

Culturable Microbial Abundance and Morphotypes in Stingless Bee Honey from Urban and Rural Landscapes

Fitriyan Kurnia^{1*}, Elpe Bibas¹, Muftiah Yasi Dwi Wahyuni¹, Etha Marista¹, Adityo Raynaldo¹, Nur Exsanty Rembulan¹, Jani Putri Rara¹ & Riza Linda²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam dan Kelautan, UniversitasOSO, Pontianak, Kalimantan Barat, Indonesia;

²Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Kalimantan Barat, Indonesia;

Article History

Received : June 07th, 2026

Revised : July 04th, 2026

Accepted : July 15th, 2026

*Corresponding Author:

Fitriyan Kurnia, Program Studi Biologi, Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam dan Kelautan, UniversitasOSO, Pontianak, Kalimantan Barat, Indonesia;

Email:

fitriyankurnia@oso.ac.id

Abstract: Stingless bee honey contains culturable microorganisms that may vary with floral resources, hive conditions, handling, and surrounding landscapes. This descriptive study compared total culturable counts and colony/cell morphotypes in *Heterotrigona itama* honey collected from one urban site in Pontianak and one rural site in Ambawang, Kubu Raya. Honey was serially diluted, cultured on Glucose Peptone Agar, and characterized using colony morphology, Gram staining, and endospore observations. Total Plate Count (TPC) values varied among isolates within each landscape: urban isolates ranged from 1.98×10^5 to 1.12×10^6 CFU/mL, while rural isolates ranged from 8.9×10^4 to 2.2×10^5 CFU/mL. Urban cultures included bacterial and yeast-like morphotypes, whereas rural cultures were represented by Gram-positive, non-spore-forming bacterial morphotypes. These observations describe culturable abundance and morphology but do not establish taxonomic identity, community diversity, or a causal landscape effect because site replication, molecular identification, physicochemical covariates, and inferential statistics were not reported. The study provides preliminary data that can guide replicated surveys combining culture-based and sequencing approaches.

Keywords: Culturable Microorganisms; *Heterotrigona itama*; Honey Microbiology; Total Plate Count; Urban-Rural Landscape.

Pendahuluan

Lebah tanpa sengat atau *Stingless bee* dari spesies *Heterotrigona itama*, yang secara lokal dikenal sebagai kelulut, merupakan kelompok serangga penyerbuk yang memiliki peran ekologis penting dalam menjaga keseimbangan dan keberlanjutan ekosistem, khususnya di wilayah tropis. Kelulut tersebar luas di daerah tropis dan subtropis, seperti Amerika Selatan, Australia, dan Asia Tenggara (Biscassi *et al.*, 2023). Aktivitas penyerbukan yang dilakukan kelulut berkontribusi langsung terhadap keberhasilan reproduksi berbagai jenis tumbuhan liar maupun budidaya, sehingga mendukung produktivitas tanaman,

stabilitas komunitas vegetasi, serta keanekaragaman hayati secara keseluruhan (Azmi *et al.*, 2022; Samsudin *et al.*, 2024).

Sebagai penyerbuk alami, kelulut merupakan komponen penting dalam jaringan ekologi, terutama pada ekosistem yang bergantung pada penyerbukan silang. Di samping peran ekologis tersebut, kelulut memiliki nilai ekonomis yang sangat signifikan melalui produksi madu, propolis, dan bee bread. Oleh karena itu, pelestarian dan pemanfaatan kelulut secara berkelanjutan melalui budidaya menjadi isu strategis dalam meningkatkan kesejahteraan masyarakat sekaligus mendukung konservasi biodiversitas.

Madu kelulut merupakan produk yang paling dikenal dan semakin mendapat perhatian karena memiliki karakteristik yang berbeda dibandingkan madu *Apis mellifera*. Madu kelulut umumnya memiliki cita rasa lebih asam, tekstur lebih encer, serta kandungan nutrisi dan senyawa bioaktif yang khas, sehingga berpotensi sebagai pangan fungsional bernilai tambah (Buchori *et al.*, 2022). Kandungan senyawa bioaktif, seperti fenolik, flavonoid, asam organik, vitamin, dan enzim, berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan dan antimikroba yang relatif tinggi. Beberapa penelitian juga melaporkan potensi terapeutik madu kelulut dalam membantu memperbaiki kondisi sindrom metabolik dan melindungi organ dari kerusakan akibat stres oksidatif (Hashim *et al.*, 2023). Potensi terapeutik dan sifat antimikroba tersebut diketahui berkaitan erat dengan keberadaan mikrobioma alami di dalam madu lebah tanpa sengat ini. Madu kelulut secara alami kaya akan berbagai spesies bakteri, dengan kelompok Bakteri Asam Laktat (BAL) seperti *Lactobacillus malefermentans* ditemukan sebagai mikroba dominan asli (native) yang bersinergi dengan senyawa bioaktif madu untuk menghambat berbagai bakteri patogen (Rosli *et al.*, 2020).

