

BIOAKTIVITAS EKSTRAK METANOL DAUN NAMNAM SERTA KOMBINASINYA DENGAN MADU TRIGONA

[*Bioactivity of Methanol Extract of Namnam Leaves in Combination with Trigona Honey*]

La Ode Sumarlin^{1,2)*}, Agik Suprayogi¹⁾, Min Rahminiwati¹⁾, Achmad Tjachja³⁾,
dan Dede Sukandar²⁾

¹⁾ Program Doktor Ilmu-Ilmu Faal dan Khasiat Obat, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor

²⁾ Program Studi Kimia, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta, Tangerang

³⁾ Program Studi Agribisnis, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta, Tangerang

Diterima 28 Mei 2015 / Disetujui 15 September 2015

ABSTRACT

*Namnam (Cynometra cauliflora L) and trigona honey are two potential natural ingredients to be developed in Indonesia. However, scientific evidence of their active compounds and bioactivity is still rarely found, particularly the combination of these two materials. Therefore, this research aimed to explore the active ingredients of the combination of the two materials, i.e. total phenolic, flavonoids, vitamin C and β -carotene and its bioactive capabilities such as antioxidant activity and antibacterial activity. The analysis showed the methanol extract of Namnam leaves (EMDN) and trigona honey either in their sole form or combined form has antioxidant and antibacterial activity. The EMDN was more active to *Staphylococcus aureus* (23.7 \pm 3.3 mm) than to *Escherichia coli*, while the Trigona honey (MT) more active to *Escherichia coli* (32.6 \pm 4.4 mm) than *Staphylococcus aureus* (16.6 \pm 4.1 mm). Similarly, the combination of EMDN and MT showed higher activity to *Escherichia coli* (23 \pm 1.9 mm) than *Staphylococcus aureus* (17.6 \pm 2.6 mm). Analysis of the antioxidant activity also showed that EMDN provided the highest activity with an IC_{50} of 0.0048 \pm 0.000 mg/mL, while a combined EMDN and MT had an IC_{50} of 0.0085 \pm 0.000 mg/mL and MT with an IC_{50} of 3.736 \pm 0.112 mg/mL. Moreover, this analysis also showed that sole samples of MT and EMDN have total phenolic content, flavonoids, and vitamin C that were higher than the combination of MT and EMDN. However, the content of β -carotene in the combined form of MT and EMDN was higher. Thus trigona honey, methanol extract of leaves Namnam (*Cynometra cauliflora L*) in a single form or in a combination are potential to be utilized and developed as a source of antioxidants and antibacterial in the form of functional food.*

Keywords: antibacterial, antioxidant, *Cynometra cauliflora L*, honey trigona, namnam

ABSTRAK

Tanaman namnam (*Cynometra cauliflora L*) dan madu trigona merupakan dua bahan alam yang sangat potensial untuk dikembangkan di Indonesia. Namun informasi ilmiah mengenai bahan aktif dan bioaktivitasnya masih belum banyak diteliti khususnya kombinasi dari kedua bahan tersebut. Oleh karena itu, penelitian ini ditujukan untuk mengeksplorasi bahan aktif kombinasi kedua bahan tersebut seperti total fenolik, flavonoid, vitamin C dan β -karoten serta kemampuan aktivitas antioksidan dan antibakteri. Hasil analisis menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun namnam (*Cynometra cauliflora L*) dan madu trigona dalam bentuk tunggal maupun bentuk kombinasinya memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri. Aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun namnam (EMDN) lebih tinggi terhadap *Staphylococcus aureus* (23,7 \pm 3,3 mm) dibandingkan *Escherichia coli*, sedangkan aktivitas antibakteri madu trigona (MT) lebih tinggi terhadap *Escherichia coli* (32,6 \pm 4,4 mm) dibandingkan bakteri *Staphylococcus aureus* (16,6 \pm 4,1 mm). Demikian pula, kombinasi EMDN dan MT lebih kuat terhadap *Escherichia coli* (23 \pm 1,9 mm) daripada *Staphylococcus aureus* (17,6 \pm 2,6 mm). Analisis terhadap aktivitas antioksidan juga menunjukkan bahwa EMDN memberikan aktivitas tertinggi (IC_{50} 0,0048 \pm 0,000 mg/mL), kombinasi EMDN dan MT (IC_{50} 0,0085 \pm 0,000 mg/mL) dan MT (IC_{50} 3,736 \pm 0,112 mg/mL). Selain itu, analisis ini menunjukkan pula sampel MT dan EMDN tunggal memiliki kandungan total fenolik, flavonoid, vitamin C lebih tinggi dibandingkan kombinasi MT dan EMDN. Namun pada kandungan β -karoten kombinasi MT dan EMDN lebih tinggi. Dengan demikian, madu trigona, ekstrak metanol daun namnam (*Cynometra cauliflora L*) dalam bentuk tunggal maupun kombinasinya sangat potensial dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai sumber antioksidan dan antibakteri dalam suatu bentuk pangan fungsional.

Kata kunci: antibakteri, antioksidan, *Cynometra cauliflora L*, madu trigona, tanaman namnam

*Penulis Korespondensi:
E-mail: sumarlin@uinjkt.ac.id

PENDAHULUAN

Tanaman namnam (*Cynometra cauliflora* L) dan madu trigona merupakan dua bahan alam yang sangat potensial untuk dikembangkan di Indonesia. Namun informasi ilmiah tentang aktivitas bioaktifnya masih belum banyak diteliti, khususnya kombinasi dari kedua bahan tersebut. Komponen bioaktif yang dimaksud adalah komponen secara alamiah terdapat dalam bahan pangan dan dapat memberikan manfaat bagi kesehatan (Biesalski *et al.*, 2009).

Hasil penelitian Owayss *et al.* (2004) dan Ferreira *et al.* (2009) menunjukkan bahwa pada madu terdapat klorofil, β -karoten, likopen, karotenoid, dan flavonoid. Bahkan, Ferreira *et al.* (2009) menyatakan bahwa kandungan β -karoten dan likopen madu masing-masing sebesar 9,49 mg/kg dan 6,12 mg/kg. Selain itu, Zainol *et al.*, 2013 juga menyatakan bahwa madu kelulut memiliki potensi sebagai antibakteri. Madu dari lebah *stinglessbee* bahkan memiliki rasa, aroma dan kekentalan berbeda yang berguna untuk medis dan terapi (Biluca *et al.*, 2014). Madu *Trigona* spp memiliki total fenolik sekitar 784,3 mg GAE/kg dibandingkan dengan madu *Apis* spp. sekitar 590,5 mg GAE/kg (Kek *et al.*, 2014). Keberadaan senyawa-senyawa tersebut menunjukkan bahwa madu lokal juga memiliki potensi sebagai anti kanker dan antioksidan (Sumarlin *et al.*, 2014).

