Antibacterial Activities of Bee Pollen Products against *Salmonella typhi* NCTC786 BCC712

Tiana Milanda*, Astri K. Sjafril, Sulistyaningsih

Department of Biological Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universitas Padjadjaran - Indonesia

Submitted 07 August 2021; Revised 11 August 2021; Accepted 12 August 2021; Published 31 August 2021

*Corresponding author: tiana.milanda@unpad.ac.id

Abstract

Bee pollen is the pollen from flowers or the other plant parts collected by worker honey bees from various plants. This product is known to have various pharmacological activities, such as antimicrobial against several Gram positive, Gram negative bacteria and fungi. Until now, there is no information regarding the antibacterial activity of bee pollen against *Salmonella typhi*, the cause of typhoid fever in human. This study aims to determine the antibacterial activity of several bee pollen products from Bandung, West Java, Indonesia against *S. typhi* NCTC786 BCC712. This research was conducted through testing the antibacterial activity of bee pollen products, determining the values of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the most active bee pollen products and determining the comparative value of their antibacterial activity against chloramphenicol. The results showed that the three products had antibacterial activity against *S. typhi* NCTC786 BCC712, with the third product showing the greatest activity. The MIC and MBC of bee pollen product against *S. typhi* NCTC786 BCC712 were 137.5 mg/mL and 140 mg/mL, respectively. The comparative value of the antibacterial activity of the product against chloramphenicol is 1 : 0.0562. This indicates that the third bee pollen against *S. typhi* NCTC786 BCC712 is weaker than chloramphenicol.

Keywords: *Comparative Antibacterial Value, Minimum Bactericidal Concentration, Minimum Inhibitory Concentration*

Aktivitas Antibakteri Produk Polen Lebah terhadap *Salmonella typhi* NCTC786 BCC712

Abstrak

Polen lebah merupakan serbuk sari bunga atau bagian tumbuhan lainnya yang dikumpulkan oleh lebah madu pejantan dari berbagai tumbuhan. Produk ini diketahui memiliki berbagai aktivitas farmakologi, diantaranya sebagai antimikroba terhadap beberapa bakteri Gram positif, Gram negatif dan jamur. Sampai saat ini, belum ada informasi mengenai aktivitas antibakteri polen lebah terhadap *Salmonella typhi*, penyebab demam tifoid pada manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri beberapa produk polen lebah dari Kota Bandung, Jawa Barat, Indonesia terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712. Penelitian ini dilakukan melalui tahap pengujian aktivitas antibakteri produk polen lebah, penentuan nilai Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum (KHTM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) produk polen lebah teraktif dan penentuan nilai banding aktivitas antibakterinya terhadap kloramfenikol. Hasil penelitian menunjukkan ketiga produk mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712, dengan aktivitas terbesar ditunjukkan oleh produk ketiga. KHTM dan KBM dari produk polen lebah terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 masing-masing sebesar 137,5 mg/mL dan 140 mg/mL. Nilai banding aktivitas antibakteri produk tersebut terhadap dengan kloramfenikol sebesar 1 : 0,0562. Hal ini menunjukkan aktivitas antibakteri produk polen lebah ketiga terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 lebih lemah dibanding kloramfenikol.

Kata Kunci: *Konsentrasi Bunuh Minimum, Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum, Nilai Banding Aktivitas Antibakteri*

1. Pendahuluan

Polen lebah merupakan serbuk sari bunga (floral nektar) atau bagian dari tumbuhan lainnya (ekstra floral nektar). Produk ini dikumpulkan oleh lebah madu (*Apis mellifera*) pejalan dari berbagai tumbuhan, lalu ditambahkan komponen yang berasal dari lebah, sehingga membentuk pelet.^{1,2,3,4} Polen lebah diketahui mengandung sekitar 250 senyawa kimia, diantaranya berupa karbohidrat, protein, lipid, vitamin, mineral, antibiotik (inhibin), hormon, enzim, asam organik, minyak atsiri, dan rutin, dengan nilai nutrisi dan terapeutik yang tinggi.^{1,5} Babinska, et al. (2012) menyatakan produk ini juga mengandung berbagai senyawa fenolik, fitosterol, dan flavonoid.⁶