Karakteristik fisikokimia madu kelulut dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk sumber nektar dan kondisi lingkungan. Madu kelulut umumnya memiliki kadar air yang relatif tinggi, mencapai sekitar 28,7%, serta kandungan gula pereduksi sekitar 59,3%, yang mempengaruhi rasa, nilai energi, dan umur simpan madu (Evahelda *et al.*, 2021). Selain itu, aktivitas antioksidan madu kelulut dilaporkan lebih tinggi dibandingkan madu *Apis sp.* (Avila *et al.*, 2018).

Selain komposisi kimia, kualitas dan karakteristik madu kelulut juga dipengaruhi oleh keberadaan mikroorganisme yang secara alami berasosiasi dengan madu. Kadar air yang tinggi dan pH yang lebih rendah menyebabkan madu kelulut lebih rentan mengalami fermentasi alami yang melibatkan bakteri dan khamir. Mikroorganisme tersebut berperan dalam pembentukan rasa, aroma, stabilitas madu, serta berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba dan antioksidan (Nurmiati *et al.*, 2024).

Keanekaragaman mikroorganisme madu kelulut dipengaruhi oleh mikroflora lingkungan, mikrobiota tubuh lebah, sumber nektar, serta kondisi fisik dan biologis sarang. Faktor lingkungan, seperti suhu, kelembaban, curah hujan, dan tipe habitat, turut membentuk komunitas mikroba madu (Shi *et al.*, 2024; Nguyen *et al.*, 2022). Perbedaan habitat urban dan rural menghasilkan kondisi lingkungan yang kontras, yang diduga mempengaruhi variasi komunitas mikroorganisme pada madu kelulut.

Meskipun potensinya besar, penelitian yang mengeksplorasi kelimpahan (abundance) serta variasi karakteristik fenotipe dari mikroba yang dapat dikultur (culturable microorganisms) dari madu kelulut masih sangat terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini dirancang secara spesifik untuk menganalisis perbedaan kelimpahan dan variasi morfotipe mikroba yang dapat dikultur (*culturable*) dari madu lebah tanpa sengat yang berasal dari lanskap urban dan rural (urban and rural landscapes). Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan data dasar mengenai profil kelimpahan dan variasi fisik isolat lokal yang viabel, sekaligus menjadi landasan ilmiah berbasis ekologi mikrobiologi dalam pengendalian mutu dan standarisasi awal keamanan produk madu kelulut.

Bahan dan Metode

Waktu dan Tempat

Penelitian ini melibatkan sampel madu dari spesies lebah tanpa sengat *Heterotrigona itama* yang dikumpulkan dari dua tipe habitat berbeda yaitu urban dan rural pada Oktober 2025 yang bertepatan dengan musim hujan. Pengambilan sampel madu kelulut (*Heterotrigona itama*) pada lanskap urban dilakukan di Kota Pontianak, tepatnya di lingkungan Kampus Universitas OSO pada koordinat geografis 0° 02' 48.81" S, 109° 20' 50.52" E.

Karakter lanskap urban ini didominasi oleh area terbangun (infrastruktur kampus) dengan vegetasi terbatas berupa tanaman hias serta beberapa pohon buah seperti mangga (*Mangifera indica*). Sementara itu, sampling pada lanskap rural dilakukan di Kecamatan

Ambawang, Kabupaten Kubu Raya pada koordinat 0° 03' 06.11" S, 109° 30' 04.20" E, dengan jarak antar-lokasi sampling berkisar ± 20 km. Karakter lanskap rural didominasi oleh pekarangan alami dan kebun campuran yang kaya akan vegetasi sumber pakan lebah, seperti rambutan (*Nephelium lappaceum*), durian (*Durio zibethinus*), langsung (*Lansium domesticum*), kelapa (*Cocos nucifera*), matoa (*Pometia pinnata*), pinang (*Areca catechu*), cempedak (*Artocarpus integer*), nangka (*Artocarpus heterophyllus*), kelengkeng (*Dimocarpus separation*), dan jambu (*Syzygium spp.*).

Pengambilan sampel madu kelulut. Koloni lebah yang digunakan merupakan koloni produktif yang dipelihara di dalam stup budidaya dengan sistem topping kayu, dengan umur koloni berkisar ± 6 bulan setelah pemindahan sarang dari alam (log asli). Umur koloni tersebut mengacu pada rekomendasi peternak lokal sebagai waktu pemanenan atau pengambilan madu terbaik karena kondisi koloni sudah stabil dan optimal dalam menghasilkan madu kelulut. Seluruh sampel madu selanjutnya disimpan dalam wadah steril bersuhu dingin (*cool box*) sebelum dianalisis melalui proses isolasi di Laboratorium Terpadu Universitas Tanjungpura dan identifikasi mikroba yang dilaksanakan di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB.

Desain/Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan studi deskriptif berbasis kultur yang dirancang untuk membandingkan profil mikroba pada madu kelulut dari dua titik lokasi spesifik di Kalimantan Barat. Sampel lanskap urban diambil dari kawasan Kampus Universitas OSO (Kota Pontianak), sedangkan sampel lanskap rural diambil dari kawasan Kecamatan Sungai Ambawang (Kabupaten Kubu Raya). Penelitian ini dibatasi untuk mengamati variasi mikroba pada kedua lokasi tersebut.