Seperti halnya madu, daun tanaman namnam (*Cynometra cauliflora* L) yang merupakan pohon berbuah dari suku polong-polongan, *Leguminosae* atau *Fabaceae* juga telah diteliti oleh Aziz dan Iqbal (2013), terkandung adanya tanin, saponin, flavonoid, terpenoid, dan glikosida yang bermanfaat sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan dalam tanaman *Cynometra cauliflora* L. ditemukan dalam urutan sebagai berikut: daun muda > daun tua > batang > kulit. Hasil penelitian Ado *et al.* (2014), juga menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun namnam memiliki kadar total fenolik sebesar 214,370 mg GAE/g dan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 0,048 mg/mL. Penelitian lain dari suku golongan *Fabaceae* sebagai antibakteri diantaranya ekstrak *Senna italica* yang memiliki daya hambat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Masoko *et al.*, 2009), ekstrak etil asetat daun jengkol (*Pithecolobium lobatum* Benth) memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Salni *et al.*, 2011).

Semua publikasi tanaman namnam dan madu trigona tersebut dalam bentuk tunggal. Beberapa publikasi kombinasi madu seperti kombinasi madu dan *Nigella sativa* (Maslem *et al.*, 2012), kombinasi madu dan *Garcinia Kola* (Akinnibosun dan Itedjere, 2013), kombinasi madu alam dan benih *Peganum harmala* (Ahmed *et al.*, 2013), serta kombinasi madu dan tepung kentang (Ahmed *et al.*, 2012) yang telah menghasilkan efek sinergis dan meningkat aktivitasnya. Oleh karena itu, dalam penelitian ini ditujukan untuk mengeksplorasi bahan aktif pada kombinasi bahan ekstrak metanol daun namnam dan madu trigona seperti total fenolik, flavonoid, vitamin C dan β -karoten serta kemampuannya sebagai bahan antioksidan dan antibakteri. Hal ini penting untuk mengetahui efek sinergi kedua bahan potensial tersebut secara ilmiah. Untuk mendapatkan hasil yang maksimal, digunakan metode maserasi cara dingin untuk mencegah terurainya metabolit yang tidak tahan pemanasan. Penggunaan pelarut metanol berfungsi melunakkan sel simplisia sehingga senyawa metabolit sekunder yang masih terikat, tertarik ke luar sel dan dilarutkan. Penelitian Suryanto dan Wehantouw (2009) menunjukkan bahwa metanol mampu menarik lebih banyak jumlah metabolit sekunder yaitu senyawa fenolik, flavonoid, dan tanin dalam daun *Artocarpus altilis* F. dibandingkan dengan etanol. Hasil penelitian Rabeta dan Farazina (2013) pada ekstraksi daun dan buah *Garcinia atrovirdis* serta buah *Cynometra cauliflora* dengan menggunakan pelarut metanol memberikan aktivitas antioksidan yang lebih kuat daripada ekstraksi dengan pelarut air. Pada akhirnya, diharapkan penelitian ini dapat digunakan sebagai basis data untuk formulasi antioksidan dan antibakteri kombinasi tanaman namnam dan madu trigona dalam berbagai aplikasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama adalah sampel madu trigona yang diperoleh dari peternak lebah di daerah Luwuk Sulawesi Tengah, daun namnam diperoleh dari daerah Pangandaran, Jawa Barat dan diidentifikasi di Herbarium Bogoriense Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Bogor, DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) (Sigma-Aldrich, USA), *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 serta bahan-bahan kimia pro analitik lainnya yang diperlukan untuk analisis.

Ekstraksi daun namnam

Daun namnam (*Cynometra cauliflora* L.) dicuci, disortasi lalu dikeringkan dengan sinar matahari selama 30 jam sampai kadar air 9-10%. Kemudian digiling dengan *blender* (Arte, Indonesia), sehingga diperoleh serbuk halus. Serbuk daun namnam sebanyak 100 gram direndam dengan 100 mL methanol (JT Baker, USA) dan dimaserasi selama 24 jam. Setelah itu hasil rendaman disaring dengan kertas saring Whatman No. 4 (Merk milipore, Germany), sehingga diperoleh filtrat yang pertama. Residu daun namnam dimaserasi kembali dengan pelarut methanol selama 9 jam, sehingga diperoleh filtrat yang kedua. Filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator* (Laborata 4000 Heidolph, USA) pada suhu 49°C sehingga diperoleh ekstrak kental. Proses ekstraksi dilakukan sebanyak lima kali. Pembuatan formulasi kombinasi madu dan ekstrak metanol daun namnam dilakukan dengan cara menimbang madu dan ekstrak metanol daun namnam dengan menggunakan perbandingan 1:1 (b/b).

Uji alkaloid (uji dragendroff dan bouchardat)

Sampel sebanyak 0,5 gram ditambah 10 mL kloroform-amoniak (Merk Milipore, Germany), kemudian disaring. Filtrat ditambahkan dengan 3-5 tetes H_2SO_4 2 M (Merk Milipore, Germany) dan dikocok sehingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam (terdapat pada bagian atas) dipipet dalam dua tabung reaksi lain, lalu ditambahkan beberapa tetes pereaksi Dragendroff (kombinasi $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ (Merk Milipore, Germany) dalam HNO_3 (Merk Milipore, Germany) dan larutan KI (Merk Milipore, Germany) pada tabung A dan pereaksi Bouchardat (4 gram KI (Merk Milipore, Germany) dilarutkan dalam 20 mL akuades, ditambah 2 gram I_2 (Merk Milipore, Germany) ditera hingga 100 mL) pada tabung B. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga sampai merah coklat (Harborne, 1996).

Uji steroid dan triterpenoid (uji salkowski) (Harborne, 1996 dengan modifikasi)

Sampel sebanyak 0,5 gram ditambah dengan 20 mL n-heksana (JT Baker, USA) dan didiamkan selama 2 jam. Kemudian disaring dan ditambahkan H_2SO_4 pekat sebanyak 2 tetes (Metode Harborn, 1996 menggunakan kloroform dan asetat anhidrida). Steroid memberikan warna biru atau hijau, sedangkan untuk triterpenoid memberikan warna merah atau ungu.

Uji flavonoid (Harborne, 1996 dengan modifikasi)

Sampel sebanyak 0,5 gram ditambah dengan 10 mL air panas (metode Harborne, 1996 menggunakan alkohol), dan dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring kertas Whatman No. 4. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan HCl pekat (Merk Milipore, Germany) dan 0,05 mg serbuk Mg (Merk Milipore, Germany), kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga.