Polen lebah diketahui memiliki berbagai aktivitas farmakologi, seperti analgesik, antiinflamasi, antioksidan, antikarsinogenik, imunostimulan dan imunomodulator. Aktivitas antioksidannya yang tinggi berasal dari kandungan senyawa fenolik dan flavonoid, sehingga mampu melindungi hati dan ginjal dari senyawa toksik dan merangsang regenerasi jaringan yang rusak. Morais, et al. (2011) membuktikan bahwa polen lebah dapat mengobati prostatitis jinak dan dapat mengatasi desensitisasi oral pada anak-anak. Produk ini juga mengurangi risiko aterosklerosis.^{1,7}

Polen lebah juga dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri, antijamur dan antivirus.⁷ Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa produk ini mampu menghambat pertumbuhan beberapa bakteri Gram positif, bakteri Gram negatif dan jamur, diantaranya terhadap *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Enterococcus faecalis*.^{6,8,9,10} Adanya aktivitas antibakteri dan kandungan nutrisinya yang tinggi, membuat polen lebah sering ditambahkan dalam berbagai suplemen¹¹ dan digunakan sebagai ajuvan dalam berbagai terapi.^{12,13}

Sampai saat ini, belum ada informasi mengenai aktivitas antibakteri polen lebah terhadap *Salmonella typhi*. Bakteri ini merupakan penyebab demam tifoid pada manusia. Penyakit ini ditularkan

melalui perantara makanan dan minuman yang terkontaminasi feces atau urin pasien atau pembawa bakteri. Demam tifoid dapat menyebabkan luka, kebocoran dan pendarahan di daerah usus, sehingga menyebabkan infeksi sistemik. Penyakit ini umumnya diobati menggunakan antibiotika berupa kloramfenikol, ampicilin, dan tiamfenikol. Penggunaan antibiotik yang tidak rasional menyebabkan timbulnya galur-galur *S. typhi* yang resisten terhadap antibiotik pilihan yang biasa digunakan.¹⁴

Adanya galur-galur *S. typhi* resisten menyebabkan diperlukannya antibiotik alternatif, termasuk menggunakan polen lebah. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri polen lebah terhadap *S. typhi*, maka dilakukan pengujian aktivitas antibakteri, penentuan nilai Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum (KHTM), nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan penentuan nilai banding aktivitas antibakteri polen lebah terhadap antibiotik pembanding kloramfenikol pada bakteri uji yang sama.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah neraca analitik (Mettler Toledo, AL204, Swiss), otoklaf (Hirayama, Jepang), oven (Mettmert, 400-800, Jerman), lemari es, penangas air (Mettmert, Jerman), inkubator (Sakura IF-4, Jepang), mikropipet volume 10-100 µL (Biohit Proline, Finlandia), mikropipet volume 100-1000 µL (Socorex Acura 825, Swiss), tip mikropipet kuning dan biru dan alat-alat yang umum digunakan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi.

2.2. Bahan

Tiga produk polen lebah diperoleh dari wilayah Kota Bandung, Jawa Barat, Indonesia. Bakteri uji *S. typhi* NCTC786 BCC712 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jawa Barat, Indonesia. Medium yang digunakan adalah Mueller-Hinton Agar/MHA (Oxoid) dan Mueller-Hinton Broth/MHB (Oxoid). Antibiotik pembanding berupa kloramfenikol (PT. Kimia Farma). Bahan lain yang digunakan adalah etanol 70%

(Bratachem), natrium klorida (Merck), larutan standar Mc Farland 0,5, dimetil sulfoksida/DMSO (Merck) dan air suling.

2.3. Prosedur Rinci

Prosedur penelitian meliputi pengujian aktivitas antibakteri produk polen lebah, penentuan nilai KHTM dan KBM produk polen lebah teraktif dan penentuan nilai banding aktivitas antibakteri produk polen lebah teraktif terhadap kloramfenikol.

2.3.1. Pengujian Aktivitas Antibakteri Produk Polen Lebah

Ketiga produk polen lebah diamati secara organoleptis meliputi bentuk, warna, rasa dan bau. Produk-produk tersebut diuji aktivitasnya terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712, yang meliputi tahap penyiapan suspensi bakteri uji dan uji aktivitas antibakteri produk polen lebah menggunakan metode difusi agar.^{2,9}

S. typhi NCTC786 BCC712 diinokulasikan ke permukaan agar miring MHA, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Biakan bakteri uji disuspensikan dalam larutan natrium klorida 0,9% b/v. Kekeruhan suspensi disesuaikan dengan larutan standar Mc Farland 0,5, yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

