

---

## Identifikasi *Bacillus sp.* Yang Diisolasi Dari Madu Liar

*Identification Bacillus sp. Which is Isolated From Wild Honey*

Novarina Sulsia Ista'in Ningtyas<sup>1\*</sup>, Memo Andrianto<sup>2</sup>, Alfiana Laili Dwi Agustin<sup>3</sup>,  
Mutmainnah<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Makassar, <sup>2</sup>Animal Health Sumbawa, <sup>3</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Pendidikan Mandalika.

\*Corresponding author: [novarina.sulsia.ista'in@unm.ac.id](mailto:novarina.sulsia.ista'in@unm.ac.id)

### Abstrak

Madu merupakan cairan manis yang dikeluarkan oleh lebah dan diperoleh dari bagian tumbuhan yang disimpan di saram lebah. Manfaat madu sebagai antioksidan, antimikroba, regulator gula darah dan membantu meningkatkan imun tubuh. Madu yang beredar dan banyak dimanfaatkan oleh manusia bersal dari madu liar dan madu budidaya. Madu liar didapatkan dari alam liar dengan kata lain tidak dibudidayakan. Sebagian besar madu liar didapatkan dan dikemas secara tradisional. Hal ini dapat memicu adanya kontaminasi salah satunya bakteri. *Bacillus sp.* merupakan bakteri yang bertahan terhadap panas dan bisa membentuk spora. Efek yang ditimbulkan dari bahan pangan yang terkontaminasi *Bacillus sp.* ini bisa menyebabkan diare, muntah dan gangguan tubuh lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *Bacillus sp.* yang terdapat pada 10 sampel madu liar dengan metode biokimia. Bakteri yang telah ditumbuhkan pada media agar kemudian akan diuji Katalase, uji Glukosa, uji Manitol, Laktosa, Sukrosa, Maltosa, SIM, Urea, SC, TSIA, dan Arabinosa. Hasil pada penelitian ini mendapatkan 3 jenis *Bacillus* yaitu 8 sampel *Bacillus cereus* (80%), 1 sampel *Bacillus licheniformis* (10%), 1 sampel *Bacillus coagulans* (10%).

**Kata kunci:** *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, Madu Liar.

### Abstract

Honey is a sweet liquid obtained from plant parts stored in beehives. The benefits of honey as an antioxidant, antimicrobial, and blood sugar regulator help increase the body's immunity. Honey that is circulating and widely used by humans comes from wild honey and cultivated honey. Wild honey is obtained from the wild; in other words, it is not cultivated. Most wild honey is traditionally obtained and packaged. This can trigger contamination, one of which is bacteria. *Bacillus sp.* is a bacteria that survives heat and can form spores. The effects of food contaminated with *Bacillus sp.* This can cause diarrhea, vomiting and other body disorders. This study aims to identify *Bacillus sp.*, which was found in 10 samples of wild honey by the biochemical method. Bacteria that have been grown on agar media will then be tested for catalase, glucose, manitol, lactose, sucrose, maltosa, SIM, urea, SC, TSIA, and Arabinosa. The results of this study obtained 3 types of bacteria, namely 8 samples of *Bacillus cereus*, 1 sample of *Bacillus licheniformis*, and 1 sample of *Bacillus coagulans*.

**Key Word:** *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, Wild Honey, public health.

## Pendahuluan

Madu merupakan cairan manis yang dihasilkan oleh lebah dari bagian tumbuhan (dapat diperoleh dari bunga atau selain bunga) yang diambil dan disimpan di dalam sarang oleh lebah (Silvia *et al.*, 2017). Cairan yang dihisap oleh lebah akan bercampur dengan saliva lebah yang mengandung enzim *hydrolase*. Proses pencampuran ini berguna untuk memecah gula kompleks menjadi gula invert seperti glukosa dan fruktosa, cairan yang telah dihisap akan disimpan pada kantong yang disebut *honey sack*. Madu yang disimpan di dalam sarang akan mengalami ekstraksi air, pembentukan monosakarida dan pencampuran aromatik (Adji, 2007). Sejak lama madu telah digunakan oleh masyarakat karena berbagai manfaat yang terkandung didalamnya (Kavita, 2011). Madu mengandung antioksidan, antimikroba, regulator gula darah, meningkatkan imunitas, selain itu madu umumnya digunakan sebagai bahan peningkat cita rasa (*flavoring agent*) (Purwadi, 2017). Kandungan madu sebagian besar 80-85% karbohidrat, 0,3% protein, 15-17% air, asam amino, enzim dan vitamin (Cantarelli *et al.*, 2008). Enzim-enzim yang terkandung didalam madu diantaranya katalase, glukosa oksidase dan peroksidase. Senyawa non enzim yang terakndung seperti karotenoid, asam organik, lebih dari 150 senyawa polifenol termasuk flavonoids, flavonols, asam fenolik, katekon dan turunan asam sinamat yang bersifat antioksidan (Ferreira *et al.*, 2009).