Uji saponin (uji forth)

Sampel sebanyak 0,5 gram ditambah air panas sebanyak 5 mL dalam tabung reaksi dan dikocok. Sampel dinyatakan positif mengandung saponin apabila terdapat busa. Terbentuknya busa yang stabil dalam tabung reaksi menunjukkan adanya senyawa golongan saponin, bila ditambahkan 1 tetes asam klorida 1% (encer) busa tetap stabil (Djamil dan Anelia, 2009).

Uji tanin atau fenolik

Sampel sebanyak 0,5 gram ditambah 10 tetes $FeCl_3$ 1% (Merk Milipore, Germany). Sampel positif mengandung tannin atau fenol apabila menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam pekat (Djamil dan Anelia, 2009).

Uji kuinon

Sampel sebanyak 0,5 gram ditambah etanol 95% (Merk Milipore, Germany) sebanyak 2 mL, lalu ditambahkan NaOH 10% (Merk Milipore, Germany). Jika terjadi warna kuning, jingga, coklat, atau merah menunjukkan adanya fenolhidrokuinon (Harborne, 1996).

Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (Singh *et al.*, 2013 dimodifikasi)

Sebanyak 2 mL sampel masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan ke dalamnya 2 mL DPPH 0,002% (Sigma-Aldrich, USA) (Singh *et al.*, 2013) menggunakan 4 mL DPPH 0,004% yang dilarutkan dalam metanol). Kemudian sampel dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap. Serapan diukur pada panjang gelombang 517 nm dengan spektrofotometer UV-VIS (Perkin Elmer Lambda 25). Pengukuran dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Sebagai standar digunakan asam askorbat (Merk Milipore, Germany) pada konsentrasi 0,5; 1; 2; 4 dan 8 ppm dengan perlakuan yang sama dengan sampel uji. Nilai absorbansi yang didapat digunakan untuk menentukan nilai penghambatan sampel melalui perhitungan sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(A \text{ blanko} - A \text{ sampel})}{A \text{ blanko}} \times 100\%$$

Keterangan:

A blanko = Absorbansi tidak mengandung sampel

A sampel = Absorbansi sampel

Selanjutnya hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan regresi sehingga diperoleh nilai IC_{50} didapat dari perhitungan pada saat persen inhibisi sebesar 50%.

Uji total fenolik (Socha *et al.*, 2009)

Madu trigona, ekstrak metanol daun namnam, dan kombinasi madu-ekstrak metanol daun namnam (1:1) masing-masing sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 10 mL akuades. Kemudian dipipet sampel sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan 0,3 mL reagen Folin-Ciocalteu (Merk Milipore, Germany), 2 mL Na_2CO_3 15% (Merk Milipore, Germany) dan ditepatkan dengan akuades hingga volume larutan menjadi 5 mL. Selanjutnya sampel divortex dan diinkubasi selama 2 jam. Sampel diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS (Perkin Elmer Lambda 25) pada panjang gelombang 750 nm. Kurva standar asam galat (Sigma-Aldrich, USA) dibuat pada deret konsentrasi 10, 20, 40, 60, 80, 100 ppm. Kandungan total fenolik dinyatakan sebagai jumlah ekuivalen mg asam galat (GAE) per 1 gram sampel.

Uji total flavonoid (Meda *et al.*, 2005)

Madu trigona, ekstrak metanol daun namnam, dan kombinasi (1:1) masing-masing sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 10 mL metanol. Kemudian sampel disaring dan diambil sebanyak 5 mL dan ditambahkan 5 mL $AlCl_3$ 2% (b/v) (Merk Milipore, Germany). Kemudian sampel dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit. Sampel diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 454,63 nm. Kuersetin sebagai standar dengan deret konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 ppm. Kandungan flavonoid dianggap sebagai jumlah ekuivalen mg kuersetin (QE) (Sigma-Aldrich, USA) per 1 gram sampel.

Uji kadar vitamin C (Ferreira *et al.*, 2009)

Madu trigona, ekstrak metanol daun namnam, dan kombinasi (1:1) ditimbang sebanyak 100 mg dan diekstraksi dengan 10 mL H_3PO_4 1% (Merk Milipore, Germany). Setelah itu sampel diinkubasi 45 menit pada suhu ruang dan dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan kertas Whatman No. 4. Diambil 1 mL filtrat dan ditambahkan 9 mL DCPIP

0,005% (Merk Milipore, Germany). Sampel kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 519 nm. Sebagai standar digunakan asam askorbat standar dengan deret konsentrasi 10, 20, 40, 80, 100 mg/L dan menggunakan persamaan regresi. Kandungan vitamin C dinyatakan sebagai jumlah ekuivalen mg asam askorbat (AA) per 1 g sampel.

Uji total kandungan karotenoid (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010)

Uji kandungan total karotenoid dilakukan pada madu trigona dan ekstrak dari daun namnam. Sampel madu sebanyak 1 gram dilarutkan dengan pelarut n-heksana-metanol (1:1) (JT Baker, USA) dishaker (Heidolph Unimax 1010, USA) selama 1 jam dan didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No. 4. Filtrat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm. Sebagai standar digunakan β -karoten (Sigma-Aldrich, USA) dengan kurva standar pada konsentrasi (0,015–0,6 μ g/mL). Total kandungan karotenoid dinyatakan dalam mg setara dengan β -karoten (mg β CE/g). Diulang dengan menggunakan ekstrak madu dan daun namnam dan hasil partisi n-heksana, etil asetat dan butanol.

Pengujian antibakteri dengan metode zona bening (Lestari *et al.*, 2013)

Sebanyak 1 mL inokulum bakteri uji fase midlog diambil kemudian dimasukkan ke dalam 100 mL media MHA (Merk Milipore, Germany) dan dihomogenkan. Selanjutnya media yang berisi inokulum tersebut dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Sebanyak 0,1 mL baik sampel maupun kontrol yang telah dipersiapkan di dalam *syringe* dituangkan pada agar yang telah dilubangi dengan sedotan steril. Kemudian petri ditutup kembali segera, setelah itu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Diukur zona hambat dari masing-masing sampel kemudian dibandingkan dengan kontrol positif. Untuk setiap perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan (*triplo*).

Analisis data

Analisis data dilakukan sebanyak triplo dan data yang ditampilkan berupa mean \pm standar deviasi. Hasil uji fitokimia dianalisis secara deskriptif sedangkan aktivitas antioksidan, kadar total fenolik, total flavonoid, dan vitamin C dianalisis secara statistik menggunakan Analisis Variansi (ANOVA)

satu arah (*One Way*) dengan batas kepercayaan 95% (α 0,05) menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versi 20 (Latuconsina *et al.*, 2014).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji fitokimia

Rendemen ekstrak yang diperoleh dalam penelitian ini bervariasi sebesar 6,16% hingga 9,41% (Tabel 1). Nilai rendemen ini dapat digunakan untuk mengetahui nilai ekonomis suatu produk atau bahan. Rendemen ekstrak dalam penelitian ini bervariasi disebabkan oleh ketidakseragaman ukuran partikel pada satuan mesh tertentu setelah digiling dan pengayakan goyang. Hasil ini akan digunakan untuk uji-uji selanjutnya termasuk uji fitokimia.