Sebanyak 20 µL suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam cawan petri steril, lalu ditambahkan 20 mL MHA bersuhu 40-50°C. Campuran dihomogenkan, lalu dibiarkan memadat pada suhu kamar. Medium agar dilubangi menggunakan perforator berdiameter 9 mm. Ketiga produk polen lebah digerus sampai halus. Sejumlah tertentu polen lebah dilarutkan dengan DMSO 2% v/v, sehingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 100, 120, 140, 160, 180, 200 mg/mL. Sebanyak 50 µL dari setiap larutan uji dimasukkan ke masing-masing lubang. Sebagai pembanding, disiapkan MHA dalam cawan petri yang diinokulasi bakteri uji (kontrol positif) dan cawan petri yang berisi MHA saja (kontrol negatif). Seluruh cawan petri diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Aktivitas antibakteri produk polen lebah diketahui dari diameter hambat yang

terbentuk di sekeliling lubang. Diameter hambat tersebut diukur menggunakan jangka sorong, lalu dibandingkan untuk menentukan produk polen lebah teraktif.

2.3.2. Penentuan Nilai KHTM dan KBM Produk Polen Lebah Teraktif

Penentuan KHTM produk polen lebah teraktif terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 dilakukan menggunakan metode pengenceran tabung.⁶ KHTM merupakan konsentrasi minimum suatu senyawa antibakteri yang masih menghambat pertumbuhan bakteri uji. Sejumlah tertentu polen lebah dilarutkan dalam DMSO 2% v/v, sehingga diperoleh larutan stok 142,5 mg/mL. Sebanyak 0,1 mL MHB masing-masing dimasukkan ke dalam 10 tabung reaksi, lalu diberi nomor 1-10. Sebanyak 4,9 mL larutan stok dimasukkan tabung reaksi pertama, dikocok, lalu dipipet sebanyak 4,9 mL untuk dimasukkan ke tabung reaksi kedua. Pengenceran dilakukan seterusnya sampai tabung ke sepuluh, lalu 4,9 mL dari tabung terakhir dibuang. Sebanyak 1 ose bakteri uji masing-masing ditambahkan pada seluruh tabung. Sebagai pembanding, disiapkan tabung berisi 5 mL MHB yang diinokulasi bakteri uji (kontrol positif) dan tabung berisi 5 mL MHB (kontrol negatif). Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. KHTM ditentukan dari konsentrasi tabung uji terakhir yang masih bening.

KBM merupakan konsentrasi minimum senyawa antibakteri yang masih dapat membunuh 99,9% koloni bakteri uji. Untuk menentukan KBM produk polen lebah teraktif, sebanyak satu ose dari masing-masing larutan yang masih bening digoreskan pada 5 mL MHA dalam cawan petri. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Konsentrasi terkecil polen yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri dalam MHA, ditetapkan sebagai nilai KBM.⁶

2.3.3. Penentuan Nilai Banding Aktivitas Antibakteri Produk Polen Lebah Teraktif terhadap Kloramfenikol

Penentuan nilai banding aktivitas antibakteri dilakukan melalui pengujian

aktivitas antibakteri produk polen lebah teraktif dan kloramfenikol terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 menggunakan metode difusi agar.¹⁵ Produk polen lebah teraktif dilarutkan dalam DMSO 2% v/v, sehingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 14.050, 16.020, 18.050, 20.510 dan 22.030 ppm. Kloramfenikol dilarutkan dengan sedikit etanol 70%, lalu ditambahkan air suling, sehingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 25, 50, 75, 100, dan 125 ppm.

Sebanyak 0,4 mL suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam cawan petri berukuran 15 cm, lalu ditambahkan 40 mL MHA bersuhu 40-50°C. Campuran dihomogenkan, lalu dibiarkan memadat pada suhu kamar. Medium agar dilubangi menggunakan perforator berdiameter 9 mm. Sebanyak 50 µL berbagai larutan uji polen lebah dan kloramfenikol masing-masing dimasukkan ke dalam lubang-lubang. Sebagai pembanding, disiapkan MHA yang diinokulasi bakteri uji (kontrol positif) dan medium MHA saja (kontrol negatif) dalam cawan petri. Seluruh cawan petri diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Aktivitas antibakteri produk polen lebah diketahui dari diameter hambat yang diukur menggunakan jangka sorong.

Diameter hambat (mm) produk polen lebah teraktif dipetakan pada sumbu Y dan log konsentrasi (ppm) produk polen lebah teraktif dipetakan pada sumbu X, kemudian ditentukan persamaan garisnya. Dengan cara yang sama, diperoleh persamaan garis untuk kloramfenikol. Nilai banding aktivitas antibakteri diperoleh dengan membandingkan konsentrasi polen lebah teraktif terhadap konsentrasi kloramfenikol, yang menghasilkan diameter hambat yang sama terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712.