Persiapan dan Pengambilan Sampel

Tahap awal penelitian mencakup persiapan dan pengambilan sampel madu kelulut dari dua tipe lanskap, yaitu kawasan urban di Kota Pontianak tepatnya di lingkungan Universitas OSO dan rural di Kabupaten Kubu Raya kecamatan Ambawang. Pemilihan lokasi didasarkan pada perbedaan tingkat aktivitas

antropogenik, kepadatan penduduk, serta karakteristik lingkungan yang diperkirakan mempengaruhi komunitas mikroba dalam madu kelulut. Survei awal dilakukan pada peternak kelulut di masing-masing lokasi untuk memastikan keberadaan koloni aktif dan kondisi lingkungan yang sesuai. Koordinasi dengan peternak dilakukan untuk menentukan waktu pengambilan sampel tanpa mengganggu aktivitas koloni. Seluruh peralatan, seperti botol vial kaca steril, spatula, jarum ose, pipet tetes, dan kotak pendingin, disterilisasi sesuai prosedur mikrobiologi.

Pengambilan sampel dilakukan langsung dari sarang aktif pada masing-masing lanskap. Setiap sarang dipilih tiga pot madu secara acak. Dari masing-masing pot madu tersebut, diambil sebanyak 50 mL madu menggunakan teknik pemanenan standar, yakni menusuk pot madu secara hati-hati dengan jarum steril dan mengambilnya menggunakan pipet tetes steril. Setiap sampel dimasukkan ke dalam botol vial kaca steril yang berbeda dan diberi label identitas. Guna menjaga sterilitas dan viabilitas mikroba selama transportasi, sampel disimpan di dalam kotak pendingin dilengkapi ice pack pada suhu 4°C dan dibawa ke laboratorium. Parameter lingkungan, termasuk suhu, kelembaban relatif, dan kondisi vegetasi, didokumentasikan sebagai variabel ekologis yang relevan terhadap analisis keanekaragaman mikroba

Isolasi dan Karakteristik Mikroba

Isolasi mikroba dilakukan menggunakan media *Glucose Peptone Agar* (GPA) dengan pH $2,57 \pm 0,19$ untuk menumbuhkan mikroba yang terdapat dimadu. Sampel madu dari kedua lanskap diencerkan secara bertingkat dalam aquades steril hingga pengenceran 10^{-5} . Sebanyak 0,1 mL dari setiap tingkat pengenceran diinokulasikan secara aseptis ke dalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan media GPA cair ($\pm 45^{\circ}\text{C}$) dan dihomogenkan menggunakan metode cawan tuang (*pour plate*). Setelah media padat, cawan petri diinkubasi pada kondisi aerob pada suhu 30°C selama 48 jam. Kepadatan populasi mikroba dihitung dalam satuan CFU/mL, di mana perhitungan kuantitatif hanya difokuskan pada cawan yang memenuhi kriteria kelayakan statistik yaitu berkisar antara 30–300 koloni. Karakteristik mikroba ditentukan melalui pengamatan morfologi koloni yang tumbuh

secara makroskopis. Selanjutnya, uji pewarnaan Gram dilakukan untuk mengidentifikasi karakteristik mikroskopis guna membedakan kelompok mikroba Gram positif dan Gram negatif. Isolat murni yang diperoleh kemudian diberi kode spesifik berdasarkan asal lanskap dan jenis media untuk keperluan analisis keanekaragaman lebih lanjut.

Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis deskripsi kualitatif dan disajikan dalam bentuk tabel serta dokumentasi visual. Analisis difokuskan pada perbandingan morfologi koloni mikroba (meliputi bentuk, warna, tepian, elevasi, dan ukuran koloni pada media GPA) serta karakteristik dinding sel melalui pewarnaan Gram antara kedua lanskap yang diamati. Penelitian ini tidak menggunakan analisis statistik inferensial; oleh karena itu, analisis data

diarahkan untuk mengidentifikasi keberadaan dan kecenderungan variasi tipe morfologi isolat secara deskriptif pada masing-masing lokasi sampling.

Hasil dan Pembahasan

Hasil

Jumlah Koloni Mikroba Madu Kelulut

Keberadaan mikroba pada madu kelulut yang berasal dari lanskap urban dan rural menunjukkan perbedaan jumlah koloni mikroba. Variasi jumlah koloni ini mengindikasikan awal mengenai karakteristik pada setiap morfotipe mikroba yang terdapat di madu kelulut pada kedua lokasi tersebut. Data jumlah koloni mikroba pada masing-masing lanskap disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Total Plate Count Mikroba yang Dapat Dikultur pada Sampel Madu Kelulut dari Dua Lokasi