Tabel 1. Rendemen ekstrak metanol daun namnam dalam beberapa pengulangan

Maserasi*	Berat Sampel Serbuk (g)	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)
I	100	7,55	7,55
II	100	6,19	6,19
III	100	6,16	6,16
IV	100	6,30	6,30
V	100	6,85	6,85
VI	100	9,41	9,41

Keterangan: *I, II, III, IV, V dan VI adalah pengulangan untuk mendapatkan sampel yang akan diuji selanjutnya

Analisis fitokimia dilakukan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam Madu Trigona (MT) dan Ekstrak Metanol Daun Namnam (EMDN) secara tunggal maupun kombinasi (EMDN : MT). Hasil pengujian memperlihatkan bahwa semua jenis sampel baik tunggal maupun kombinasi positif mengandung senyawa fenolik dan flavonoid (Tabel 2). Hasil uji

fitokimia terhadap ekstrak metanol daun namnam Positif mengandung fenolik, flavonoid, steroid/triterpenoid, saponin, dan kuinon (Tabel 2). Hasil ini sesuai dengan penelitian Aziz dan Iqbal (2013), penentuan kandungan awal senyawa fitokimia menunjukkan adanya tanin, saponin, flavonoid, terpenoid, dan glikosida yang bermanfaat sebagai antioksidan pada daun namnam (*Cynometra cauliflora*).

Pada awalnya MT tidak mengandung steroid/triterpenoid, saponin, dan kuinon, namun setelah kombinasi dengan EMDN menunjukkan hasil fitokimia yang positif (Tabel 2). Hal ini mengindikasikan bahwa kandungan golongan senyawa saponin, kuinon, terpenoid dan steroid berasal dari ekstrak daun namnam. Artinya bahwa kombinasi dua bahan ini saling melengkapi yang dapat menambah nilai aktivitas dari bahan kombinasi.

Aktivitas antioksidan

Hasil analisis memperlihatkan bahwa semua sampel yang dianalisis memiliki kemampuan melakukan penghambatan terhadap radikal DPPH. Aktivitas antioksidan tertinggi terdapat pada sampel EMDN dengan nilai IC_{50} sebesar 0,0048 mg/mL (Tabel 3). Keberadaan senyawa-senyawa seperti fenolik, flavonoid, dan vitamin C pada madu dan namnam berperan penting untuk aktivitas antioksidan. Hal ini ditunjukkan oleh pola hubungan kandungan senyawa tersebut dengan aktivitas antioksidan (Tabel 4). Hubungan ini memperlihatkan bahwa tingginya kadar fenolik, flavonoid dan vitamin C pada sampel menyebabkan tingginya aktivitas antioksidan (Tabel 4). Hal ini dipertegas oleh hasil penelitian Ado *et al.* (2014), yang melaporkan kandungan total fenolik dari ekstrak metanol daun tanaman namnam sebesar 214,370 mg GAE/g ekstrak dan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 0,048 mg/mL.

Tabel 2. Hasil uji fitokimia sampel ekstrak metanol daun namnam sebelum dan sesudah dikombinasikan dengan madu trigona

Sampel	Fenolik	Flavonoid	Alkaloid	Steroid/Triterpenoid	Saponin	Kuinon
EMDN	+	+	-	+	+	+
MT	+	+	-	-	-	-
EMDN : MT (1:1)	+	+	-	+	+	+

Keterangan: (+): Terdeteksi; (-): Tidak Terdeteksi; EMDN : Ekstrak Metanol Daun Namnam; MT : Madu Trigona; MT : EMDN (1:1): Kombinasi Madu Trigona : Ekstrak Metanol Daun Namnam (1:1)

Tabel 3. Aktivitas antioksidan sampel ekstrak metanol daun namnam dan madu trigona sebelum dan setelah kombinasi

Sampel	IC ₅₀ (mg/mL)
Standar vitamin C	0,0036 ± 0,000 ^a
MT	3,736 ± 0,112 ^b
EMDN	0,0048 ± 0,000 ^a
MT : EMDN (1:1)	0,0085 ± 0,000 ^a

Keterangan: Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada tabel menunjukkan nilai tidak berbeda nyata (uji Duncan $\alpha = 5\%$); MT: Madu Trigona; EMDN: Ekstrak Metanol Daun Namnam; MT : EMDN (1:1): Kombinasi Madu Trigona : Ekstrak Metanol Daun Namnam (1:1)

Ado *et al.* (2014) juga menyatakan bahwa terdapat 18 senyawa yang telah diidentifikasi dari fraksi aktif etil asetat dan butanol daun *Cynometra cauliflora* L yang merupakan bagian dari senyawa fenolik dan flavonoid. Ketika sampel MT dan EMDN dikombinasikan menunjukkan perubahan yang signifikan terhadap aktivitas antioksidan meskipun tidak sebesar EMDN sebelum dikombinasikan. Hasil ini diperkuat oleh hasil analisis statistika yang menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan sebelum dan sesudah kombinasi berbeda nyata. Aktivitas antioksidan pada sampel setelah kombinasi diduga diakibatkan oleh keberadaan senyawa aktif yang terdeteksi pada uji fitokimia (Tabel 2) maupun uji kuantitatif (Tabel 4).

Tabel 4. Kandungan total fenolik, flavonoid, dan vitamin C madu trigona dan ekstrak metanol daun namnam sebelum dan setelah kombinasi

Sampel	Kadar Total Fenolik (mg GAE/g Sampel ± SD)	Kadar Total Flavonoid (mg QE/g Sampel ± SD)	Kadar Vitamin C (mg AA/g Sampel ± SD)
MT	1,0096 ± 0,1170 ^a	0,0962 ± 0,00490 ^a	49,7352 ± 1,43334 ^b
EMDN	267,6897 ± 7,27079 ^c	12,5850 ± 0,17950 ^c	201,6848 ± 14,86620 ^e
MT : EMDN (1:1)	131,7105 ± 4,66267 ^b	6,9388 ± 0,35035 ^b	61,9637 ± 1,42908 ^{c,d}

Keterangan: Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada tabel menunjukkan nilai tidak berbeda nyata (uji Duncan $\alpha = 5\%$); MT: Madu Trigona; EMDN: Ekstrak Metanol Daun Namnam; MT : EMDN (1:1): Kombinasi Madu Trigona : Ekstrak Metanol Daun Namnam (1:1)

Hal ini terlihat dari keberadaan total fenolik, flavonoid dan vitamin C yang mempengaruhi mekanisme radikal DPPH *scavenging*. Selain itu,

flavonoid juga telah dilaporkan berpengaruh pada sifat antioksidan melalui aktivitas *scavenging* dan kelatung.