3. Hasil

3.1. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Produk Polen Lebah

Dari hasil pengamatan organoleptis, diketahui bahwa ketiga produk polen lebah berbentuk serbuk kuning, berasa pahit dan tidak berbau. Hasil pengujian aktivitas antibakteri produk polen lebah terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 terdapat pada Tabel

1. Dari Tabel 1 diketahui bahwa ketiga produk polen lebah mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712. Produk ketiga mempunyai aktivitas antibakteri paling besar, diikuti dengan produk kedua dan pertama. Pengujian selanjutnya dilakukan terhadap produk ketiga sebagai produk polen lebah teraktif.

3.2. Hasil Penentuan Nilai KHTM dan KBM Produk Polen Lebah Teraktif

Hasil penentuan KHTM produk polen lebah ketiga terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 terdapat pada Tabel 2. Dari Tabel 2 diketahui bahwa KHTM dari produk polen lebah ketiga terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 sebesar 137,5 mg/mL. Hasil penentuan KBM produk polen lebah ketiga terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 terdapat pada Tabel 3. Dari Tabel 3 diketahui bahwa KBM produk polen lebah ketiga terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 sebesar 140 mg/mL.

3.3. Hasil Penentuan Nilai Banding Aktivitas Antibakteri Produk Polen Lebah Teraktif terhadap Kloramfenikol

Hasil pengujian aktivitas antibakteri produk polen lebah ketiga dan kloramfenikol terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 terdapat pada Tabel 4. Dari kurva log konsentrasi (x) produk polen lebah ketiga terhadap diameter hambatnya (y), diperoleh persamaan garis lurus sebesar $y = 37,25x - 134,7$ dengan $R^2 = 0,994$. Dengan cara yang sama, diperoleh persamaan garis lurus kloramfenikol $y = 8,5993x + 9,433$, dengan $R^2 = 0,9823$. Dari kedua persamaan garis lurus tersebut, diketahui nilai banding aktivitas antibakteri produk polen lebah ketiga dengan kloramfenikol terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 sebesar 1 : 0,0562.

4. Pembahasan

Ketiga produk polen lebah yang diperoleh dari wilayah Kota Bandung, Jawa Barat, Indonesia berbentuk serbuk kuning, berasa pahit dan tidak berbau. Hasil ini sesuai dengan penelitian Spulber, et al. (2018) bahwa polen lebah memiliki variasi warna dari kuning muda sampai merah tua dan ungu,

Tabel 1. Hasil pengujian aktivitas antibakteri produk polen lebah terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712

No produk	Konsentrasi (mg/mL)	Rata-rata diameter hambatan (mm)
1	200	19,05
	180	18,93
	160	18,57
	140	18,02
	120	-
	100	-
2	200	19,54
	180	19,20
	160	18,96
	140	18,40
	120	-
	100	-
3	200	25,54
	180	23,20
	160	21,54
	140	19,73
	120	-
	100	-

Keterangan : (-) : Tidak ada diameter hambatan

namun kebanyakan berwarna kuning.⁹

Ketiga produk polen lebah mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712. Produk ketiga mempunyai aktivitas antibakteri paling besar, diikuti dengan produk kedua dan pertama. Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan polen lebah memiliki aktivitas antibakteri, antijamur dan antivirus.⁷ Fatrcova-Sramkova, et al. (2013) menunjukkan adanya aktivitas antibakteri polen lebah terhadap *S. aureus*

CCM 3953 dan *S. enterica* CCN 4420.⁸ Mohdaly, et al. (2015) menunjukkan adanya aktivitas antibakteri polen lebah terhadap *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enterica* dan *E. coli*.⁶ Spulber, et al. (2018) menunjukkan ekstrak etanol polen lebah juga memiliki aktivitas terhadap *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 dan *E. faecalis* ATCC 29212, dengan aktivitas terbesar terhadap *S. aureus* ATCC 29213 dan *E. faecalis* ATCC.⁹

Tabel 2. Hasil penentuan KHTM produk polen lebah ketiga terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712

Konsentrasi produk (mg/mL)	Pertumbuhan <i>S. typhi</i> NCTC786 BCC712
120,0	+
122,5	+
125,0	+
127,5	+
130,0	+
132,5	+
135,0	+
137,5	-
140,0	-