Lokasi (Lanskap)	Kode Isolat	Tingkat Pengenceran	Jumlah Koloni Terhitung	Total Plate Count Mikroba (CFU/mL)
Urban	UR 1	10^{-3}	42	$4,2 \times 10^5$
	UR 2	10^{-2}	194	$1,94 \times 10^5$
	UR 3	10^{-3}	112	$1,12 \times 10^6$
Rural	RL 1	10^{-2}	89	$8,9 \times 10^4$
	RL 2	10^{-2}	142	$1,42 \times 10^5$
	RL 3	10^{-2}	220	$2,2 \times 10^5$

Berdasarkan **tabel 1** terlihat nilai *Total Plate Count* (TPC) pada madu kelulut menunjukkan adanya variasi antar isolate pada kedua lanskap. Nilai *Total Plate Count* (TPC) pada isolate UR (Urban) tercatat berada pada rentang yang lebih tinggi ($1,98 \times 10^5 - 1,12 \times 10^6$

CFU/ml) dibandingkan dengan rentang nilai *Total Plate Count* dari isolate RL (Rural) ($8,9 \times 10^4 - 2,2 \times 10^5$ CFU/ml) Variasi ini disajikan secara spesifik untuk menunjukkan masing-masing isolate berhasil dikultur.

Tabel 2. Karakteristik Morfologi Mikroba Madu Kelulut

Identitas Isolat	Karakteristik Makroskopis	Karakteristik Mikroskopis
Urban 1 (Bakteri)	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, opaque, small, rough, dull</i>	Batang besar, Endospora (+), Gram Positif
Urban 2 (Bakteri)	<i>Circular, entire, umbonate, unpigmented, opaque, small, rough, dull</i>	Batang besar, Endospora (+), Gram Positif
Urban 3 (Ragi)	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, punctiform, smooth, glistening, opaque</i>	Bulat-oval besar, Endospora (-), Gram Positif
Rural 1 (Bakteri)	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, punctiform, glistening, translucent</i>	Batang pendek, Endospora (-), Gram Positif
Rural 2 (Bakteri)	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, punctiform, glistening, translucent</i>	Batang pendek, Endospora (-), Gram Positif
Rural 3 (Bakteri)	<i>Circular, entire, convex, unpigmented, punctiform, smooth glistening, translucent</i>	Batang pendek, Endospora (-), Gram Positif

Hasil isolasi menunjukkan adanya variasi karakteristik morfologi mikroba madu kelulut diantara lanskap urban dan rural, baik secara makroskopis maupun mikroskopis (**tabel 2**). Berdasarkan data karakterisasi tersebut, ditemukan tiga morfotipe khas pada masing-masing lanskap. Isolat dari lanskap urban menunjukkan keragaman tipe mikroba mencakup kelompok bakteri (Urban 1 dan Urban 2) dengan permukaan koloni *rough-dull* dengan sel berbentuk batang besar pembentuk endospora, serta kelompok ragi (Urban 3) berbentuk bulat-oval besar. Sebaliknya, pada lanskap rural tidak ditemukan keberadaan kelompok ragi; seluruh isolat yang (Rural 1, Rural 2, dan Rural 3) merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang pendek yang tidak menghasilkan endospora, dengan penampakan makroskopis koloni yang cenderung homogen, yaitu *glistening* dan *translucent*. Rincian komparasi sifat fisik dan seluler dari seluruh isolat ini disajikan pada **Tabel 2**.

Pembahasan

Jumlah Koloni Mikroba Madu Kelulut

Berdasarkan tabel 1 terlihat variasi nilai Total Plate Count (TPC) dimana isolat dari lanskap urban (UR) berada pada rentang yang lebih tinggi dibandingkan dengan rentang nilai TPC dari lanskap rural. Perbedaan ini diduga berkaitan dengan karakteristik lingkungan urban yang memiliki intensitas aktivitas manusia, sehingga memperbesar peluang masuknya mikroorganisme pada madu kelulut. Hal ini sejalan dengan penelitian Bero *et al.*, (2023) bahwa kontaminasi mikroba pada madu dapat bersumber dari nektar, serbuk sari, saluran pencernaan lebah dan lingkungan sekitar, maupun secara sekunder melalui penggunaan peralatan panen yang kurang higienis akibat aktivitas manusia.

Madu kelulut yang berasal dari lanskap rural menunjukkan koloni mikroba yang relatif lebih rendah. Kondisi lingkungan rural didominasi vegetasi sumber pakan yang berlimpah seperti langsung (*Lansium domesticum*), kelapa (*Cocos nucifera*), matoa (*Pometia pinnata*), pinang (*Areca catechu*), cempedak (*Artocarpus integer*), nangka (*Artocarpus heterophyllus*), kelengkeng (*Dimocarpus longan*), dan jambu (*Syzygium spp.*). Keberadaan

berbagai tanaman buah dan Perkebunan ini diduga menyediakan nektar dan polen yang khas sehingga mempengaruhi mikroba yang masuk ke dalam sarang. Penelitian ini tidak mengukur variabel lingkungan seperti indeks keanekaragaman vegetasi sehingga pengaruh langsung faktor tersebut perlu diuji lebih lanjut.

