan kerusakan membrane sel yang akhirnya mengakibatkan sel bakteri mengalami lisis (Kurnawan dan Aryana, 2015). Demikian pula alkaloid bersifat antibakteri dengan Mekanisme mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel bakteri (Ajizah, 2004). Selanjutnya menurut Cowan (1999), Terpena dan terpenoid mempunyai daya antimikroba terhadap bakteri, melalui mekanisme perusakan membran sel akibat gugus hidrofobik yang dimilikinya.

4.3. Hasil Uji Pengobatan Ikan Mas dengan menggunakan Madu, Patikan kerba dan Kombinasinya

4.3.1. Hematologi ikan Mas

a. Sel Darah Merah (Eritrosit)

Perubahan jumlah sel darah merah (Eritrosit) pada ikan mas yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Jumlah Eritrosit (sel/mm³) ikan mas yang terinfeksi bakteri *A.hydropilla* Selama Penelitian.

Eritrosit adalah salah satu jenis sel darah pada ikan yang mengandung hemoglobin yang merupakan protein kompleks yang memiliki kemampuan untuk mengikat oksigen (Dewantoro, 2019). Pada Gambar 1 terlihat bahwa pada ikan mas yang sehat, sel darah merahnya mencapai 3.400.000 sel/mm³ sedangkan pada ikan mas yang sakit sel darah merahnya mengalami penurunan mencapai 1.270.000 sel/mm³. Namun sel darah merahnya mengalami peningkatan kembali setelah direndam dengan kombinasi madu kefa dan Patikan kerbau selama 5 hari berturut-turut yaitu mencapai 3.420.000 sel/mm³. Hal ini menunjukkan bahwa perendaman ikan mas yang sakit dengan kombinasi madu kefa dan patikan kerbau memberi efek kesembuhan bagi ikan mas, karena sel darah merahnya kembali mendekati normal. Hal yang sama ditemukan pada sel darah merah ikan mas yang sembuh dari serangan bakteri *A. hydropilla* setelah mendapat perlakuan perendaman dengan daun miana yang dicampur madu, yaitu mengalami peningkatan dari 1.030.000 sel/mm³ (ikan sakit) menjadi 1.450.000 sel/mm³ (setelah perendaman), yang mendekati ikan sehat yaitu 1.510.000 sel/mm³ (Salosso, 2018).

Jumlah sel darah merah ikan mas yang sehat pada penelitian ini (3.400.000 sel/mm³) lebih tinggi dari sel darah merah ikan sehat (control) yang ditemukan

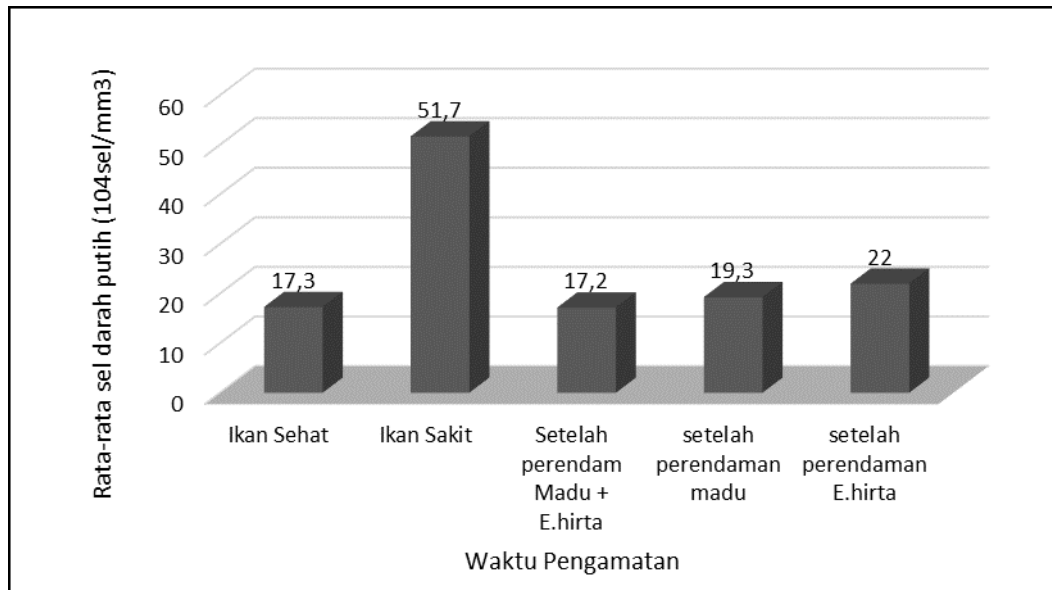
oleh Riantono, dkk (2016), yaitu 2.360.000 sel/mm³, demikian pula jumlah eritrosit pada ikan mas yang ditemukan pada penelitian Dianti dkk (2013) yaitu 2.980.000 sel/mm³. Hal ini menunjukkan bahwa walaupun jenis ikannya sama namun jumlah sel darah merahnya bervariasi. Sebagaimana yang dikemukakan oleh Ejraei *et al.*, (2015), bahwa Jumlah eritrosit bergantung pada jenis ikan, umur, nutrisi dan kondisi lingkungan.

Pada ikan mas yang terinfeksi bakteri *A.hydropilla* (kondisi sakit) mengalami penurunan sel darah merah. Hal ini disebabkan karena adanya enzim-enzim eksotoksin yang dihasilkan oleh *A.hydropilla* yang bersifat virulen seperti protease dan hemolisin. Menurut Triyaningsih dkk (2014), *A.hydropilla* mampu menghasilkan enzim protease dan hemolisin yang bersifat virulen pada ikan. Enzim protease merupakan enzim yang mampu melawan pertahanan tubuh inang untuk berkembangnya penyakit dan mengambil persediaan nutrien. Sedangkan enzim Hemolisin yang terlarut dalam darah lebih lanjut mampu melisis sel darah merah dan membebaskan hemoglobinnnya sehingga darah banyak yang keluar melewati luka pada permukaan tubuh yang terinfeksi. Hal ini menyebabkan terjadinya haemoragik pada ikan yang terinfeksi bakteri *A.hydropilla*.

Sel darah merah ikan mas mengalami peningkatan kembali setelah dilakukan perendaman/pengobatan dengan kombinasi madu dan patikan kerbau. Hal ini menunjukkan kemampuan kombinasi madu dan patikan kerbau dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A.hydropilla* yang menyerang ikan mas. Kemampuan aktivitas antibakteri kombinasi madu hutan kefa dan patikan kerbau yang telah terbukti secara *in vitro* dengan menghasilkan zona hambat, juga telah terbukti mampu menyembuhkan ikan mas yang terinfeksi *A.hydropilla*, yang ditandai dengan perubahan hematolgis darah ikan mas mendekati sehat kembali. Kesembuhan ikan mas yang terinfeksi *A.hydropilla* ini, melalui mekanisme antibakteri dari madu hutan asal kefa berupa kandungan gula yang tinggi, pH madu yang bersifat asam dan kandungan senyawa antibakteri yang dimiliki oleh madu (Salosso, 2019c: Yuliati, 2017: Hegazi, et al, 2017). Demikian pula mekanisme antibakteri yang dimiliki oleh patikan kerbau karena senyawa aktifnya (Salosso and Jasmanindar, 2014).

b. Sel Darah Putih (Leukosit)

Perubahan jumlah sel darah putih (leukosit) pada ikan mas yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Rata-rata Jumlah Leukosit (sel/mm³) Selama Penelitian

Pola perubahan sel darah putih berbeda dengan sel darah merah, dimana pada sel darah putih mengalami peningkatan pada ikan yang sakit dan turun pada ikan yang sehat (Gambar 8). Sel darah putih pada ikan mas yang sehat hanya 173.000 sel/mm³, dan mencapai 517.000 sel/mm³ pada ikan mas yang sakit. Peningkatan sel darah putih pada ikan yang sakit merupakan salah satu reaksi tubuh dalam menghadapi serangan bakteri. Hal ini sesuai dengan pernyataan (Dwinanti *et al*, 2014), bahwa meningkatnya jumlah sel darah putih menunjukkan ikan dalam kondisi terinfeksi dan tubuh dalam ikan mengantisipasi kondisi tersebut dengan memproduksi sel darah putih lebih banyak sebagai respon imunitas.