Madu bisa dapat diperoleh dari lebah yang membentuk sarang secara alami di alam liar atau yang dibudidayakan. Madu liar merupakan salah satu jenis madu yang didapatkan dari sarang lebah yang ada di alam liar dengan kata lain tidak dibudidayakan. Cara pengolahan dan pengemasan yang masih tradisional dapat menjadi sumber berkembangnya mikroorganisme salah satunya adalah bakteri (Dewi dkk., 2017). Salah satu bakteri yang diisolasi dari madu liar adalah bakteri gram positif, pada penelitian

Andrianto dkk (2020) dari 10 sampel madu liar yang diuji, semua sampel teridentifikasi bakteri gram positif dengan ciri batang berderet kecil dan berwarna ungu pada pewarnaan gram.

Cemaran biologis, kimia atau benda lainnya merupakan kontaminasi yang perlu diperhatikan dalam keamanan pangan karena dapat menyebabkan kerugian dan membahayakan kesehatan manusia. Pencemaran mikroorganisme dapat terjadi pada proses penyimpanan dan pengolahan bahan pangan sehingga untuk meminimalisir hal tersebut terjadi maka proses pengolahan dan penyimpanannya harus diperhatikan (Muaris, 2009). Salah satu pencemaran atau kontaminasi biologis bisa diakibatkan oleh bakteri salah satunya adalah *Bacillus sp* (Fatmasari, 2015). *Bacillus sp.* merupakan jenis bakteri dalam genus *Bacillus*, gram positif yang mempunyai ciri berbentuk batang besar. *Bacillus sp.* merupakan bakteri yang bertahan terhadap panas dan bisa membentuk spora. Efek yang ditimbulkan dari bahan pangan yang terkontaminasi *Bacillus sp.* ini bisa menyebabkan diare, muntah dan gangguan tubuh lainnya. Bahaya yang ditimbulkan dari adanya bakteri *Bacillus sp.* pada madu liar membuat kami ingin mengidentifikasi jenis bakteri apa yang ditemukan dalam madu yang diperoleh dari sarang madu liar sehingga data yang diperoleh dapat digunakan sebagai acuan untuk *public health*.

## Materi dan Metode

Penelitian ini adalah jenis penelitian deskriptif yang bertujuan untuk mengidentifikasi jenis *Bacillus* yang diisolasi dari madu liar menggunakan metode survei dengan rancangan *cross sectional study*. Sampel madu didapatkan dari 10 desa penghasil madu hutan yang telah diperas dan ditempatkan di wadah berupa botol air mineral. Madu diambil dari 10 desa yaitu Marente, Alas luar, MAPIN Rea, Prenang, Lopok, Lape, Hijrah, Ai Mual, Lempe dan Brang Biji. Penelitian dilaksanakan dengan mengisolasi bakteri gram positif kemudian dilanjutkan dengan metode biokimia yang dilakukan di

Balai Laboratorium Kesehatan Pengujian dan Kalibrasi (BLKPK) Provinsi Nusa Tenggara Barat. Media yang digunakan BHI (*Brain Heart Infusion*) yang diinkubasi dengan suhu 37° selama 24 jam. Bakteri yang menunjukkan hasil positif mengalami perubahan media menjadi keruh. Kemudian dilanjutkan penanaman pada media BAP (*Blood Agar Plate*) menggunakan teknik gores pada media agar dan diinkubasi pada suhu 37° selama 24 jam. Media BAP dapat membedakan bakteri hemolitik dan bakteri non hemolitik yang ditandai dengan terbentuknya zona (*halo*) disekitar koloni.