Pada kondisi normal, madu murni memang memiliki mekanisme alami untuk menekan pertumbuhan mikroba dalam jumlah besar, selama tidak terjadi kontaminasi dari luar selama proses penanganan. Rendahnya jumlah koloni pada madu dari Kawasan rural ini sejalan dengan temuan Nemo *et al.*, (2021) pada madu *Apis sp.* yang menjelaskan bahwa mikroba yang relatif rendah merupakan indikator yang berasal dari penanganan bersih, kondisi madu yang masih segar, serta didukung dengan adanya antimikroba alami madu itu sendiri seperti pH dan aktivitas air yang rendah. Sehingga jumlah mikroba yang sedikit pada lanskap rural menjadi indikasi awal bahwa kualitas madu dari kawasan vegetasi alami tersebut terjaga dengan baik

Keberadaan mikroba pada madu kelulut dari dua lanskap ini menunjukkan bahwa madu merupakan habitat alami bagi mikroorganisme tertentu yang mampu beradaptasi terhadap kondisi osmotik tinggi dan pH asam. Hasil dari jumlah koloni ini menjadi dasar dalam penelitian ini, karena memberikan gambaran awal mengenai tingkat kelimpahan mikroba sebelum dilakukan karakteristik lebih lanjut berdasarkan morfologi koloni dan sifat mikroskopis isolat.

Karakteristik Morfologi Mikroba Madu Kelulut

Berdasarkan **Tabel 2**, terdapat perbedaan karakteristik morfologi mikroba madu kelulut antara lanskap urban dan rural, baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Perbedaan ini diduga dipengaruhi oleh kondisi ekologis di sekitar lokasi lebah atau kelulut mengumpulkan nektar dan membentuk madu. Secara umum, madu merupakan lingkungan yang tidak menguntungkan bagi sebagian besar mikroorganisme karena memiliki kadar air rendah, pH asam, konsentrasi gula tinggi, serta mengandung berbagai senyawa antimikroba. Kondisi ini menyebabkan hanya mikroorganisme tertentu dengan kemampuan adaptasi tinggi yang dapat bertahan dan tumbuh di dalam madu. Selain itu, komunitas mikroba madu juga

dipengaruhi oleh mikrobiota saluran pencernaan lebah dan mikroorganisme dari lingkungan sekitar sarang lebah (Luca *et al.*, 2025).

Pada lanskap urban, mikroba yang berhasil di kultur menunjukkan variasi yang lebih heterogen, terdiri atas kelompok bakteri dan ragi (khamir). Secara makroskopis, isolat bakteri urban (UR 1 dan UR 2) membentuk koloni *circular* dengan tepi *entire*, tidak berpigmen (*unpigmented*), bersifat *opaque*, berukuran *small*, serta bertekstur kasar dan kusam (*rough, dull*). Secara mikroskopis, kedua isolat ini merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang besar yang memiliki kemampuan membentuk endospora (Endospora +). Sifat pembentukan endospora ini mengindikasikan strategi bertahan hidup yang tangguh terhadap cekaman lingkungan perkotaan.

Sementara itu, kelompok ragi di lanskap urban diwakili oleh isolat UR 3, yang secara makroskopis dicirikan oleh koloni berbentuk *circular*, tepi *entire*, elevasi *convex*, *unpigmented*, berukuran sangat kecil (*punctiform*), dengan permukaan halus dan mengkilap (*smooth, glistening*). Pengamatan mikroskopis mengkonfirmasi UR 3 sebagai sel berbentuk bulat-oval besar, bersifat Gram positif, dan tidak menghasilkan endospora. Berdasarkan karakteristik morfologi koloni dan sel tersebut, isolat UR 3 diduga merupakan ragi, meskipun identifikasi definitif hingga tingkat genetik atau uji biokimia lanjutan belum dilakukan dalam penelitian ini. Karakteristik permukaan koloni yang halus dan mengkilap ini merupakan ciri khas morfologi dari mikroorganisme eukariotik tersebut. Fenomena ini sejalan dengan studi Silva *et al.* (2024) yang menyatakan bahwa madu kelulut memang menjadi habitat alami bagi berbagai mikroorganisme seperti ragi, bakteri, dan jamur. Kehadiran ragi pada lanskap urban ini berkaitan erat dengan aktivitas metabolisme gula; sifat madu kelulut yang secara alami memiliki kadar air lebih tinggi dibanding madu *Apis sp.* memicu terjadinya proses fermentasi alami, yang pada akhirnya ikut mempengaruhi profil rasa, aroma, hingga stabilitas aktivitas mikroba selama masa penyimpanan.

Secara mikroskopis, isolat bakteri dari lanskap urban memiliki sel berbentuk batang besar, bersifat Gram positif, serta sebagian mampu menghasilkan endospora. Karakteristik

morfologi ini diduga mengarah pada kelompok bakteri pembentuk spora yang menyerupai genus *Bacillus*, salah satu genus yang umum dilaporkan keberadaannya pada sampel madu (Luca *et al.*, 2025; Ngalamat *et al.*, 2019). Sedangkan isolat yang berasal dari lanskap rural menunjukkan morfologi sel berbentuk batang pendek, Gram Positif dan tidak membentuk endospora.