Peningkatan jumlah leukosit pada ikan yang terinfeksi juga terjadi pada ikan lele sangkuriang yang terinfeksi *A.hydrophilla* dari 70.020 sel/mm³ meningkat menjadi 103.300 sel/mm³ (Rosidah, et al, 2019)a. Ikan mas yang terinfeksi *A.hydrophilla* dari 27.300 sel/mm³ menjadi 34.700 sel/mm³ (Dianti et al, 2013). ikan mas koki yang terinfeksi *A.hydrophilla* dari 75.200 sel/mm³ menjadi 82.733 (Rosidah, et al, 2019)b. Demikian pula pada ikan nila yang terinfeksi bakteri

Flavobacterium columnare yaitu dari 19.500 sel/mm³ menjadi 29.500 sel/mm³ (Sebastiao, et al, 2011).

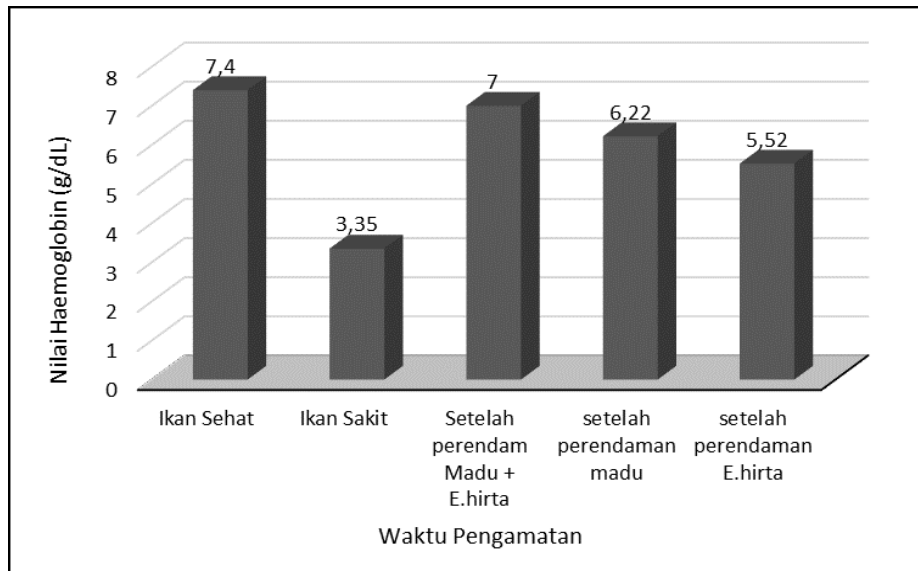
Leukosit berperan dalam sistem pertahanan tubuh ikan terhadap infeksi patogen. Oleh karena itu pada saat ikan terinfeksi bakteri, jumlah leukositnya meningkat (Fauzan dkk, 2017). Dengan adanya perlakuan pengobatan dengan madu akan membantu sistem pertahanan tubuh ikan dalam melawan infeksi bakteri. Rosidah et al, (2019)b mengatakan bahwa berbagai kandungan madu saling mendukung untuk meningkatkan sistem kekebalan ikan, sehingga berfungsi sebagai imunostimulan.

Madu memiliki kemampuan sebagai antioksidan kuat, menghambat formasi radikal bebas, sehingga melindungi komponen sel dari bahan berbahaya (Alzahrani et al, 2012). Selanjutnya menurut Puertollano et al., (2011), Senyawa antioksidan memiliki hubungan dekat dengan sistem kekebalan tubuh karena membantu melindungi sel-sel kekebalan tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas.

Vitamin C merupakan salah satu senyawa yang berperan sebagai antioksidan. Menurut Bogdanov et al (2008), salah satu jenis vitamin yang dikandung madu adalah asam askorbat (vitamin C). Kandungan vitamin C dalam madu meningkatkan sistem pertahanan tubuh dengan merangsang interferon (Rosidah, et al, 2019). Pendapat yang sama ini diungkapkan oleh Van Gorkom et al. (2018), yang menyebutkan bahwa vitamin C meningkatkan interferon dan aktivitas sel imun, limfosit dan makrofag. Selanjutnya menurut Carr & Maggini, 2017, Vitamin C memberikan efek menguntungkan pada fungsi seluler bawaan dan sistem imun adaptif, merangsang migrasi neutrofil ke tempat infeksi untuk meningkatkan fagositosis. Asupan vitamin C dilaporkan mampu membuat tubuh lebih tahan terhadap infeksi dengan memungkinkan produksi interferon dan leukosit, di samping mempertahankan proses inflamasi (Van Gorkom et al., 2018). Dengan mekanisme antioksidan dan imunostimulan dari senyawa yang dikandung dari madu, telah membantu proses penyembuhan ikan mas yang terinfeksi bakteri *A.hydopilla* sehingga komposisi darahnya kembali normal.

c. Kadar Hemoglobin

Perubahan kadar haemoglobin ikan mas selama penelitian dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Rata-rata Jumlah Hemoglobin (g/dL) Selama Penelitian

Rata-rata haemoglobin tertinggi ditemukan pada saat ikan dalam keadaan sehat, yaitu sebesar 7,4 gr/dL, sedangkan rata-rata haemoglobin terendah adalah pada ikan sakit yaitu 3,35 gr/dL. Nilai haemoglobin mengalami penurunan pada ikan yang sakit namun meningkat kembali setelah ikan mendapat pengobatan dengan madu kefa yaitu mencapai 6,22 gr/dL, patikan kerbau yaitu mencapai 5,52 gr/dL dan kombinasi madu dan patikan kerbau yaitu mencapai 7,0 gr/dL. Perubahan kandungan Haemoglobin sama dengan yang terjadi pada perubahan sel darah merah (Gambar 9). Kadar Hemoglobin pada ikan sangat berhubungan dengan jumlah sel eritrosit pada ikan karena hemoglobin terdapat pada eritrosit.

Penurunan sel darah merah pada ikan yang sakit akan diikuti dengan penurunan nilai Hb, yang diakibatkan oleh adanya enzim eksotoksin yang dihasilkan oleh bakteri *A.hydropilla* terutama enzim hemolisin (Triyaningsih dkk, 2014). Kadar hemoglobin yang terdapat dalam sel darah merah (eritrosit) memiliki peran sebagai pengikat oksigen sehingga sangat menentukan kemampuan metabolisme ikan (Dewantoro, 2019). Rendahnya kadar hemoglobin menyebabkan jumlah oksigen dalam darah rendah (Pahmi dkk, 2019), yang berlanjut dengan laju metabolisme yang menurun dan energi yang dihasilkan rendah. Hal ini menyebabkan ikan kehilangan nafsu makan sebagai salah satu ciri tingka laku ikan sakit.

Adanya peningkatan kadar Hb pada ikan yang diberi pengobatan dengan madu menunjukkan bahwa madu dapat menyembuhkan ikan yang terinfeksi bakteri

A. hydrophilla. Kemampuan madu menyembuhkan ikan mas yang terinfeksi bakteri *A. hydrophilla*, dimungkinkan melalui mekanisme antibakteri, antioksidan, dan imunostimulan dari madu. sebagaimana yang dikemukakan oleh Dewi dkk (2017), bahwa madu memiliki efek antibakteri, antioxindant, antiinflamsi dan meningkatkan system imun.

4.2.2. Morfologi Ikan Mas

Gejala klinis ikan selama penelitian dilihat dari kondisi fisik ikan pada saat ikan dalam kondisi sehat, pada saat ikan diinfeksi bakteri *A. hydrophilla* dan setelah ikan melalui proses pengobatan menggunakan madu (Gambar 10).



Gambar10. Ikan mas selama penelitian : (a) ikan sehat, (b) Ikan sakit, (c) ikan setelah pengobatan

Gambar 10a, memperlihatkan bahwa gejala klinis pada saat ikan dalam kondisi normal yaitu ikan berwarna cerah dan sisik mengkilat dan tidak ada yang terlepas. Namun, pada saat ikan mas diinfeksi bakteri *A. hydrophila* mulai menunjukkan gejala terinfeksi bakteri yaitu adanya luka pada bagian punggung bekas suntikkan, munculnya warna merah pada kulit dan sisik terlepas (Gambar 10b). Gejala klinik yang sama juga ditemukan pada beberapa ikan air tawar yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* seperti pada ikan lele sangkuriang (Rosidah dkk, 2019a), pada ikan lele dumbo (Triyaningsih dkk, 2014), pada ikan mas (Dianti dkk, 2013) dan ikan gurami (Susandi dkk, 2017), ikan nila (Maisyaroh dkk, 2018).