Hasil analisis sifat antioksidan (LC₅₀) (Tabel 3) pada kombinasi MT dan EMDN tidak menunjukkan nilai yang paling tinggi. Hal ini sejalan dengan fluktuasi total fenolik, flavonoid dan vitamin C. Kondisi ini memperkuat alasan bahwa kemampuan antioksidan kombinasi MT dan EMDN dipengaruhi oleh keberadaan total fenolik, flavonoid dan vitamin C. Pengaruh senyawa ini telah disimpulkan oleh Singh *et al.*, 2010 melalui kombinasi Triphala dengan *Terminalia chebula*, *Terminalia Bellerica* dan *Emblia officinalis*. Penelitian tersebut menyatakan bahwa fraksi yang kaya polifenol relatif berpengaruh terhadap sifat antioksidan dibandingkan yang lebih rendah kadar fenoliknya. Dugaan lain yang mempengaruhi aktivitas antioksidan bahan kombinasi tersebut adalah komposisi bahan. Liu *et al.*, 2014 melakukan penelitian kombinasi ekstrak ubi jalar manis dengan polifenol tanaman Teh dan flavonoid *Pueraria* yang menyatakan bahwa komposisi bahan yang optimum berperan penting pada kondisi oksidatif sistem biologi. Kondisi ini juga memunculkan dugaan bahwa telah terjadi interaksi senyawa yang terdapat dalam bahan yang dikombinasikan. Meskipun demikian, mekanisme peranan fitokonstituen yang berbeda pada bahan campuran dan mempengaruhi aktivitas antioksidan perlu diteliti lebih lanjut.

Perbedaan sifat antioksidan tidak hanya berkorelasi dengan jumlah total antioksidan, tetapi berkenaan juga dengan komponen-komponen yang terpilih. Secara rinci dikatakan bahwa perbedaan kemampuan sebagai antiradikal (antioksidan) diakibatkan karena (i) perbedaan komponen dan komposisi bioaktif, (ii) keragaman karakteristik struktural fenolik yang berpotensi sebagai antioksidan, (iii) sinergisme komponen bioaktif yang ada dalam setiap kombinasi dan (iv) perbedaan sifat kinetik antioksidan potensial (Ramadan, 2008).

Semua sampel yang ada baik dalam bentuk tunggal maupun campuran menunjukkan nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm. Menurut Jun *et al.* (2003), aktivitas antioksidan digolongkan sangat aktif jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, digolongkan aktif bila nilai IC₅₀ antara 50-100 ppm, digolongkan sedang bila nilai IC₅₀ 101-250 ppm, dan digolongkan lemah bila nilai IC₅₀ 250-500 ppm, serta digolongkan tidak aktif bila nilai IC₅₀ lebih besar dari 500 ppm. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Oleh karena itu, nilai IC₅₀ sampel yang dianalisis menunjukkan kemampuan antioksidan sangat aktif.

Uji fitokimia dan identifikasi β -karoten

Hasil uji fitokimia (Tabel 5) menunjukkan adanya kandungan senyawa golongan triterpenoid dan karotenoid. Senyawa golongan triterpenoid ditandai dengan timbulnya warna merah sedangkan senyawa golongan steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau. Selain itu, uji kualitatif karotenoid dengan menggunakan pereaksi *Carr Price* (SbCl_3 dalam kloroform). Terbentuknya warna merah jingga atau coklat setelah penambahan SbCl_3 menunjukkan dalam ekstrak terdapat karotenoid. Terbentuknya warna merah disebabkan karotenoid membentuk kompleks dengan ion logam Sb.

Tabel 5. Hasil uji kualitatif (Scan λ_{Maks}) keberadaan senyawa karotenoid dan steroid/triterpenoid pada sampel madu trigona dan ekstrak metanol daun namnam

Sampel	Golongan Senyawa		λ_{maks} (nm)
	Steroid/Triterpenoid	Karotenoid	
MT	+	+	442,83
EMDN	+	+	328,37; 382,20; 418,81; 443,68; 472,30

Keterangan: + (Terdeteksi), dan – (Tidak terdeteksi) Madu Trigona (MT), Ekstrak Metanol Daun Namnam (EMDN)

Hasil scan λ_{maks} (Tabel 5) sampel MT dan EMDN menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang tertentu (Tabel 5). Hasil ini diperkuat oleh Britton *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa serapan maksimum β -karoten pada panjang gelombang 425, 450, dan 477 nm. Hal ini menggambarkan bahwa sampel MT dan EMDN memiliki kandungan β -karoten, selisih jarak panjang gelombang yang berdekatan. Pada sampel ekstrak daun namnam terdapat banyak serapan maksimum, karena adanya senyawa lain yang terdapat pada sampel. Analisis ini menggunakan standar β -karoten murni sebagai standar pengukuran. Hasil merujuk pada penelitian Alvarez-Suarez *et al.* (2010) dan Biswas *et al.* (2011) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Kandungan β -karoten pada ekstrak daun namnam 1,013 mg $\beta\text{CE/gr}$ lebih besar jika dibandingkan dengan sampel madu trigona (Tabel 6). Hasil ini diakibatkan oleh pengaruh klorofil terutama pada bagian permukaan atas daun dan keberadaan senyawa polifenol. Lisiewska *et al.* (2006) menyatakan bahwa tanaman memiliki kandungan karotenoid dan β -karoten lebih tinggi pada tanaman yang memiliki kandungan klorofil dan polifenol yang tinggi.

Kandungan β -karoten tersebut akan mengalami peningkatan (Tabel 6) ketika MT dan EMDN dikombinasikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemanfaatan kombinasi kedua bahan tersebut sangat potensial untuk mendapatkan fungsi yang terkandung dalam β -karoten.

Tabel 6. Kadar β -karoten pada sampel madu trigona dan ekstrak metanol daun namnam sebelum dan setelah dikombinasikan serta ekstraksi partisi pada beberapa pelarut

Sampel	Kadar β -karoten (mg $\beta\text{CE/gr}$)
MT	0,014 \pm 0,100
EMDN	1,013 \pm 0,020
MT: EMDN (1:1)	3,15 \pm 0,500
Fraksi n-heksana	18,83 \pm 0,030
Fraksi etil asetat	0,022 \pm 0,120
Fraksi butanol	-
Fraksi air	-

Keterangan: MT:Madu Trigona, EMDN:Ekstrak Daun Namnam, MT:EMDN (Kombinasi Madu Trigona & Ekstrak Daun Namnam). Data partisi pada beberapa pelarut untuk sampel setelah kombinasi (MT : EMDN)

Hasil ini akan mengalami peningkatan lagi ketika sampel kombinasi diekstraksi partisi dengan fraksi n-heksana yang menyebabkan peningkatan kadar β -karoten hingga mencapai 6 (enam) kali dibandingkan sebelum kombinasi. Penyebab peningkatan kadar β -karoten ini ditinjau dari struktur dan sifat β -karoten, termasuk golongan karotenoid yang bersifat non-polar, sehingga mudah larut dalam pelarut non-polar sesuai dengan prinsip *like dissolves like*. Sementara itu, pada fraksi etil asetat relatif sedikit β -karoten yang terdeteksi pada pelarut ini, karena etil asetat merupakan pelarut semi polar. Akibatnya, β -karoten yang terekstrak pada fraksi etil asetat relatif lebih sedikit.