Keterangan : (+) : ada pertumbuhan koloni (-) : Tidak ada pertumbuhan koloni

Tabel 3. Hasil penentuan KBM produk polen lebah ketiga terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712

Konsentrasi produk (mg/mL)	Pertumbuhan <i>S. typhi</i> NCTC786 BCC712
137,5	+
140,0	+
142,5	-

Keterangan : (+) : ada pertumbuhan koloni (-) : Tidak ada pertumbuhan koloni

KHTM produk polen lebah ketiga terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 sebesar 137,5 mg/mL. KHTM tersebut lebih besar dibanding KHTM produk polen lebah dari Mesir terhadap bakteri Gram positif, yaitu 0,3 mg/mL untuk *L. monocytogenes* dan 0,78mg/mL untuk *S. aureus*. KHTM tersebut juga lebih besar dari KHTM produk yang sama terhadap bakteri Gram negatif, yaitu 1-1,35 mg/mL untuk *E.coli* dan *S. enterica*.⁷ Penelitian Khinder, et al. (2013) juga menunjukkan KHTM sebesar 0,32 mg/mL untuk *E. coli*.¹⁶ Adanya perbedaan hasil ini disebabkan adanya perbedaan senyawa kimia yang terkandung dalam polen. Perbedaan ini disebabkan dari adanya variasi spesies tumbuhan sebagai sumber polen, daerah geografis dan kondisi lingkungan tempat tumbuhan, termasuk perbedaan jenis tanah. Perbedaan hasil ini juga disebabkan bakteri uji yang digunakan berbeda.^{7,17,18,19,20,21}

Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan aktivitas antibakteri polen lebah lebih besar besar terhadap bakteri Gram positif dibanding bakteri Gram negatif.^{9,16} Hal ini disebabkan bakteri Gram negatif

memiliki dinding sel dengan struktur yang lebih kompleks. Salah satu komponen penyusun dinding sel, yaitu polisakarida, menentukan antigenisitas, toksisitas dan patogenisitas bakteri tersebut. Penyebab lainnya adanya pompa multidrug resistant pada bakteri Gram negatif, yang mengeluarkan racun amfipatik melintasi membran luar. Kelompok bakteri ini juga memiliki jumlah lipid yang lebih tinggi dibandingkan bakteri Gram positif.^{7,9}

Nilai banding aktivitas antibakteri produk polen lebah ketiga dengan kloramfenikol terhadap bakteri uji yang sama adalah sebesar 1 : 0,0562. Hal tersebut menunjukkan untuk menghasilkan diameter hambat yang sama, 1 ppm produk polen lebah ketiga sebanding dengan 0,0562 ppm kloramfenikol.

5. Kesimpulan

Ketiga produk polen lebah dari wilayah Kota Bandung, Jawa Barat, Indonesia mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712, dengan aktivitas terbesar pada produk ketiga. KHTM dan KBM dari produk polen lebah ketiga terhadap

Tabel 4. Hasil pengujian aktivitas antibakteri produk polen lebah ketiga dan kloramfenikol terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712

Bahan	Konsentrasi/C (ppm)	Log C	Diameter Hambat (y)
Polen Lebah	14.05	4,14760	19,95
	16.02	4,20460	21,73
	18.05	4,25640	23,62
	20.51	4,31190	25,71
	22.03	4,34300	27,30
Kloramfenikol	25,00	1,39794	21,80
	50,00	1,69897	24,50
	75,00	1,87506	26,48
	100,00	2,00000	26,67
	125,00	2,09691	27,89

S. typhi NCTC786 BCC712 masing-masing sebesar 137,5 mg/mL dan 140 mg/mL. KHTM dari produk ini lebih besar dibandingkan penelitian-penelitian sebelumnya. Adanya perbedaan hasil ini disebabkan adanya perbedaan senyawa yang terkandung dalam dalam polen dan perbedaan bakteri uji yang digunakan. Perbedaan ini disebabkan dari adanya variasi spesies tumbuhan sebagai sumber polen, daerah geografis dan kondisi lingkungan tempat tumbuhan, termasuk perbedaan jenis tanah. Nilai banding aktivitas antibakteri produk polen lebah ketiga dengan kloramfenikol terhadap bakteri uji yang sama adalah sebesar 1 : 0,0562. Hal tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri polen terhadap *S. typhi* NCTC786 BCC712 lebih lemah dibanding kloramfenikol.