Timbulnya gejala klinis pada luka dan pendarahan pada tubuh ikan disebabkan oleh toksin yang disebabkan oleh *A. hydrophila*, salah satunya adalah toksin hemolisin. Sebagaimana menurut Pratama *et al.* (2017) timbulnya warna kemerahan pada permukaan tubuh ikan diakibatkan oleh aktivitas enzim hemolisin yang dihasilkan bakteri *A. hydrophila* dengan target memecah sel-sel darah merah, sehingga sel keluar dari pembuluh darah dan menimbulkan warna kemerahan pada permukaan kulit. Dijelaskan lebih lanjut oleh Sartika (2011), bahwa enzim-enzim ini dapat merusak permukaan tubuh yang terinfeksi dikarenakan pada jaringan otot dan saluran darah terdapat banyak protein.

Setelah ikan menunjukkan gejala terinfeksi bakteri, ikan segera diberi pengobatan dengan menggunakan madu kefa dengan metode perendaman. Setelah ikan diobati selama 3 hari berturut-turut, ikan mulai menunjukkan respon yang baik ketika diberi pakan, luka yang terdapat pada tubuh ikan perlahan-lahan membaik, luka pada tubuh ikan hilang dan warna ikan kembali cerah (Gambar 10c).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Kandungan senyawa kimia madu hutan kefa tidak banyak berubah pada pengambilan musim yang sama dan tahun yang berbeda sedangkan kandungan senyawa kimia patikan kerbau tidak berbeda pada setiap waktu dan tempat pengambilan namun yang membedakan adalah tempat tumbuh dari patikan kerbau yang mendapat naungan kandungan senyawa aktifnya lebih rendah dari patikan kerbau yang tidak mendapat naungan.
2. Aktivitas antibakteri madu tidak berbeda antara madu yang diambil pada musim yang sama, sedangkan aktivitas antibakteri patikan kerbau juga dipengaruhi oleh tempat tumbuh patikan kerbau yang mendapat naungan dan yang tidak mendapat naungan.
3. Kombinasi Madu hutan kefa dan Patikan kerbau merupakan perlakuan yang terbaik yang dapat menyembuhkan ikan mas yang terinfeksi bakteri *A.hydropilla* dengan menaikkan sel darah merah dari 1.270.000 sel/mm³ (ikan sakit) menjadi 3.420.000 sel/mm³ (setelah pengobatan), menaikkan Hemoglobin dari 3,35 gr/100 ml (ikan sakit) menjadi 7,0 gr/100 ml (setelah pengobatan) dan menurunkan sel darah putih dari 517.000 sel/mm³ (ikan sakit) menjadi 172.000 sel/mm³(setelah pengobatan).

5.2. Saran

1. masih perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk standarisasi madu dan patikan kerbau yang memiliki aktivitas antibakteri yang terbaik
2. Masih perlu dilakukan penelitian penggunaan madu dan patikan kerbau pada tahap lapangan

DAFTAR PUSTAKA

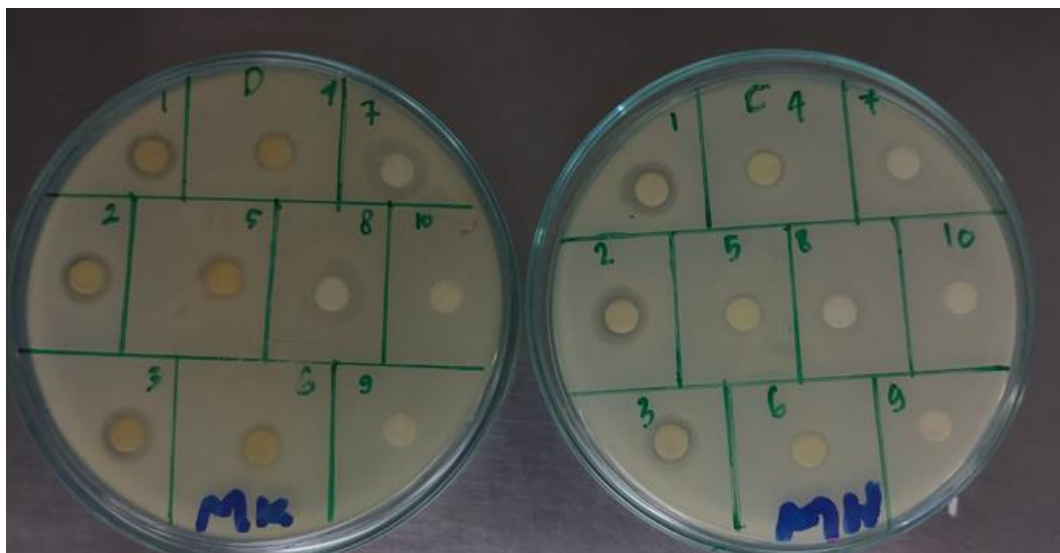
1. Novriadi, R. 2016. Vibriosis In Aquaculture. OmniAkuatika, 12 (1): 1-12, 2016.
2. Orsi R,O., V.G.D. Santos., L.E. Pezzato, P.L.P.F. De carvalho., C. P. Teixeira, J.M.A. Freitas., C.R. Padovani., M.M.P.Sartori and M.M. Barros. 2017. Activity of Brazilian Propolis against aeromonas hydrophilla and its effect on Nila tilapia Growth, hematological and non-specific immune response under bacterial infection. Anais da Academia Brasileira de Ciencias (2017) 89(3):1785-1799.
3. Rosidah, I. D. Buwono, W. Lili, I. B. Suryadi, A. R. Triandika. 2019a. Ketahanan ikan lele sangkuriang, *Clarias gariepinus* Burchell 1822 terhadap *Aeromonas hydrophila* pasca pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L.) melalui pakan. Jurnal Iktiologi Indonesia, 19(1): 97-113 DOI: <https://doi.org/10.32491/jii.v19i1.435>. hal 97-113.
4. Rosidah, Sriati, U. Subhan, Y. Mulyani dan R. Dermawan. 2019b. The effectiveness of Honey supplementation in feed for improving goldfish fingerling *Carassius auratus* Immune system against *Aeromonas hydrophilla* bacteria attack. Jurnal Akuakultur Indonesia 18(1) : 89-100.
5. Yuasa, K., Koesharyani, I. and Zafran. 2000. Control of *Cryptocaryon* infection in cultured humpback grouper *Cromileptes altivelis* broodstock. In: "Aquatic Animal Health for Sustainability", Book of Abstracts, OP 59, Fourth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, November 22-26, 1999, Cebu, Philipin
6. Maisyaroh, L.A., T. Susilowati., A. H. C. Haditomo, F. Basuki dan T. Yuniarti. 2018. Penggunaan Ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana*) sebagai antibakteri untuk mengobati infeksi *Aeromonas hydrophilla* pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)
7. Salosso, Y. 2019a. The Potential Of Forest Honey (Apis Spp.) From Timor Island As Antibacterial Against Pathogenic Bacteria In Fish Culture. Indonesian Aquaculture Journal, 14 (2), 2019, 1-8.
8. Salosso, Y. F. Rebhung, Sunadji, Anggrainy K. 2020. Application of Kefa Forest Honey as antibacterial in the treatment of common carp (*Cyprinus carpio*)infected with bacteria *Aeromonas hydrophilla*. AACL Bioflux 13(2):984-992
9. Novriadi, R. 2014. Penyakit Ikan Air Laut di Indonesia. Kementrian Kelautan dan Perikanan Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Direktorat Kesehatan Ikan dan Lingkungan.
10. Maftuch, Setyawan F H and Suprastyani H. 2018. Uji Daya Hambat Ekstrak Chaetoceros Calcitrans terhadap Bakteri *Aeromonas salmonicida* J. Fish. Mar. Res. 2 39–46
11. Bhuvanewari R. 2012. Anti-Bacterial Activity Of Acorus Calamus And Some Of Its Derivatives Against Fish Pathogen *Aeromonas Hydrophila*. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences ISSN: 2231-6345 (Online) An Online International Journal Available at <http://www.cibtech.org/jls.htm> 2012 Vol. 2 (2) April-June, pp. 191- 201