Kemudian bakteri yang telah diisolasi akan diidentifikasi dan dilanjutkan dengan metode biokimia. Uji biokimianya meliputi Katalase, uji Glukosa, uji Manitol, Laktosa, Sukrosa, Maltosa, SIM, Urea, SC, TSIA, dan Arabinosa. Kemudian dicocokkan dengan kunci identifikasi berdasarkan buku *Bergey's*

*Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al.1994). Biakan bakteri diambil menggunakan ose dan kemudian ditusukkan pada media gula-gula (glukosa, laktosa, manitol, maltose dan sukrosa) yang apabila hasilnya positif akan mengubah warna media menjadi kuning. Bakteri menggunakan ose juga ditusukkan kemedial *Sulfit Indol Motility* (SIM), metode ini mendeteksi produksi indol oleh organisme dan motilitas atau kemampuan bergerak bakteri (Hemraj dkk., 2013).

### Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian ini didapatkan isolat yang pada pengamatan di mikroskop berbentuk batang berderet kecil dan pada pewarnaan gram berwarna ungu. Selanjutnya isolat ini akan dilanjutkan dengan uji biokimia dan didapatkan hasil seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Biokimia pada Sampel Madu Liar

Sampel	K	G	M	L	S	Malt	SIM	Urea	SC	TSIA	Motility	Ar	Bakteri
1	+	+ Gas	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus cereus</i>
2	+	+ Gas	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus cereus</i>
3	+	+ Gas	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus cereus</i>
4	+	+ Gas	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus licheniformis</i>
5	+	+ Gas	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus cereus</i>
6	+	+ Gas	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus cereus</i>
7	+	+ Gas	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus cereus</i>
8	+	+ Gas	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus cereus</i>
9	+	+ Gas	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus cereus</i>
10	+	+ Gas	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Bacillus coagulans</i>

Keterangan : K= Katalase, G=Glukosa, M=Manitol, L=Laktosa, S=Sukrosa, Malt=Maltosa, SC=Simon Citrat, Ar=Arabinose

Berdasarkan Tabel 1. Dari 10 sampel madu liar yang diuji didapatkan hasil positif pada uji katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung. Uji katalase merupakan uji biokimia untuk membedakan antar mikroorganisme yang mempunyai enzim katalase untuk mendegradasi hydrogen peroksida, hasil positif pada uji katalase ditandai dengan gelembung yg terbentuk akibat reaksi dari enzim katalase dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Koneman, 2006). Uji urease dikatakan

positif apabila terjadi perubahan warna pada media menjadi berwarna merah muda. Pada pengujian Sitrat pengamatan dilakukan pada media dengan mengindikasi perubahan warna dari hijau menjadi biru yang menunjukkan bahwa bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon (Schlegel and Karin, 1994).

Hasil pada pengujian gula-gula yakni glukosa mendapati 10 sampel hasil positif ditandai dengan berubahnya warna

media menjadi kuning dan terdapat gas pada ujung tabung. Pengujian manitol didapatkan 9 sampel dengan hasil negatif (sampel 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 dan 9) yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media kecuali pada sampel no 4 menunjukkan hasil positif dengan adanya perubahan warna media. Media pengujian laktosa menunjukkan 10 sampel dengan hasil negatif tanpa perubahan warna media. Pada pengujian SIM, Urea, SC dan TSIA

keseluruhan sampel menunjukkan hasil negatif tanpa perubahan warna. Uji SIM (*Sulfit Indol Motility*) juga digunakan untuk menilai fermentasi glukosa dan motilitas bakteri. Pengujian pada 10 sampel madu liar menunjukkan bahwa bakteri hanya tumbuh disekitar tusukan osse (hasil negatif, hal ini menandakan bahwa bakteri yang ditusukkan dengan osse tidak motil. *Bacillus sp.* memiliki sifat motil dan juga *immotile* (Puspita dkk., 2017).