Isolat Urban lainnya menunjukkan karakteristik sel berbentuk bulat-oval besar, bersifat Gram positif, dan tidak membentuk endospora. Ciri-ciri fisik ini memberikan indikasi awal bahwa isolat tersebut kemungkinan termasuk dalam kelompok khamir (*yeast*) yang mampu bertahan di lingkungan pekat. Keberadaan khamir pada sampel madu, terutama madu lebah tanpa serrat, adalah hal yang wajar karena madu jenis ini secara alami memiliki kadar air yang relatif tinggi. Jumlah dan jenis populasi khamir ini juga sangat dipengaruhi oleh sifat kimia madu itu sendiri, dimana sebagian besar khamir indigenous lebah tanpa serrat diketahui memiliki ketahanan yang baik terhadap tekanan osmotik tinggi, meskipun kemampuan menggunakan gulanya cenderung rendah (Echeverrigaray *et al.*, 2021). Seluruh data tersebut baru sebatas pengamatan morfologi luar dan teknik pewarnaan sederhana, sehingga belum bisa dijadikan dasar tunggal untuk menentukan nama genus maupun spesies secara pasti. Pengujian lanjutan yang lebih akurat diperlukan pada penelitian berikutnya untuk memastikan identitas taksonomi dari masing-masing isolat tersebut.

Keanekaragaman mikroba madu kelulut dipengaruhi berbagai faktor seperti kondisi lingkungan, karakteristik madu itu sendiri, interaksi antara lebah, sumber nektar dan termasuk saluran pencernaan lebah. Mikroba yang terbawa tergantung pada flora lokal dan kondisi habitat lebah. Kelompok mikroba seperti bakteri asam laktat dan ragi yang berasal dari nektar berperan dalam struktur mikroba seperti fungsi biologi madu tersebut (Cerqueira *et al.*, 2024).

Sebaliknya, mikroba pada lanskap rural (RL 1, RL 2, dan RL 3) menunjukkan tingkat homogenitas yang tinggi dan didominasi sepenuhnya oleh kelompok bakteri. Berbeda dengan isolat urban yang bersifat *opaque* dan berpermukaan *rough-dull*, seluruh isolat dari kawasan rural menampilkan karakteristik

makroskopis koloni yang seragam, yaitu berbentuk *circular*, tepi *entire*, elevasi *convex*, tidak berpigmen (*unpigmented*), berukuran *punctiform*, bersifat transparan (*translucent*), serta berpermukaan mengkilap (*glistening*). Secara mikroskopis, ketiga isolat rural ini teridentifikasi sebagai bakteri Gram positif berbentuk batang pendek yang tidak membentuk endospora (Endospora –). Berdasarkan ciri morfologi tersebut, isolat rural diduga merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang pendek, namun status taksonomi dan kelompok fisiologisnya belum dapat dikonfirmasi karena penelitian ini hanya sebatas identifikasi morfologi.

Keberadaan mikroba pada sampel rural mengindikasikan bahwa mikroflora di kawasan ini didominasi oleh bakteri simbiosis alami lebah atau mikroba endofit vegetasi hutan yang hidup stabil dalam ekosistem rural yang minim polutan fisis maupun intervensi antropogenik. Dominasi bakteri Gram positif berbentuk batang tanpa endospora sejalan dengan penelitian Goh *et al.*, (2021) bahwa madu lebah tanpa sengat (*Heterotrigona itama*) didominasi oleh bakteri gram positif. penelitian tersebut juga membuktikan bahwa mikroba tersebut termasuk kelompok bakteri asam laktat yang memiliki karakteristik permukaan koloni cenderung mengkilap serta membawa potensi besar sebagai antimikroba alami dan sumber probiotik.

Karakteristik Isolat rural yang didominasi oleh sel berbentuk batang pendek, Gram positif, dan tidak membentuk endospora. ini menunjukkan kemiripan dengan beberapa ciri kelompok bakteri asam laktat (BAL) yang telah dilaporkan terdapat pada produk lebah, termasuk madu. Hal ini sejalan dengan laporan sebelumnya bahwa BAL umumnya bersifat Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk batang atau kokus, serta mampu bertahan pada kondisi asam (Mokoena *et al.*, 2017). Temuan ini juga sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa mikroba pada madu kelulut didominasi oleh bakteri dari famili *Lactobacillaceae* (Castillo *et al.*, 2024). Selain itu, pH madu kelulut yang relatif rendah, berkisar 3–5, diduga turut mendukung keberadaan bakteri asam laktat tertentu (Rosli *et al.*, 2020).