12. Salosso, Y. 2012. Kandungan Senyawa Kimia Dan Aktivitas Antibakteri Tanaman Obat Tradisional Terhadap Bakteri *Aeromonas Hydrophila*. *Prosiding Seminar Nasional Tahunan Ix Hasil Penelitian Perikanan Dan Kelautan Tahun 2012*, Yogyakarta, 14 Juli 2012. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta
13. Johnston M., M. McBride, D. Dahiya, R. Owusu-Apenten and P. S. Nigam. 2018. Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS Microbiology*, 4(4): 655–664.
14. Nadhilla N.F. 2015. The Activity of antibacterial agent of Honey against *Staphylococcus aureus*. *Artikel Review. Jurnal Majority* vol 3 no 7 Desember 2014. Hal 94-101.
15. Carina, L., V. Soledad and B. Marina. 2014. Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* Vol. 6(3), pp. 51-56, March 2014
16. Dewi, M.A., Kartasasmita, R.E., & Wibowo, M.S. (2017). Antibacterial activity tests on several types of Indonesian honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Kartika; Jurnal Ilmu Farmasi*, 5(1), 27-30 [in Indonesian].
17. Gunawan R, Erwin dan Syafrizal. 2018. Uji fitokimia dan penentuan aktivitas antioksidan dari madu trigono incisa. *Jurnal Atomik*, 03 (1), hal 18-21.
18. Alzahrani HA, Boukraa L, Bellik Y, Abdellah F, Bakhotmah BA, Kolayli S, Sahin H. 2012. Evaluation of the antioxidant activity of three varieties of honey from different botanical and geographical origins. *Global Journal of Health Science* 4: 191–196.
19. Fuandila, N,N., W. Widanarni and M. Yuhana. 2019. Growth performance and immune response of prebiotik honey fed facific Shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio parahamolyticus*. *Journal of Applied aquaculture*. Pp 1-15.
20. Stratev, D., I. Vashin, R. Balkanska, D. Dinkov. 2015. Antibacterial Activity Of Royal Jelly And Rape Honey Against *Aeromonas Hydrophila* (Atcc 7965). *Journal Of Food And Health Science* 1(2): 67-74.
21. Ramalivhana JN, Obi CL, Samie A, Iweriebor BC, Uaboi-Egbenni P, Idiaghe J.E. and Momba M. N. B. 2014. Antibacterial activity of honey and medicinal plant extracts against Gram negative microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 13 (4), pp. 616-625, 22 January 2014.
22. Salosso, Y. 2019b. Chemical composition and antibacterial activity of honey collected from East Nusa Tenggara, Indonesia on pathogenic bacteria in aquaculture. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **370** 012030. 1-7
23. Salosso, Y. 2019c. Uji Antibakteri Madu Semut Asal Pulau Semau Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio alginolitycus*. *Jurnal Sains Dan Inovasi Perikanan*, vol 3 no 2. 68-72. Juli 2019
24. Salosso, Y. F. Rebhung, Sunadji. 2018. Potensi Beberapa Jenis Madu Nusa Tenggara Timur Sebagai Antibakteri Pada Budidaya Ikan. Laporan Penelitian. Fakultas Kelautan dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana, Kupang

25. Hotty, R. Y. Salosso, Sunadji. 2017. Pengendalian Bakteri Patogen *Vibrio alginolitycus* pada Ikan Kerapu Cantang dengan Pemanfaatan Madu Batu. Jurnal kelautan dan Perikanan, Undana, Edisi Desember 2017.

Lampiran 1. Hasil uji antibakteri madu hutan kefa yang diambil pada waktu berbeda terhadap bakteri *A.hydopilla* pada konsentrasi 100 % dan 50%

No	Perlakuan Madu	Diamater zona Hambat			
		Juli 2022	Mei 2023	Juli 2023	Oktober 2023
1	Madu 100%		10	11	
2			10	11	
3			10	12	
Rata-rata			10	11,33	
Stdev					
1	Madu 50%		8	9	
2			8	9	
3			8	9	
Rata-rata			8	9	
Stdev					
1	akuades		0	0	
2			0	0	
Rata-rata			0	0	
1	Antibiotik		9	12	
2			9	12	
Rata-rata			9	12	

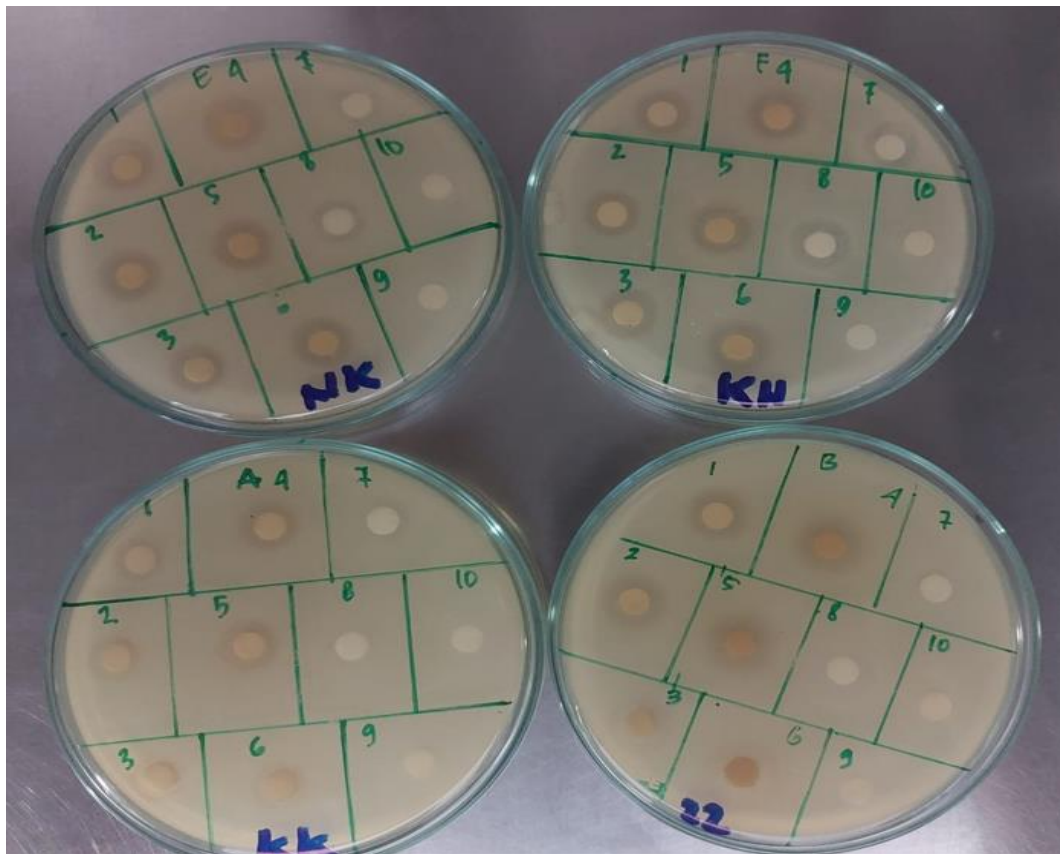


Lampiran 2. Hasil uji antibakteri *E.hirta* yang diambil pada waktu yang sama dan tempat yang berbeda pada berbagai konsentrasi terhadap bakteri *A.hdropilla*

No	Perlakuan Madu	Diameter zona Hambat	
		Kelapa lima	Matani
1	E.hirta 1,5 %	9	12
2		9	12
3		9	12
Rata-rata		9	12
Stdev			
1	E.hirta 3%	10	13
2		10	13
3		10	13
Rata-rata		10	13
Stdev			
1	akuades	0	0
2		0	0
Rata-rata		0	0
1	Antibiotik	9	9
2		9	9
Rata-rata		9	9

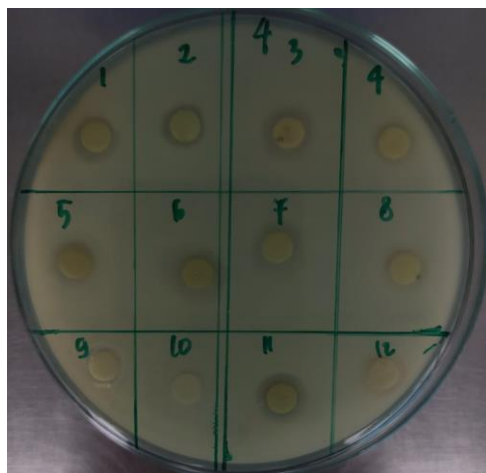
Lampiran 3. Hasil uji antibakteri *E.hirta* yang diambil pada waktu berbeda dan tempat yang sama pada berbagai konsentrasi terhadap bakteri *A.hdropilla*