Tabel 2. Diagnosa Jenis Bakteri pada Madu Liar

Diagnosa Bakteri	Jumlah	Presentase
<i>Bacillus cereus</i>	8 sampel	80%
<i>Bacillus licheniformis</i>	1 sampel	10%
<i>Bacillus coagulans</i>	1 sampel	10%

Pada Tabel 1 didapatkan bahwa sampel no 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, dan 9 menunjukkan hasil uji biokimia yang sama, dan setelah dicocokkan dengan kunci identifikasi didapatkan bahwa bakteri yang ada pada sampel tersebut didiagnosa adalah *Bacillus cereus*. Sampel no 4 mengalami perbedaan pada uji motility dan arabinose yang menunjukkan hasil positif, hal biokimia saat dicocokkan dengan kunci identifikasi *Bergey* menunjukan bahwa bakteri mengarah pada *Bacillus licheniformis*. Sampel no 10 menunjukkan hasil negatif pada uji sukrosa dan maltose yang menurut Tabel 1 menandakan bahwa bakteri yang terdapat pada sampel madu liar tersebut adalah *Bacillus coagulans*. Total bakteri yang ditemukan pada 10 sampel madu liar yaitu 8 sampel positif *Bacillus cereus* (80%), 1 sampel positif *Bacillus licheniformis* (10%) dan 1 sampel positif *Bacillus coagulans* (10%) seperti ditunjukkan pada Tabel 2.

*Bacillus sp.* termasuk bakteri gram positif yang membentuk spora dan berpotensi menjadi agen patogen. Adanya bakteri pembentuk spora ini dapat mengganggu keamanan pangan dan kualitas produk yaitu produksi racun, produksi enzim pembusuk dan gangguan pembuatan keju (Poltronieri, 2017). *Bacillus cereus* (*B. cereus*) merupakan bakteri dari genus *Bacillus*, jenis bakteri gram positif

berukuran besar dibandingkan dengan bakteri batang lainnya serta tumbuh secara fakultatif aerob yang jika ditemukan dalam jumlah yang besar pada makanan dapat menyebabkan keracunan pada manusia (Nurwidiani, 2010).

*B. cereus* merupakan bakteri yang mampu menghasilkan enzim proteolitik yang menyerupai sifat rennin sehingga mempunyai kemampuan menggumpalkan salah satunya penggumpalan susu (Hermansyah, 2020). *B. cereus* merupakan spesies dari *Bacillus sp.* yang dikategorikan sebagai bakteri pembusuk penting di lingkungan dan menjadi masalah keamanan terkait keracunan makanan (Poltronieri, 2017). *B. cereus* akan berkembang secara baik apabila substratnya mengandung karbohidrat. Namun bakteri ini menjadi lambat dan tidak dapat membentuk toksin apabila substratnya minim karbohidrat (Hermansyah, 2020).

Gejala klinis yang ditimbulkan akibat makanan yang terkontaminasi *B. cereus* ini dalam jumlah besar yakni diare, perut kejang, muntah dan sakit 6-15 jam setelah mengkonsumsi bahan pangan yang terkontaminasi karena bakteri ini menghasilkan toksin yang cenderung stabil terhadap panas (SNI, 2009). Gejala diare yang ditimbulkan jika bahan pangan terkontaminasi bakteri ini mirip dengan gejala yang ditimbulkan oleh *Clostridium*

*perfringens*, sedangkan gejala muntah/mual bisa terjadi 0,5-6 jam setelah mengkonsumsi pangan yang tercemar. Jumlah *B. cereus* dalam pangan >10<sup>6</sup> koloni/g dapat beresiko mengganggu kesehatan. Belum adanya komplikasi yang spesifik dari toksin bakteri ini tetapi beberapa pengamatan terkait manifestasi klinis dari invasi/kontaminasi diantaranya *bovine mastitis*, *gangrene*, *septic meningitis*, *selulit*, *panofalmitis*, *abses paru* dan *endocarditis* (BPOM RI, 2012).

*Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) biasanya ditemukan di lingkungan contohnya ditanah (Ghani *et al.*, 2013). *B. licheniformis* merupakan salah satu spesies yang menghasilkan enzim  $\alpha$ -amilase. Enzim  $\alpha$ -amilase adalah enzim yang memecah molekul pati dan glikogen. Enzim ini memotong ikatan glikosidik  $\alpha$ -1,4 pada pati sehingga menjadi molekul yang lebih pendek (Soeka, 2015). Spora *B. licheniformis* bertahan pada suhu yang tinggi (Lucking *et al.*, 2013). Bakteri ini dapat menyebabkan keracunan dan pembusukan pada makanan jika berlebihan jumlahnya pada pangan. Beberapa efek yang ditimbulkan dari strain ini adalah kram perut, muntah, diare, mual, sakit pada bagian perut dan rasa terbakar pada mulut (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999).