Hasil pengamatan mikroskopis pada isolat BAL asal madu *Heterotrigona itama* menurut Fatma *et al.*, (2022) juga memperkuat pola ini, di

mana 16 dari 21 isolat berbentuk batang sedangkan 5 isolat lagi berbentuk coccus, sehingga bakteri berbentuk batang mendominasi populasi. Seluruh isolat tersebut tergolong BAL yang bervariasi dan didominasi oleh lebah *H. itama* serta berpotensi sebagai probiotik. Kesamaan karakteristik morfologi isolat rural dengan temuan tersebut menunjukkan bahwa mikroba rural memiliki profil yang mirip dengan kelompok BAL pada madu lebah tanpa sengat. Meskipun demikian, identifikasi isolat sebagai kelompok BAL pada penelitian ini masih bersifat dugaan awal berdasarkan karakter morfologi dan pewarnaan Gram, sehingga diperlukan konfirmasi lebih lanjut melalui uji biokimia dan pendekatan molekuler pada penelitian selanjutnya.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan karakter isolat mikroba madu antara lanskap urban dan rural. Lanskap urban menghasilkan isolat dengan karakter yang lebih bervariasi, meliputi kelompok bakteri pembentuk endospora dan ragi, sedangkan lanskap rural didominasi oleh kelompok bakteri Gram positif non-spora yang secara fenotipik mengarah pada kelompok bakteri asam laktat. Temuan ini menunjukkan bahwa komposisi mikroba madu kelulut dapat berbeda antar lanskap, namun interpretasi lebih lanjut mengenai tingkat keanekaragaman maupun faktor penyebab perbedaan tersebut masih memerlukan analisis tambahan. Analisis mikroba madu dan produk lebah lainnya berpotensi digunakan sebagai indikator kesehatan koloni lebah, termasuk untuk mendeteksi kemungkinan gangguan penyakit (Xiong *et al.*, 2023).

Kesimpulan

Madu kelulut dari satu lokasi urban dan satu lokasi rural menunjukkan perbedaan deskriptif pada jumlah mikroba yang dapat dikultur dan morfotipe koloni/sel, dengan TPC terlapor lebih tinggi pada sampel urban. Namun, identitas takson, indeks keanekaragaman, dan pengaruh kausal tipe lanskap belum dapat ditetapkan karena tidak ada replikasi lokasi, analisis inferensial, karakterisasi fisikokimia, atau identifikasi molekuler. Penelitian lanjutan perlu menggunakan beberapa lokasi dan koloni per kategori lanskap, ulangan teknis, kontrol

mutu, serta pendekatan kultur dan sekuensing untuk menguji pola secara robust.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas OSO Pontianak atas dukungan pendanaan yang diberikan melalui skema hibah penelitian ini dengan nomor kontrak 78/UNOSO.4/PL/VIII/2025. Penulis juga menyampaikan apresiasi Penulis juga menyampaikan apresiasi kepada Laboratorium Terpadu Universitas Tanjungpura atas kesediaannya memfasilitasi penggunaan ruang laboratorium selama pelaksanaan penelitian. Selain itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (ITB) atas bantuan dan dukungan dalam pelaksanaan identifikasi morfologi mikroba, termasuk pewarnaan Gram.

Referensi

- Avila, S., Beux, M. R., Ribani, R. H., & Zambiasi, R. C. (2018). Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 37–50. DOI:10.1016/j.tifs.2018.09.002
- Azmi, W. A., Sembok, W. Z. W., Nasaruddin, S. N. M., Azli, N. S., Hatta, M. F. M., & Muhammad, T. N. T. (2022). Evaluation of native stingless bee species (*Heterotrigona itama* and *Geniotrigona thoracica*) for pollination efficiency on Melon Manis Terengganu. *Malaysian Applied Biology*, 51(5). <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v51i5.2360>
- Bero, C. D. R. I., Sanam, M. U. E., & Wuri, D. A. (2023). Kuantifikasi mikroorganisme dan kelayakan konsumsi madu lokal yang diperjualbelikan di Kabupaten TTS (Timor Tengah Selatan). *Jurnal Kajian Veteriner*, 11(2), 114–124. DOI:<https://doi.org/10.35508/jkv.v11i2.7557>
- Biscassi, G. F., Rabêlo, W. F., Sardeli, R., Rodrigues, G. G. R., Brigante, J., Daam, M. A., et al. (2024). Residual determination and acute toxicity of the neonicotinoid clothianidin in the neotropical stingless bee *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Apidae: Meliponini). *Chemosphere*, 349, 140878. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140878>
- Buchori, D., Rizali, A., Priawandiputra, W., Raffiudin, R., Sartiami, D., Pujiastuti, Y., Jauharlina, Mahardika G. P., Meilin, A., Leatemia, J. A., Sudiarta, I. P., Rustam, R., Nelly, N., Lestari, P., Syahputra, E., Hasriyanti, Watung, J. F., Daud, I. D. A., Hariani, N., Jihadi, A., & Johannis, M. (2022). Beekeeping and managed bee diversity in Indonesia: Perspective and preference of beekeepers. *Diversity*, 14(1), 52. <https://doi.org/10.3390/d14010052>
- Castillo, D.C. *et al.* (2024) “Distinct fungal microbiomes of two Thai commercial stingless bee species , *Lepidotrigona terminata* and *Tetragonula pagdeni* suggest a possible niche separation in a shared habitat,” (February), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1367010>.
- Cerqueira, A. E. S. C., Lima, H. S., Silva, L. C. F., Veloso, T. G. R., de Paula, S. O., Santana, W. C., & Silva, C. C. (2024). *Melipona* stingless bees and honey microbiota reveal the diversity, composition, and modes of symbionts transmission. *FEMS Microbiology Ecology*, 100(7), fiae063. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae063>
- da Silva, R. N. A., Magalhães-Guedes, K. T., de Souza, C. O., de Oliveira Alves, R. M., & Umsza-Guez, M. A. (2024). Microbiological and physical-chemical characteristics of pollen and honey from stingless bees: A review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s43014-024-00268-y>
- Echeverrigaray, S., Scariot, F. J., Foresti, L., Schwarz, L. V., Rocha, M., Priscila, G., Moreira, J. P., Paula, A., & Delamare, L. (2021). *International Journal of Food Microbiology Yeast biodiversity in honey produced by stingless bees raised in the highlands of southern Brazil*.