Daftar Pustaka

1. Babinska I, Kleczek K, Szarek J, Makowski W. Modulating effect of propolis and bee pollen on chicken breeding parameters and pathomorphology of liver and kidneys in the course of natural infection with *Salmonella enteritidis*. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2012;56:3-8.
2. Mărgăoan R, Mărghițaș LA, Dezmirean DS, Bobis O, Mihai CM, Physical-chemical composition of fresh bee pollen from Transylvania. *Bulletin UASVM Animal Sci Biotechnol*. 2012;69(1-2): 351-355.
3. Bogdanov S. Pollen: nutrition, functional properties, health: A review [diunduh 2014]. Tersedia dari <http://www.bee-hexagon.net>.
4. Nogueira C, Iglesias A, Xesus F, Estevinho LAM, Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach, *International J Mol Sci*. 2012;13(9):11173- 11187.
5. Chantarudee A, Phuwapraisirisan P, Kimura K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, et al. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand, *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012;12(45):1472, 6882.
6. Mohdaly AAA, Mahmoud AA, Roby MHH, Smetanska I, Ramadan MF. Phenolic extract from propolis and bee pollen composition, antioxidant and antibacterial activities, *J Food Biochem*. 2015;39:538-547.
7. Morais M, Moireira L, Feas X, Estevinho LM. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(5):110, 1096.
8. Fatrcova-Sramkova K, Nozkova J, Kacaniova M, Mariassyova M, Rovna K, Stricik M. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *J Environ Sci Health. Part B. Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*. 2013;48(2):133-138.
9. Spulber R, Dogaroglu M, Babeanu N, Popa O. Physicochemical characteristics of fresh bee pollen from different botanical origins. *Romanian Biotechnol Letters*. 2018;23(1):13357-13365.
10. Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feas X, Estevinho LM, Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory, *Food Chem Toxicol*. 2014;63:233-239.
11. Glusac JR, Stijepic MJ, Milanovic SD, Milosevic DMD. Physicochemical properties of honeybee pollen enriched acidophilus milk and probiotic yoghurt, *Biblid*. 2015;46:45-54.
12. Sun L, Guo Y, Zhang Y, Zhuang Y, Antioxidant and anti-tyrosinase activities of phenolic extracts from rape bee pollen and inhibitory melanogenesis by cAMP/MITF/TYR pathway in B16 mouse melanoma cells. *Front Pharmacol*. 2017;8:104.
13. Salles J, Cardinault N, Patrac V, Berry A, Giraudet C, Collin ML, et al. Bee pollen improves muscle protein and energy metabolism in malnourished old rats through interfering with the mtor signaling pathway and mitochondrial activity. *Nutrients*. 2014;6(12):5500-5516.
14. Rinayanti A, Rahayu ST. The antibacterial effects of essential oil from galangal

- rhizome *Alpinia galanga* (Linn.) pierreon rat (*Rattus novergicus* L.) were infected by *Salmonella typhi*. Asian J Pharm Clin Res. 2016;9(Suppl 1):189-193.
15. Milanda T, Barliana MI, Rosidah, Kusuma ASW. Antibacterial activities of Parijoto (*Medinilla speciosa*) against clinical isolates of *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae*. Pharmacology and Clinical Pharmacy Research. 2021;6(1): 25-34.
 16. Khider M, Elbanna K, Mahmoud A, Owayss AA. Egyptian honeybee pollen as antimicrobial, antioxidant agents, and dietary food supplements. Food Sci Biotechnol. 2013;22:1461–1469.
 17. Kai Y, Dan W, Xingqian Y, Donghong L, Jianchu C, Peilong S. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. J Agric Food Chem. 2013;61(3):708-718.
 18. Xesus F, Pilar MVT, Estevinho L, Seijas JA, Iglesias A. Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. Molecules. 2012;17(7):8359-8377.
 19. Morgano MA, Martins MCT, Rabonato LC, Milani RF, Yotsuyanagia K. Amaya DBR. A comprehensive investigation of the mineral composition of Brazilian bee pollen: Geographic and seasonal variations and contribution to human diet. J Braz Chem Soc. 2012;23(4):727-736.
 20. Araujo SJ, Chambo ED, Costa MA, Da Silva SMPC, De Carvalho CAL, Estevinho LM. Chemical composition and biological activities of mono- and heterofloral bee pollen of different geographical origins. Int J Mol Sci. 2017;18(5):921.
 21. Solgajova M, Nozkova J, Kadakova M. Quality of durable cookies enriched with rape bee pollen. J Central Euro Agri. 2014;15(1):24-38.