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian isolasi bakteri gram positif yang didapatkan dari madu liar kemudian dilanjutkan dengan uji biokimia dan berdasarkan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* didapatkan hasil 8 sampel *Bacillus cereus*, 1 sampel *Bacillus licheniformis*, 1 sampel *Bacillus coagulans*.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami tujukan kepada Balai Laboratorium Kesehatan Pengujian dan Kalibrasi (BLKPK) Provinsi Nusa Tenggara Barat yang mengizinkan melakukan pengujian bakteri pada madu

liar dan pihak yang membantu dalam mengumpulkan sampel madu liar.

### Daftar Pustaka

- Adji, D. (2007). Perbandingan Efektivitas Sterilisasi Alkohol 70%, Inframerah, Otoklaf dan Ozon Terhadap Pertumbuhan Bakteri (*Bacillus subtilis*). Jurnal Sa besar panjangin Vet, 25(1).
- Andrianto, M., Novarina S. I. N., Alfiana L.D.A. (2022). Isolasi Bakteri Gram Positif pada Madu Liar Sumbawa. Mandalika Veterinary Journal. Vol 2. No. 2 Oktober 2022.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI). (2012). Pedoman Kriteria Cemaran Pangan Siap Saji dan Pangan Industri Rumah Tangga. Direktorat Standarisasi Produk pangan. Deputi Bidang Pengawasan Keamanan Pangan dan Bahan Berbahaya Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Dewi, M., Kartasasmita., R.E., dan Wibowo M.S. (2017). Uji efektivitas antibakteri beberapa madu asli lebah asal Indonesia terhadap *staphylococcus aureus* dan *escheria coli*. Jurnal Ilmiah Farmasi. 5 (1), 27-30.
- Ghani, M., Ansari, A., Aman, A., Zohra, R. R., Siddiqui, N. N., & Qader, S. A. U. (2013). *Isolation And Characterization Of Different Strains Of Bacillus Licheniformis For The Production Of Commercially Significant Enzymes*. Pakistan Journal Of Pharmaceutical Sciences.
- Hemraj, V., Diksha and Avneet. (2013). A review on commonly used Biochemical Test for Bacteria. Innovare. Journal of Life Science. 1(10). Hal 1-7.
- Hermansyah, D. N. (2020). Perbedaan Penurunan Kadar Bilirubin

- Sebelum dan Sesudah Fototerapi Pada Bayi Baru Lahir Dengan Pemberian Susu Formula.[Skripsi]. Surabaya: Poltekkes Kemenkes Surabaya.
- Kavita, M. B. (2011). Honey - An Ancient Functional Food. *Light on Ayurveda Journal*, IX, 16–20.
- Koneman, E.W. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., & Ehling-Schulz, M. (2013). *Characterization Of Aerobic Spore-Forming Bacteria Associated With Industrial Dairy Processing Environments And Product Spoilage*. *International Microbiology. Jur Al Of Food Microbiology*.
- Muaris, H. (2009). *Hidangan Sehat Untuk Ibu Menyusui*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Purwadi, L. E. Radiati, H. Evanuarini, R. D. Andriana. 2017. *Penanganan Hasil Ternak*. UB Press, Malang.
- Poltronieri, P. (2017). *Microbiology In Dairy Processing*. Hoboken: IFT Press..
- Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M. A., Kämpfer, P., Andersson, M. C., Honkanen Buzalski, T., & Scoging, A. C. (1999). *Toxigenic Strains Licheniformis Poisoning. Related Of Applied Bacillus To Food And Environmental Microbiology*.
- Schlegel, HG, & Karin. (1994). *Mikrobiologi Umum*, Edisi ke-6, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Silva, M. S., Rabadzhiev, Y., Eller, M. R., Iliiev, I., Ivanova, I., & Santana, W. C. (2017). *Microorganisms in Honey*. In V. de Alencar Arnaut de Toledo (Ed.), *Honey Analysis*. IntechOpen.
- Soeka, Y.S. Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam menghasilkan enzim  $\alpha$ amilase. *Jurnal Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. 2015; 1(5): 1162-1166.