No	Perlakuan Madu	Diameter zona Hambat			
		Juli 2022	Maret 2023	Juli 2023	Oktober 2023
1	E.hirta 1,5 %	11	12	9	
2		11	12	9	
3		11	12	9	
Rata-rata					
Stdev					
1	E. hirta 3 %	12	13	10	
2		12	13	10	
3		12	13	10	
Rata-rata					
Stdev					
1	akuades	0	0	0	
2		0	0	0	
Rata-rata					
1	Antibiotik	9	10	9	
2		9	10	9	
Rata-rata					



Lampiran 4. Hasil uji antibakteri Kombinasi Madu dan *E.hirta* pada berbagai konsentrasi dan perbandingan terhadap bakteri *A.hydropilla*

no	Perlakuan kombinasi Madu + <i>E. hirta</i>	Diamater zona Hambat
1	Madu 100% + <i>E.hirta</i> 3 % (perbandingan 1 : 1)	9
2		9
Rata-rata		9
3	Madu 50% + <i>E.hirta</i> 3 % (perbandingan 1 : 1)	10
4		10
Rata-rata		10
5	Madu 100% + <i>E.hirta</i> 3 % (perbandingan 1 : 2)	11
6		11
Rata-rata		11
7	Madu 50% + <i>E.hirta</i> 3 % (perbandingan 1 : 2)	10
8		10
Rata-rata		10
9	Antibiotik	9
10	akuades	0
11	<i>E.hirta</i>	11
12	Madu	9



Lampiran 5. Hasil Pengukuran Eritrosit Ikan mas Selama Penelitian

Ulangan	Ikan sehat	Ikan sakit	7 hari setelah pengobatan		
			Perlakuan Madu	Perlakuan Patikan kerbau	Perlakuan M+PK (Campur)
1	3.400.000	1.295.000	3.010.000	2.430.000	3.290.000
2	3.460.000	1.260.000	2.940.000	2.780.000	3.468.000
3	3.340.000	1.255.000	3.050.000	2.950.000	3.502.000
Jumlah	10.200.000	3.810.000	9.000.000	8.160.000	10.260.000
Rata-rata	3.400.000	1.270.000	3.000.000	2.720.000	3.420.000

Lampiran 6. Hasil Pengukuran Leukosit Ikan mas Selama Penelitian

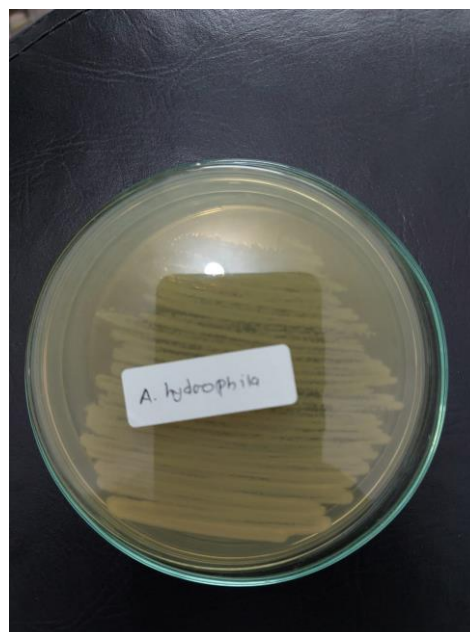
Ulangan	Ikan sehat	Ikan sakit	7 hari setelah pengobatan		
			Perlakuan Madu	Perlakuan Patikan kerbau	Perlakuan M+PK (Campur)
1	169.000	520.000	196.000	235.000	170.000
2	180.000	514.000	189.000	215.000	183.000
3	170.000	517.000	195.000	210.000	164.500
Jumlah	519.000	1.551.000	580.000	660.000	517.500
Rata-rata	173.000	517.000	193.000	220.000	172.500

Lampiran 7. Hasil Pengukuran Haemoglobin Ikan mas Selama Penelitian

Ulangan	Ikan sehat	Ikan sakit	7 hari setelah pengobatan		
			Perlakuan Madu	Perlakuan Patikan kerbau	Perlakuan M+PK (Campur)
1	7,2	3,25	6,22	5,62	7,1
2	8,6	3,55	5,92	5,62	7,1
3	6,4	3,25	6,51	5,33	6,8
Jumlah	22,2	10,05	18,65	16,57	21,00
Rata-rata	7,4	3,35	6,22	5,52	7,00

Lampiran 8. Dokumentasi kegiatan Penelitian

Kultur bakteri



Pengumpulan dan Penjemuran Patikan kerbau





**ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANT AND NUTRITION CONTENT
OF KEFA FOREST HONEY AND ITS ANTIBACTERIAL
ACTIVITY AGAINST *Aeromonas hydrophila***

Journal:	<i>Journal of Oleo Science</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Regular Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Salosso, Yuliana; Universitas Nusa Cendana, Aquaculture Fransira, Immaria; Universitas Nusa Cendana, Aquaculture Liufeto, Franchy ; Universitas Nusa Cendana, Aquaculture Sunadji, Sunadji; Universitas Nusa Cendana, Aquaculture Pasaribu, Wesly; Universitas Nusa Cendana, Aquaculture
Keywords:	antibacterial, Kefa forest honey, <i>Aeromonas hydrophila</i>
Categories:	Biochemistry & Biotechnology

SCHOLARONE™
Manuscripts

**ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANT AND NUTRITION CONTENT OF KEFA
FOREST HONEY AND ITS ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST *Aeromonas
hydrophila***

By

**Yuliana Salosso¹, Sunadji¹, Franchy Christian Liufeto¹
Immaria Fransira¹ and Wesly Pasaribu¹**

¹Aquaculture Study Program, Universitas Nusa Cendana, Kupang

Email address: yulianasalosso@staf.undana.ac.id

Abstract

This study aims to determine the antibacterial activity of kefa forest honey against *Aeromonas hydrophila* and the content of chemical compounds, antioxidants and nutrients from kefa forest honey that allow its development as antibacterial and antioxidant. The antibacterial test was conducted using the disc method. Total sugar content was measured by using spectrophotometer, water content was measured by Gravimetric method and pH by using pH meter. Chemical compound data from kefa forest honey was identified using LCMS. Proximate and Vitamin C analysis followed the AOAC method, namely measurement of Protein content with Kjeldahl method, fat by soklet method, ash and water by Gravimetric method, vitamin C by Titrimetric method with Iodine and antioxidant measurement using DPPH method. The results showed that to determine the efficiency of using Kefa forest honey as an antibacterial against *A. hydrophila*, it can be diluted to a concentration of 50%. At 50% honey dilution, it can cause a decrease in the antibacterial activity of honey due to an increase in water content and a decrease in sugar content, but the pH content of diluted honey can still inhibit bacterial growth, because the pH of honey is still low (3.9). In addition, there are four potential compounds with the best inhibition against aerolysin which is a virulence marker factor of *A. hydrophila*, namely D-(+)-Maltose, D-Glucosamine, Muramic acid and 3,4-Dihydroxybenzaldehyde. Honey also showed antioxidant activity as indicated by the LC 50 result of 30.98, which is due to the vitamin C content of honey which is 3.28 mg/100g.

Keywords: Kefa forest honey, antibacterial, antioxidant, *Aeromonas hydrophila*

INTRODUCTION

East Nusa Tenggara Province is one of the provinces with a lot of honey production (Salosso, 2019b), especially forest honey, which has the potential as an antibacterial in fish farming. Forest honey is a type of polyphlora honey produced by wild bees of the *Apis dorsata* species (Muslim, 2014; Salosso et al., 2020). One of the forest honey producing areas in NTT is Kefa, which is the capital of North Central Timor Regency.

These wild bees usually live in the forest so that their food sources are diverse plants that grow in the forest, so the quality of honey produced is better because it comes from diverse plant nectar (Muslim, 2014). Forest honey produced by wild bees contains natural antibiotics produced by wild bees so that it has the potential to be developed as an antibacterial both in humans and in fish farming.

Aeromonas hydrophila is one of the bacteria that often attacks freshwater fish (Orsi et al., 2017; Triyaningsih et al., 2014) which causes *Motile Aeromonas Septicemia* or MAS disease (Rosidah, Buwono, et al., 2019; Susandi & Rosmawati, 2017) and causes 100% mortality (Rosidah, Subhan, et al., 2019). The characteristics of carp affected by MAS disease are changes in skin color, lesions on the skin, bleeding and bruising or ulcers on the muscles (Laith & Najiah, 2014; Susandi & Rosmawati, 2017). Furthermore, (Lukistowati & Kurniasih, 2012) explained that *A. hydrophila* often causes disease outbreaks with high mortality rates reaching 80% - 100% in a short period of time (1-2 weeks).