Aktivitas antibakteri

Hasil analisis terhadap aktivitas antibakteri pada semua sampel menunjukkan adanya pembentukan zona bening, namun dengan intensitas yang berbeda-beda. EMDN menunjukkan zona bening yang paling tinggi pada *Staphylococcus aureus*, tapi sampel MT paling tinggi pada *Escherichia coli* (Tabel 8).

Perbedaan respon bakteri dapat disebabkan oleh faktor-faktor yang ada dalam sampel tersebut. Misalnya perbedaan zona hambat sampel MT terhadap kedua bakteri tersebut disebabkan karena perbedaan dinding sel *E. coli* yang memiliki dinding sel yang lebih tipis dibanding *S. aureus*. Peranan dinding sel ini oleh Fadhillah *et al.* (2012) dinyatakan

dalam penelitian ekstrak etanol lumut hati bahwa sensitivitas *S. aureus* ATCC 5923 yang tinggi disebabkan karena struktur dinding selnya. Bakteri Gram positif seperti *S. aureus* tidak memiliki membran luar seperti yang dimiliki kebanyakan bakteri Gram negatif. Disamping itu *S. aureus* memiliki dinding sel yang bersifat hidrofobik pada bagian luarnya, sehingga konsentrasi rendah dari ekstrak lumut (<1 mg/mL) akan dapat membunuh seluruh bakteri *S. aureus* (Madigan *et al.*, 2009).

Senyawa fenolik akan merusak sel bakteri dengan cara mengubah permeabilitas membran sitoplasma karena larut lemak. Sementara dalam konsentrasi yang lebih rendah, fenol menginaktivasi sistem enzim penting dalam sel bakteri (Oliver *et al.*, 2001). Madu kelulut dari *Trigona* spp memiliki kandungan fenolik dan intensitas warna yang lebih tinggi dari madu Apis spp (Kek *et al.*, 2014). Aktivitas antibakteri pada madu dapat disebabkan konsentrasi gula yang tinggi, keasaman, total flavonoid, total fenol, konsentrasi hidrogen peroksida atau komponen yang belum teridentifikasi lainnya yang terdapat di dalam madu (Bogdanov, 2015). Keberadaan senyawa fenolik dan flavonoid pada sampel MT dan EMDN yang diuji telah mendukung beberapa pernyataan sebelumnya (Tabel 4).

Pengujian antibakteri ekstrak metanol daun namnam (EMDN) menunjukkan bahwa zona hambat *S. aureus* sebesar 23,7 mm, sedangkan *E. coli* tidak membentuk zona hambat (Tabel 7). Senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri pada daun namnam hampir sama dengan senyawa aktif yang terkandung di dalam MT, hanya saja kadar senyawa aktif tersebut yang berbeda, sehingga memberikan pengaruh yang berbeda pula pada kedua bakteri. Total fenolik dan flavonoid pada ekstrak metanol daun namnam cukup tinggi dibandingkan dengan madu, namun senyawa aktif ekstrak metanol daun namnam hanya mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* yang disebabkan dinding selnya bersifat polar, sehingga senyawa aktif ekstrak metanol daun namnam yang bersifat polar juga lebih mudah menembus dinding sel *S. aureus* tersebut.

Sampel EMDN dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* karena bakteri tersebut tidak memiliki membran luar seperti *E. coli*. *S. aureus* hanya memiliki dinding sel yang terdiri dari lapisan peptidoglikan tanpa adanya tiga polimer pembungkus di luar sehingga selnya akan mudah terdenaturasi oleh senyawa aktif di dalam ekstrak metanol daun namnam. Sebaliknya, *E. coli* memiliki tiga lapisan dinding sel yang menyebabkan bakteri tersebut lebih tahan terhadap ekstrak metanol daun namnam. Senyawa fenolik yang memiliki substansi

cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil sehingga dapat menembus peptidoglikan. Akibatnya, dinding dan membran sel mengalami kerusakan dan mengganggu sistem transpor aktif bakteri (Bachir dan Benali, 2012). Menurut Ruiz *et al.* (2012) senyawa fenolik selain merusak struktur dinding sel dan mengganggu kerja transpor aktif, juga mengganggu kekuatan proton di dalam membran sitoplasma bakteri. Kemampuan antibakteri tanaman dari jenis *cynometra* yang lebih besar pada *S. aureus* dibandingkan *E. coli* ini dipertegas oleh beberapa penelitian seperti pada ekstrak etanol daun *Cynometra travancorica* (John *et al.*, 2012) dan ekstrak methanol kulit kayu *Cynometra ramiflora* Linn (Afjalus *et al.*, 2013).

Tabel 7. Pengaruh ekstrak tunggal dan kombinasi MT dan EMDN terhadap penghambatan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Sampel	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm ± SD)	<i>Escherichia coli</i> (mm ± SD)
EMDN	23,7 ± 3,3 ^d	0,00 ± 0,00 ^a
MT	16,6 ± 4,1 ^{c,d}	32,6 ± 4,4 ^{d,e,f,g}
MT:EMDN (1:1)	17,6 ± 2,6 ^d	23 ± 1,9 ^c
Kloramfenikol	22,2 ± 3,8 ^d	27,9 ± 0,5 ^{c,d,e}
<i>Povidone iodine</i>	10,3 ± 1,0 ^{b,c}	23,5 ± 8,9 ^c
Metanol	0,00 ± 0,00 ^a	10,8 ± 3,8 ^b
Aquades	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a

Keterangan: Angka-angka yang didampingi oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf uji lanjut Duncan 5% taraf signifikansi 95% ($P < 0,05$). Data pada perlakuan telah dikonversi terhadap zona hambat oleh metanol

Hasil pengujian antibakteri selanjutnya melalui kombinasi MT dan EMDN menunjukkan bahwa baik pada *E. coli* maupun *S. aureus* menunjukkan adanya zona hambat (Tabel 7). Hasil ini menunjukkan adanya penurunan dibandingkan pada saat sampel tunggal. Selanjutnya pembentukan zona hambat pada *E. coli* sampel kombinasi yang sebelumnya tidak nampak pada EMDN menunjukkan kontribusi hambatan berasal dari sampel MT.