- 347(January).
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109200>
- Evahelda, I., Setiawan, S. N. A., & Afriani, Z. L. (2021). Chemical characteristics of kelulut honey (*Trigona* sp.) in Bangka Tengah District, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 694(1), 012072. doi:10.1088/1755-1315/694/1/012072
- Fatma, I.I., Nuraida, L. and Faridah, D.N. (2022) "Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria from Honey of Three Different Type Honeybees," *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 33(2), pp. 189–199. Available at: <https://doi.org/10.6066/jtip.2022.33.2.189>.
- Goh, W., Molujin, A. M., Muthu, K., Sabullah, M. K., Azifa, A., Faik, M., & Azlan, J. (2021). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Sabah (North Borneo) stingless bees for probiotic and food applications. *International Journal of Food Properties*, 24(1), 564–578. <https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1900238>
- Hartono, Y., Syafruddin, S., & Taqwa, W. H. (2025). Forest honey diversity and potential for honey-based agrotourism in Sumbawa Regency. *Journal of Biology, Environment, and Edu-Tourism*, 1(2), 82–87.
<https://journals.widhatulfaeha.id/index.php/jbee/article/view/93>
- Hashim, K. and Chin, K. (2023) "The Mechanism of Kelulut Honey in Reversing Metabolic Changes in Rats Fed with High-Carbohydrate High-Fat Diet," *molecules*, 28, p. 22. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules28062790>.
- Luca, L., Pauliuc, D., Ursachi, F., & Oroian, M. (2025). Physicochemical parameters, microbiological quality, and antibacterial activity of honey from the Bucovina region of Romania. *Scientific Reports*, 15(1), 1–21. DOI:10.1038/s41598-025-88613-0
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8). doi:10.3390/molecules22081255
- Nemo, R. and Bacha, K. (2021) "Microbial quality, physicochemical characteristics, proximate analysis, and antimicrobial activities of honey from Anfilo district," *Food Bioscience*, 42. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101132>.
- Ngalimat, M. S., Noor, R., & Raja, Z. (2019). Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee , *Heterotrigona itama* , honey , bee bread and propolis. 1–20. <https://doi.org/10.7717/peerj.7478>
- Nguyen, P.N. Rehan, S. M., Emanuel, A., & Cerqueira, S. (2022) "The effects of urban land use gradients on wild bee microbiomes," *Frontiers in Microbiology*, (November), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.992660>.
- Nurmiati, N., Herwina, H. and Periadnadi, P. (2024) "Exploration of natural microflora from stingless bee honey harvested from Limau Manis area , Padang , West Sumatra , Indonesia," 25(9), pp. 2908–2916. Available at: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d250910>.
- Rosli, F.N. *et al.* (2020) "Stingless bee honey: Evaluating its antibacterial activity and bacterial diversity," *Insects*, 11(8), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.3390/insects1108050>.
- Samsudin, A., Jamian, S., Shilan, T., & Syukri, M. (2024). The foraging behavior of *Heterotrigona itama* (Cockerell) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in close system rockmelon (Cucurbitales: Cucurbitaceae) cultivation. *Serangga*, 29(3). <https://doi.org/10.17576/serangga-2024-2903-03>
- Setiaji, A., Annisa, R.R.R. and Rahmandhias, D.T. (2023) "Bakteri Bacillus Sebagai Agen Kontrol Hayati dan Biostimulan Tanaman," *Rekayasa*, 16(1), pp. 96–106. Available at: <https://doi.org/10.21107/rekayasa.v16i1.17207>.
- Shi, H., Ratering, S., Schneider, B., & Schnell, S. (2025). Microbiome of honey bee corbicular pollen: Factors influencing its structure and potential for studying pathogen transmission. *Science of the Total Environment*, 958, 178107.

- <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.178107>
- Xiong, Z.R., Sogin, J.H. and Worobo, R.W. (2023) “Microbiome analysis of raw honey reveals important factors influencing the bacterial and fungal communities,” (January), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1099522>.