The antibacterial ability of forest honey has been proven by several previous researchers, both honey from Indonesia and other countries. For honey from Indonesia, Dewi et al., 2017 have proven the antibacterial activity of some native honey from Bandung and Riau Islands against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Fadhmi et al., 2015 have also proven the antibacterial activity of forest honey from Seulawa (West Aceh) and Trumon (South Aceh) against *Staphylococcus aureus*. For honey from other country, Kalidasan et al., 2017 have proven the antibacterial activity of honey from Chetheri Malai, Harur, tamil Nadu, India against *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumonia*, *proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Actobacter baumani*. Furthermore, Hegazi et al., 2017 also proved the antibacterial activity of 10 types of honey from Saudi Arabia against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mutans*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Salosso, 2019a has proven the antibacterial activity of several forest honey from NTT against *A. hydrophila* and *Vibrio alginolitycus* and one of the honeys that has the largest inhibition zone is forest honey from Kefa. However, to develop forest honey from Kefa, it is still necessary to study the nutritional content, active compounds and antibacterial activity of Kefa forest honey.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESEARCH METHOD

Preparation of Kefa Forest Honey and *A. hydrophila*

In this study, the main materials used were Kefa forest honey, and *A. hydrophila*. Kefa forest honey was taken from honey collectors in Kefa city who have customers are Kefa forest honey farmers. While the *A. hydrophila* used came from the Kupang Fish Quarantine Center which was isolated from diseased fish and has been identified as *A. hydrophila*.

Preparation of TSA Media and Antibacterial Test of Honey by Disc Method

The media used in this study is TSA (Trypticase Soy Agar) oxoid brand with the addition of 0.5% NaCl. TSA media used for antibacterial tests were made in two layers, solid TSA and semi-solid TSA. Solid TSA was made the day before the antibacterial test using TSA as stated on the label (40 g/l water). Meanwhile, the semi-solid TSA media was made at the time of the antibacterial test using 70% TSA as stated on the label (28 g/l water).

For the manufacture of solid TSA, after being autoclapped, it was poured into a petri dish (size 9 cm diameter) as much as 10 ml and left until solid then stored in the refrigerator in an inverted position. As for semi-solid TSA media, after autoclap, it was cooled to a temperature of approximately 50°C and then added *A. hydrophila* at a density of 10⁶ cells/ml. On top of the solid TSA media, poured semi-solid TSA media that was still warm and not frozen and had been mixed with *A. hydrophila*. After freezing, paper discs that have been soaked with honey for approximately 30 minutes were placed. Then incubated at 28°C for 24 hours. Then the diameter of the inhibition zone formed was measured.

Analysis of Total Sugar Content, pH, Water and Water Activity (Aw)

The total sugar content of Kefa forest honey was measured using a spectrophotometer and the water content was measured using the Gravimetric method, while the pH value was measured using a pH meter.

Analysis of Honey's Chemical Compounds and Prediction of Its Antibacterial Activity

Chemical compound data from Kefa forest honey was identified using LCMS. The 3D structure and Canonical Smile of the compounds contained in the

Kefa forest honey samples were downloaded from the PubChem database integrated with NCBI. Furthermore, the prediction of antibacterial activity of compounds was predicted with PASS Online (<http://www.way2drug.com/passonline/predict.php>).

Nutrient Content Analysis of Honey

Proximate and Vitamin C analysis followed the method of AOAC (2005), namely measurement of Protein content with Kjeldahl method, fat by soklet method, ash and water by Gravimetric method, vitamin C by Titrimetric method with Iodine and antioxidant measurement using DPPH method.

RESULT

Antibacterial Activity of Kefa Forest Honey at Various Concentrations

In this study, the antibacterial test of Kefa forest honey was carried out at concentrations of 25%, 50% and 75%, to determine the concentration of honey that can inhibit the growth of *A. hydrophila* (Table 1).

Table 1. Average Diameter of Inhibition Zone Diameter of Kefa Forest Honey at Various Concentrations Against *A. hydrophila*

Concentration	Inhibition Zone Diameter (mm)
25%	7,33 ^a ± 0,577
50%	11,33 ^b ± 0,577
75 %	13 ^b ± 1,732
Distilled Water	0
Antibiotic	16

Based on the results of inhibition zone diameter, it can be seen that Kefa forest honey has antibacterial activity against *A. hydrophila* ranging from 25% to 75% concentration. The antibacterial activity of 50% and 75% concentrations were not significantly different, so to make the use of honey as an antibacterial in fish farming more efficient, a concentration of 50% Kefa forest honey was used.

Chemical Physics Content of Kefa Forest Honey

The results of the chemical physics content of honey in the form of total sugar content, water content, pH and water activity that has been diluted to 50% can be seen in Table 2.

Table 2. Total Sugar Content, Water Content, pH and Water Activity of Kefa Honey at 50% Concentration

Parameter	Total Content
Total sugar (%)	36,83
Water (%)	52,95
Aw	0,903
pH	3,92

The chemical physics characteristics that cause honey to have antibacterial activity are due to its high sugar content, low water activity, and low pH. In Table 2, honey at 50% concentration contains 36% sugar, 52.92% water, pH 3.92, and water activity (Aw) 0.903 which allows honey to have antibacterial activity.

LCMS Test Result of Kefa Forest Honey

The results of the LCMS test of honey can be seen in Table 3 and the antibacterial activity of the identified compounds in kefa forest honey can be seen in Table 4.

Table 3. List of compounds identified in Kefa Forest Honey

Compound	CID PubChem
Adenine	190
Choline	305
Pipecolic acid	849
Uracil	1174
Dibutyl phthalate	3026
Kojic acid	3840
Kynurenic acid	3845
L-Phenylalanine	6140
Isobutyraldehyde	6561
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	8768
L-Norleucine	21236
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde	237332
2-Hydroxyphenylalanine	91482
Proline	145742
4-Indolecarbaldehyde	333703
D-(+)-Maltose	439186
D-Glucosamine	439213
D-(+)-Pyroglutamic Acid	439685
Muramic acid	441038
Crotonic acid	637090
N-(4-hydroxypentyl) metabolite	90464177

Table 4. Antibacterial Activity of Identified Compounds in Kefa Forest Honey

Compound	Antibacterial
D-(+)-Maltose	0,6
D-Glucosamine	0,596

Muramic acid	0,554
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	0,546
Crotonic acid	0,411
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde	0,407
Kynurenic acid	0,392
Proline	0,384
D-(+)-Pyroglutamic Acid	0,333
L-Norleucine	0,327
Isobutyraldehyde	0,314
Kojic acid	0,313
Uracil	0,283
Pipecolic acid	0,276
2-Hydroxyphenylalanine	0,25
Dibutyl phthalate	0,221
L-Phenylalanine	0,2
Choline	0,175
4-Indolecarbaldehyde	-
N-(4-hydroxypentyl) metabolite	-
Adenine	-

The compounds identified in the Kefa forest honey were predicted to have antibacterial activity with a probability of 0.1 - 0.6. Docking analysis showed that all compounds showed their potential as inhibitors of aerolysin and LuxT by binding several amino acids in both target proteins. Aerolysin (Aer) is a protein that forms a toxin pore that plays an important role in the pathogenesis of *A. hydrophila* and causes blood clots due to infection. Inhibition of Aerolysin and LuxT proteins by compounds contained in honey can prevent the virulence of *A. hydrophila*.

Vitamin C, Antioxidants and Nutrient Content of Kefa Forest Honey

The vitamin C, antioxidant and nutrient content of Kefa forest honey can be seen in Table 5.