Zona hambat pada kombinasi lebih kecil dibandingkan dengan sampel tunggal. Maslem *et al.* (2012) menyatakan bahwa kombinasi dua atau lebih substansi akan memberikan nilai medis yang lebih baik jika komponen-komponen di dalamnya tidak terjadi reaksi yang dapat merugikan kesehatan. Selain itu, kecilnya daya hambat ini menunjukkan bahwa komposisi MT dan EMDN (1:1) bukanlah komposisi yang optimal untuk mendapatkan efek antibakteri yang maksimal. Hal ini telah dibuktikan

melalui penelitian kombinasi madu dan *Nigella sativa* (Maslem *et al.*, 2012), kombinasi madu dan *Garcinia kola* (Akinnibosun dan Itejere, 2013), dan kombinasi madu alam dan benih *Peganum harmala* (Ahmed *et al.*, 2013), madu dan tepung kentang (Ahmed *et al.*, 2012). Hasilnya menunjukkan bahwa jika komposisi bahan yang dicampurkan dengan madu berbeda maka zona hambat yang dihasilkan cenderung berbeda terhadap masing-masing bakteri uji dan menunjukkan efek sinergi. Bahkan pada beberapa kondisi makin tinggi komposisi yang dicampurkan dengan madu maka zona hambat makin tinggi (Maslem *et al.*, 2012; Akinnibosun dan Itejere, 2013).

Hasil analisis ini menunjukkan pula bahwa peningkatan komposisi komponen EMDN menyebabkan peningkatan zona hambat. Mekanisme aktivitas antibakteri madu yang kompleks ini diduga berkaitan dengan aktivitas sinergis antara berbagai bahan bioaktif seperti polifenol dan flavonoid (Escuredo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2008) yang juga terdapat pada MT dan EMDN. Selain itu, kombinasi MT dan EMDN dalam penelitian ini masih menghasilkan zona hambat yang lebih tinggi dibandingkan dengan antibakteri komersil (*Povidine Iodine*) (Tabel 7), sehingga masih sangat potensial untuk tetap dikembangkan sebagai salah satu alternatif antibakteri pada berbagai bahan pangan.

KESIMPULAN

Analisis ini menunjukkan bahwa sampel MT dan EMDN tunggal memiliki kandungan total fenolik, flavonoid, vitamin C lebih tinggi dibandingkan kombinasi MT dan EMDN. Namun, kandungan β -karoten kombinasi MT dan EMDN menunjukkan hasil yang lebih tinggi. Analisis terhadap aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa EMDN memberikan aktivitas tertinggi (IC_{50} 0,0048 \pm 0,000 mg/mL), kombinasi EMDN dan MT (IC_{50} 0,0085 \pm 0,000 mg/mL) dan MT (IC_{50} 3,736 \pm 0,112 mg/mL). Analisis bioaktivitas sebagai antibakteri juga menunjukkan bahwa EMDN lebih peka terhadap *S. aureus* (23,7 \pm 3,3 mm) dibandingkan pada *E. coli*, sedangkan MT lebih peka terhadap *E. coli* (32,6 \pm 4,4 mm) dibandingkan bakteri *S. aureus* (16,6 \pm 4,1 mm). Demikian pula, kombinasi EMDN dan MT lebih peka terhadap *E. coli* (23 \pm 1,9 mm) daripada *S. aureus* (17,6 \pm 2,6 mm). Dengan demikian madu trigona, ekstrak metanol daun namnam (*Cynometra cauliflora* L) dalam bentuk tunggal maupun kombinasinya sangat potensial dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan dan antibakteri dalam suatu

bentuk pangan fungsional. Namun demikian, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan perbandingan yang berbeda-beda.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu riset ini dan khususnya kepada almarhumah Dr. Nastiti Kusumorini yang telah melakukan pembimbingan hingga penelitian tahap ini dapat terlaksana dengan baik. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Hilyatuzzahrah yang telah membantu melakukan pengeditan terhadap beberapa bagian dari tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed M, Khiati B, Djebli N, Aissat S, Maslem A, Bacha S. 2013. Potent synergism of the combination of natural honey and *Peganum harmala* seeds against *Candida albicans* ATCC 10231. Open Access Scientific Reports 2: 736. DOI: 10.4172/scientificreports736.
- Ahmed M, DjebliN, Aissat S, Bacha S, Meslem A, Khiati B. 2012. Synergistic inhibition of natural honey and potato starch and their correlation with diastase number and sugar content against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736. Nat Prod Chem Res 1: 102. DOI: 10.4172/2329-6836.1000102.
- Afjalus SM, Malik S, Emrul H, Sanjana S, Farjana Y. 2013. Evaluation of neuropharmacological, antibacterial and antinociceptive activity of methanolic extract of the bark of *Cynometra ramiflora* linn. (Leguminosae). Int J Res Ayurveda Pharm 4: 192-197. DOI: 10.7897/2277-4343.04220.
- Akinnibosun, Itejere. 2013. Evaluation of the antibacterial properties and synergistic effect of *Garcinia kola* heckel (Family: Guttiferae) seed extract and honey on some bacteria. Afr J Microbiol Res 7: 174-180.
- Ado MA, Abas F, Ismail IS, Ghazali HM, Shaari K. 2014. Chemical profil and antiacetylcholinesterase, antityrosinase, antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity of *Cynometra cauliflora* L. leaves. J Sci Food Agric 95: 635-642. DOI: 10.1002/jsfa.6832.
- Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Vidal A, Battino M. 2010. Methodological aspects about determination of phenolic compounds and in vitro evaluation of antioxidant capacity in