Table 5. Test Results of Vitamin C, Antioxidant and Nutrient Content of 50% Concentration Kefa Forest Honey

Parameter	Total Content
Vitamin C (mg/100g)	3,28
Antioxidant IC50 (mg/ml)	30,98
Protein	0,29
Fat	0,07
Water	20,68

Ash	0,57
Carbohydrates	78,39
Amino acids include:	
L-Serine	289.46
L-Glutamic Acid	285.80
L-Phenylalanine	Not detected (Limit of detection 142,82)
L-Isoleucine	Not detected (Limit of detection 51,3)
L-Valine	<128,75
L-alanine	148.75
L-Arginine	Not detected (Limit of detection 115,87)
Glycine	146.44
L-Lysine	<336.07
L-Aspartic Acid	285.41
L-Leucine	<167.3
L-Tyrosine	Not detected (Limit of detection 182,4)
L-Proline	351.28
L.Threonine	496.36
L-Histidine	Not detected (Limit of detection 88,53)

Based on the results, it can be seen that Kefa forest honey contains Vitamin C 3.23 mg/100 g and Antioxidant 30.98 IC50 (mg/ml) which allows honey to have antioxidant activity. Apart from being antibacterial and antioxidant, honey also has potential as a source of nutrition for fish. Honey contains high carbohydrates and water, low protein and fat and contains amino acids. L-serine, L-Glutamic Acid, L-Valine, L-Alanine Glycine, L-Lysine, L-Aspartic Acid, L-Leucine, P-Proline, L-Threonine were detected in honey while L- phenylalanine, L-isoleucine, L-Arginine, L-Tyrosine and L-Histidine were not detected in honey because the content was below the limit read. The highest amino acid content of honey was L-Threonine 496 mg/kg followed by L-Proline 351 mg/kg.

DISCUSSION

Honey is one of the natural ingredients that has broad-spectrum antibacterial activity (Combarros-fuertes et al., 2020; Nolan et al., 2019), and can even be antibacterial against antibiotic-resistant bacteria (Albaridi, 2019). The antibacterial activity of honey can be due to the physical and chemical characteristics of honey (Combarros-fuertes et al., 2020) and also due to the content of honey compounds that have antibacterial activity. The content or composition of honey varies greatly and is highly dependent on the source of the flowers that the bees feed on (Combarros-fuertes et al., 2020). Forest honey from Kefa is one type of forest honey that has antibacterial activity against pathogenic

bacteria in fish, such as *A. hydrophila* and *V. alginolitycus* (Salosso, 2019a; Salosso et al., 2020).

Kefa forest honey has antibacterial activity against *A. hydrophila*, ranging from 25% to 75% concentration (Table 1). The antibacterial activity of this honey is evidenced by the formation of a clear zone around the disc paper, after incubation. The size of the inhibition zone indicates the antibacterial strength of the honey. In this study, it was found that the inhibition zone produced was influenced by the concentration of honey. At 75% concentration, the largest inhibition zone was 13 mm, which was not different from the 50% concentration of 11.33 mm, and still lower than antibiotics (16 mm).

When compared to the inhibition zone produced by pure forest honey (without dilution) from various places in Indonesia such as Musi Rawas forest honey against *E. coli* which reached 31 mm (Huda, 2013), so the antibacterial activity of forest honey from Kefa against *A. Hydrophila* is still much lower at only 13 mm. Similarly, when compared with the inhibition zone produced by forest honey from Bandung against *S. aureus* ranging from 21.33 mm - 13.76 mm and *E. coli* ranging from 14.93 mm - 19.67 mm (Dewi et al., 2017). This also happened for honey produced in other countries, such as honey from Tamil Nadu, India, against 10 types of gram-negative and gram-positive bacteria, namely Konbu honey ranging from 22-34, Malan honey ranging from 17-26, commercial honey 17-22 (Kalidasan et al., 2017). This shows that dilution will cause the decrease of honey antibacterial activity.

The antibacterial mechanism of honey can be caused by various factors such as low water activity (a_w) caused by the high sugar content of honey and low water, high acidity of honey (low pH), the presence of hydrogen peroxide radical compounds (H_2O_2) and the presence of organic compounds that are antibacterial (Libonatti et al., 2014; Nadhilla, 2014; Nolan et al., 2019; et al., 2018).

Honey has a high sugar content (Libonatti et al., 2014) and low water content. The combination of high sugar content and low water content causes honey to have low osmotic pressure and water activity value (Albaridi, 2019), which causes honey to have antibacterial activity. The osmotic pressure of honey can cause bacteria to lose water and become dehydrated, resulting in bacterial death (Albaridi, 2019; Combarros-fuertes et al., 2020). Similarly, low water activity values in honey cause bacteria to be unable to grow (Combarros Fuertes

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

et al, 2020). In addition, osmotic pressure also interferes with bacterial quorum sensing (Lee et al., 2011) and affects the ability of bacteria to form biofilms (Proaño et al., 2021).

In this study, 50% diluted honey was used, which caused the decrease of sugar content to 36.83% and the increase of water content to 52.95%. When compared to the sugar and water content of Kefa forest honey that did not undergo dilution (pure honey), which is 26.65 water content and 72.60 sugar content (Salosso, 2019a), then in this study, diluted honey showed the decreased sugar content and increased water content. The decrease in sugar content and increase in water content led to an increase in the water activity of Kefa forest honey, which was 0.903. The water activity value of 50% Kefa forest honey is higher than the water activity of honey which is 0.562 - 0.62 (Zamora & Chirife, 2006), 50% dilution of honey causes a decrease in the antibacterial activity of honey due to its osmotic pressure.

In contrast, the pH value of diluted Kefa forest honey, 3.92, is lower than that of pure (undiluted) Kefa forest honey, 4.06 (Salosso et al., 2020). Thus, the pH content of diluted honey can still inhibit bacterial growth, because a low pH (3.2 - 4.5), can create an unfavorable environment for bacteria (Karabagias, et al, 2014). Similarly stated by (Albaridi, 2019) that the pH of honey which ranges from 3.2 - 4.5 is one of the factors that cause the antibacterial activity of honey because most bacteria can live at pH 6.5 - 7.5. Furthermore, according to Proaño et al., 2021 and Küçük et al., 2007, the low pH value of honey is caused by the presence of certain organic acids, especially gluconic acid.

In addition to the chemical physics content of honey, the antibacterial activity of honey is also caused by the content of its active compounds. In this study, Kefa forest honey was found to contain 21 types of chemical compounds (Table 3), which indicated to have antibacterial activity of 0.1 - 0.6 (Table 4) by inhibiting Aerolisin and LUX T. With the ability to inhibit Aerolisin and LUX T, honey can be antibacterial against *A. hydrophila*. *A. hydrophila*, which is a pathogenic bacterium in fish, has several virulence substances and toxins including cytotoxins, proteases, s-layers, and aerolysins (Cristy, et al 2019), which have hemolytic effects. Aerolysin is an important virulence factor because it is a marker of whether an *Aeromonas* strain is virulent or not (Dong et al., 2021). This study shows that all compounds contained in Kefa forest honey have antibacterial potential. There are four potential compounds with the best

resistance to aerolysin, namely D-(+)-Maltose, D-Glucosamine, Muramic acid and 3,4-Dihydroxybenzaldehyde.

Kefa forest honey also has antioxidant activity as shown by the LC 50 result of 30.98. The antioxidant activity of honey can be caused by the vitamin C content of honey, which is 3.28 mg/100g. According to Alzahrani et al (2012), honey has the ability as a strong antioxidant, inhibiting free radical formation, thus protecting cell components from harmful materials. Furthermore, according to (A. Puertollano et al., 2011), antioxidant compounds are related to the immune system because they help protect immune cells from free radical damage.

The content of vitamin C in honey can increase the body's defense system by stimulating interferon (Rosidah, Buwono, et al., 2019). This same opinion was expressed by (Van Gorkom et al., 2018), which states that vitamin C increases interferon and the activity of immune cells, lymphocytes and macrophages. Furthermore, according to (Carr & Maggini, 2017), Vitamin C has a beneficial effect on the function of the innate cellular and adaptive immune system, stimulating the migration of neutrophils to the site of infection to increase phagocytosis. Vitamin C intake is reported to make the body more resistant to infection by enabling the production of interferon and leukocytes, in addition to maintaining the inflammatory process (Van Gorkom et al., 2018).

CONCLUSION AND SUGGESTION

To make it more efficient, the use of Kefa forest honey as an antibacterial against *A. hydrophila*, it can be diluted to a concentration of 50% which is not different from the 75% concentration. At 50% honey dilution, it causes a decrease in the antibacterial activity of honey but the pH content of diluted honey can still inhibit bacterial growth, because the pH of honey is still low (3.9). In addition, there are four compounds with the best potential inhibition against aerolysin, which is a virulence marker factor of *A. hydrophila*, namely D-(+)-Maltose, D-Glucosamine, Muramic acid and 3,4-Dihydroxybenzaldehyde. Besides having antibacterial activity, honey also has antioxidant activity as shown by the LC 50 result of 30.98, which is due to the vitamin C content of honey which is 3.28 mg/100g.

REFERENCES

A. Puertollano, M., Puertollano, E., Alvarez de Cienfuegos, G., & A. de Pablo, M. (2011). Dietary Antioxidants: Immunity and Host Defense. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(14), 1752–1766. <https://doi.org/10.2174/156802611796235107>

Albaridi, N. A. (2019). Antibacterial Potency of Honey. *International Journal of Microbiology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2464507>

Carr, A. C., & Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients*, 9(11), 1–25. <https://doi.org/10.3390/nu9111211>

Combarros-fuertes, P., Fresno, J. M., Estevinho, M. M., Sousa-Pimenta, M., Eugenia Tornadijo, M., & M. Estevinho, L. (2020). Honey: Another Alternative in the Fight against. *Antibiotics*, 9, 1–21.

Dewi, M. A., Kartasasmita, R. E., & Wibowo, M. S. (2017). UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI BEBERAPA MADU ASLI LEBAH ASAL INDONESIA TERHADAP *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 5(1), 27–30. <https://doi.org/10.26874/kjif.v5i1.86>

Dong, J., Zhang, L., Liu, Y., Xu, N., Zhou, S., Yang, Y., Yang, Q., & Ai, X. (2021). Luteolin decreases the pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* via inhibiting the activity of aerolysin. *Virulence*, 12(1), 165–176. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1867455>

Fadhmi, Mudatsir, & Syaukani, E. (2015). 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>

Hegazi, A. G., Al Guthami, F. M., Al Gethami, A. F. M., Abd Allah, F. M., Saleh, A. A., & Fouad, E. A. (2017). Potential antibacterial activity of some Saudi Arabia honey. *Veterinary World*, 10(2), 233–237. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.233-237>

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.

Johnston, M., McBride, M., Dahiya, D., Owusu-Apenten, R., & Singh Nigam, P. (2018). Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS Microbiology*, 4(4), 655–664.

- <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.655>
- Kalidasan, G., Saranraj, P., Ragul, V., & Sivasakthi, S. (2017). Antibacterial Activity of Natural and Commercial Honey-A Comparative Study. *Advances in Biological Research*, 11(6), 365–372. <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2017.365.372>
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C., & Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100(2), 526–534. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.010>
- Laith, A. R., & Najiah, M. (2014). *Aeromonas hydrophila*: Antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5(2). <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000215>
- Lee, J. H., Park, J. H., Kim, J. A., Neupane, G. P., Cho, M. H., Lee, C. S., & Lee, J. (2011). Low concentrations of honey reduce biofilm formation, quorum sensing, and virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *Biofouling*, 27(10), 1095–1104. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.633704>
- Libonatti, C., Varela, S., & Basualdo, M. (2014). Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 6(3), 51–56. <https://doi.org/10.5897/jma2014.0308>
- Lukistyowati, I., & Kurniasih. (2012). Kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio* L) yang diberi pakan ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) dan di infeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan Dan Kelautan*, 16(1), 144–160.
- Muslim, T. (2014). Potensi Madu Hutan dan Pengelolaannya Di Indonesia. *Prosiding Seminar Balitek KSDA, Balikpapan, December 2014*, 67–82. https://www.researchgate.net/publication/303520794_Potensi_Madu_Hutan_Dan_Pengelolaannya_Di_Indonesia
- Nadhilla, N. F. (2014). THE ACTIVITY OF ANTIBACTERIAL AGENT OF HONEY AGAINST *Staphylococcus aureus*. *J Majority*, 3(7), 94–101.
- Nolan, V. C., Harrison, J., & Cox, J. A. G. (2019). Dissecting the antimicrobial composition of honey. *Antibiotics*, 8(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040251>
- Orsi, R. O., dos Santos, V. G., Pezzato, L. E., de Carvalho, P. L. P. F., Teixeira, C. P., Freitas, J. M. A., Padovani, C. R., Sartori, M. M. P., & Barros, M. M.

- (2017). Activity of Brazilian propolis against *Aeromonas hydrophila* and its effect on Nile tilapia growth, hematological and non-specific immune response under bacterial infection. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 89(3), 1785–1799. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160630>
- Proaño, A., Coello, D., Villacrés-Granda, I., Ballesteros, I., Debut, A., Vizuite, K., Brenciani, A., & Álvarez-Suarez, J. M. (2021). The osmotic action of sugar combined with hydrogen peroxide and bee-derived antibacterial peptide Defensin-1 is crucial for the antibiofilm activity of eucalyptus honey. *Lwt*, 136, 110379. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110379>
- Rosidah, ., Buwono, I. D., Lili, W., Suryadi, I. B., & Triandika, A. R. (2019). The resistance of sangkuriang catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) against *Aeromonas hydrophila* bacteria given moringa leaf extracts (*Moringa oleifera* L.) through the feed. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 19(1). <https://doi.org/10.32491/jii.v19i1.435>
- Rosidah, R., Subhan, U., Mulyani, Y., & Dermawan, R. (2019). The effectiveness of honey supplementation in feed for improving goldfish fingerling *Carassius auratus* immune system against *Aeromonas hydrophila* bacteria attack. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 18(1), 89–100. <https://doi.org/10.19027/jai.18.1.89-100>
- Salosso, Y. (2019a). The potential of forest honey (*Apis* spp.) from timor island as antibacterial against pathogenic bacteria in fish culture. *Indonesian Aquaculture Journal*, 14(2), 63–68. <https://doi.org/10.15578/iaj.14.2.2019.63-68>
- Salosso, Y. (2019b). Uji Antibakteri Madu Semut Asal Pulau Semau Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio alginolitycus*. *Journal of Fishery Science and Innovation*, 3(2), 68–72. <http://dx.doi.org/10.33772/jspi.v1n1>
- Salosso, Y., Sunadji, Rebhung, F., & Anggrainy, K. (2020). Application of kefa forest honey as antibacterial in the treatment of common carp *Cyprinus carpio* infected with bacteria *aeromonas hydrophila*. *AACL Bioflux*, 13(2), 984–992.
- Susandi, F., & Rosmawati, M. (2017). *Imunitas gurami okk*. 3(2), 1–12.
- Triyaningsih, Sarjito, & Prayitno, S. B. (2014). PATOGENISITAS *Aeromonas hydrophila* YANG DIISOLASI DARI LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*) YANG BERASAL DARI BOYOLALI PATHOGENICITY *Aeromonas*

hydrophila ISOLATED FROM CATFISH (*Clarias gariepinus*) FROM BOYOLALI. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(2), 11–17. <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jfpik>

Van Gorkom, G. N. Y., Klein Wolterink, R. G. J., Van Elssen, C. H. M. J., Wieten, L., Germeraad, W. T. V., & Bos, G. M. J. (2018). Influence of Vitamin C on lymphocytes: An overview. *Antioxidants*, 7(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX7030041>

Zamora, M. C., & Chirife, J. (2006). Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina. *Food Control*, 17(1), 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.09.003>

Peer Review

ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANT AND NUTRITION
CONTENT OF KEFA FOREST HONEY
AGAINST *Aeromonas hydrophila*



Kefa Forest
Honey

Antibacterial activity of honey

Concentration	Inhibition Zone Diameter (mm)
25%	7.33 ^a ± 0.577
50%	11.33 ^a ± 0.577
75 %	13 ^a ± 1.732
Distilled Water	0
Antibiotic	16

Aeromonas hydrophila

ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANT
AND NUTRITION CONTENT

Parameter	Total Content
Total sugar (%)	36.83
Water (%)	52.95
Aw	0.903
pH	3.92

Compound	Antibacterial
D-(+)-Maltose	0.6
D-Glucosamine	0.596
Malamic acid	0.554
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	0.546
Crotonic acid	0.411
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde	0.407
Kynurenic acid	0.392
Proline	0.364
D-(+)-Pyroglutamic Acid	0.333
L-Norleucine	0.327
Isobutyraldehyde	0.314
Kojic acid	0.313
Uracil	0.283
Pipecolic acid	0.276
2-Hydroxyphenylalanine	0.25
Diethyl phthalate	0.221
L-Phenylalanine	0.2
Choline	0.175
4-Indolecarbaldehyde	-
N-(4-hydroxyphenyl) metabolite	-
Adenine	-

Parameter	Total Content
Vitamin C (mg/100g)	3.28
Antioxidant IC50 (mg/ml)	30.98
Protein	6.29
Fat	6.07
Water	20.68
Ash	6.57
Carbohydrates	78.39

211x132mm (96 x 96 DPI)