- the honey: a review. *Curr Anal Chem* 5: 292–302. DOI: 10.2174/157341109789077 768.
- Aziz AFA, Iqbal M. 2013. Antioxidant activity and phytochemical composition of *Cynometra cauliflora*. *J Exp Integr Med* 3: 337-341. DOI: 10.5455/jeim.250813.or.086.
- Bachir GR, Benali M. 2012. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2: 739-742. DOI: 10.1016/S2 221-1691(12)60220-2.
- Bogdanov S. 2015. Honey as nutrient and functional food. *Bee product sci. A Review*, 1-28. <http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/HealthHoney/8HoneyNutrientFunctionalReview.pdf> [15 Mei 2015].
- Biesalski HK, Dragsted LO, Elmadfa I, Grossklaus R, Müller M, Schrenk D, Walter P, Weber P. 2009. Bioactive compounds: definition and assessment of activity. *Nutr* 25: 1202–1205. DOI: 10.1016/j.nut.2009.04.023.
- Biluca FC, Betta FD, Oliveira GPD, Pereira LM, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2014. 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. *Food Chem* 159: 244-249. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.016.
- Biswas AK, Sahoo J, Chatli MK. 2011. A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of β -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meta nuggets. *LWT-J Food Sci Tech* 44: 1809-1813. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.03. 017.
- Britton G, Jensen SL, Pfender H. 2004. *Handbook Carotenoids*. 15-538. Birkhauser Verlag. Berlin. ISBN: 978-3-7643-6180-8 (book) ISBN: 978-3-0348-7836-4 (eBook). DOI: 10.1007/978-3-0348-7836-4.
- Djamil R, Anelia T. 2009. Penapisan fitokimia, uji BSLT, dan uji antioksidan ekstrak metanol beberapa spesies papilionaceae. *J Ilmu Kefarmasian Indonesia* 7: 65-71.
- Escuredo O, Silva LR, Valentão P, Seijoa MC, Andrade PB. 2012. Assessing *Rubus* honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chem* 130: 671–678. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07. 107.
- Fadhilla R, Iskandar EA, Kusumaningrum HD. 2012. Aktivitas antibakteri ekstrak tumbuhan lumut hati (*Marchantia paleacea*) terhadap bakteri patogen dan perusak pangan. *J Teknol Industri Pangan* 23: 126-131. 2012. DOI: 10.6066/jtip. 2012.23.2.126.
- Ferreira ICFR, Aires E, Barreira JCM, Estevinho LM. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem* 114: 1438-1443. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008. 11.028.
- Harborne JB. 1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Edisi Kedua. 97-240. ITB, Bandung.
- Jun M, Fu HY, Hong J, Wan X, Yang CS, Ho CT. 2003. Comparison of antioxidant activities of isoflavones from kudzu root (*Pueraria labata* Ohwl). *J Food Sci* 68: 2117–2122. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb07029.x.
- John J, Ragi RP, Sujana KA, Kumar AN. 2012. Analysis of phytochemical contents and antibacterial activity of an endangered tree (*Cynometra travancorica* Bedd.) of Western Ghats, India. *Adv Biol Res* 6: 1-5.
- Kek SP, Chin NL, Yusof YA, Tan SW, Chua LS. 2014. Total phenolic contents and colour intensity of Malaysian honeys from the *Apis* spp. and *Trigona* spp. bees. *Agric Agric Sci Proced* 2: 150–155. DOI: 10.1016/j.aaspro. 2014.11.022.
- Latuconsina NH, Fatimawali, Citraningtyas G. 2014 Uji efektivitas diuretik ekstrak etanol biji salak (*Salacca Zalacca* varietas *Zalacca* (Gaert.) Voss) pada tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) PHARMACON *J Ilmiah Farmasi* 3: 177-181.
- Lee H, Churey JJ, Worobo RW. 2008. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *Int J Food Microbiol* 126: 240-244. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04. 030.
- Lestari A, Jamhari M, Kundera IN. 2013. Daya hambat ekstrak daun tembelek (*Lantana camara* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. *E-Jip Biol* 1: 42-49.
- Lisiewska Z, Kmiecik W, Korus A. 2006. Content of vitamin C, carotenoids, chlorophylls and polyphenols in green parts of dill (*Anethum graveolens* L.) depending on plant height. *J Food Compos Anal* 19: 134–140. DOI: 10.1016/j.jfca.2005.04.009.
- Liu X, He F, Zhao L, Zhou A, Liu X. 2014. Synergistic antioxidant activity of sweet potato extracts in combination with tea polyphenols and pueraria flavonoid in vitro. *Adv J of Food Sci Technol* 6: 215-220.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap VP, Clark PD. 2009. *Brock: Biology of Microorganisms*. 12th Edition. p 794-807. Pearson Benjamin-Cummings, San Francisco.

- Maslem A, Ahmed M, Djebli N, Aissat S. 2012. Antibacterial activity of honey alone and in combination with *Nigella sativa* seeds against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Asian Pac J Trop Dis* 2: S428-S430.
- Masoko P, Gololo SS, Mokgotho MP, Eloff JN, Howard RL, Mampuru LJ. 2009. Evaluation of the antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activities of the acetone extract of the roots of *Senna italica* (*Fabaceae*). *Afr J Trad CAM* 7: 138-148.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91: 571-577. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.10.006.
- Oliver SP, Gillespie BE, Lewis MJ, Ivey SJ, Almeida RA, Luther DA, Johnson DL, Lamar KC, Moorehead HD, Dowlen HH. 2001. Efficacy of a new premilking teat disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis. *J Dairy Sci* 84: 1545-1549. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70189-0.
- Owayss AA, Rady MM, Gadallah FM. 2004. Pigmentation of some honeybee, *Apis Mellifera* L., products. *Fayoum J Agric Res Dev* 18: 121-132.
- Rabeta MS, Farazina R. 2013. Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *Garcinia atrovirdis* and *Cynometra cauliflora*. *Int Food Res J* 20: 1691-1696.
- Ramadan MF. 2008. Total antioxidant potential of juices, beverages and hot drinks consumed in Egypt screened by DPPH in vitro assay. *Grasas Y Aceites* 59: 254-259. DOI: 10.3989/gya.2008.v59.i3.516.
- Ruiz AG, Cueva C, Rompinelli EMG, Yuste M, Torres M, Álvarez PJM, Bartolomé B, Arribas MVM. 2012. Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic acid bacteria growth and wine malolactic fermentation. *Food Cont* 28: 212-219. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.002.
- Salni, Marisa H, Mukti WR. 2011. Isolasi senyawa antibakteri dari daun jengkol (*Pithecolobium lobatum* benth) dan penentuan nilai KHM-nya. *J Penelitian Sains* 14: 1410938-1410941.
- Singh R, Singh B, Kumarb N, Arora S. 2010. Antioxidant activity of triphala a combination of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica* and *Emblica officinalis*. *J Food Biochem* 34: 222-232. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2009.00326.x.
- Singh P, Singh S, Kapoor IPS, Singh G, Isidorov V, Szczepaniak L. 2013. Chemical composition and antioxidant activities of essential oil and oleoresins from *Curcuma zedoaria* rhizomes, part-74. *Food Biosci* 3: 42-48. DOI: 10.1016/j.fbio.2013.06.002.
- Socha R, Juszczak L, Pietrzyk S, Fortuna T. 2009. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. *Food Chem* 113: 568-574. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.08.029.
- Sumarlin L, Anna M, Prita W, Masitoh. 2014. Aktivitas antikanker dan antioksidan madu di pasaran lokal Indonesia. *J Ilmu Pertanian Indonesia* 19: 136-144.
- Suryanto E, Wehantouw F. 2009. Aktivitas penangkapan radikal bebas dari ekstrak fenolik daun sukun (*Artocarpus altilis* F.). *Chem Prog* 2: 1-7.
- Zainol MI, Yusoff KM, Yusof MYM. 2013. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC Complemen Altern* 13: 129. DOI: 10.1186/1472-6882-13-129.