AKTIVITAS ANTIBAKTERI HIDROGEL MADU KELULUT (*Heterotrigona itama*) TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Alya Fatima Azzahra[1], Hendra Wana Nur'amin[2], Noor Muthmainnah[3], Nanang Miftah Fajari[2], Rahmiati[3], Isnaini[4]

[1]Program Studi Kedokteran Program Sarjana, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia
[2]Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia
[3]Departemen Mikrobiologi dan Parasitologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia
[4]Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia

Email korespondensi: alyafatimahazzahra13@gmail.com

Abstract: Diabetic foot ulcers are defined as foot ulcerations related to neuropathy in diabetic patients. *One of the topical therapies for diabetic foot ulcers use hydrogel antiseptics, namely Cutimed® Gel. Alternative topical therapies can use natural antibacterials, namely kelulut honey (Heterotrigona itama) which is used by the people of South Kalimantan to treat wounds because contains active compounds, sugar content, honey acidity, flavonoids, alkaloids and tannins. The purpose of this study was determine, there was a different antibacterial activity in kelulut honey hydrogel (Heterotrigona itama) concentrations of 20%, 25% and control treatment against S. aureus ATCC 25923 based on the diameter of the inhibition zone. This study used a true experimental method with a posttest only with control group design. The treatments tested were concentrations of 20%, 25%, and positive control, Cutimed® Gel and negative control sterile distilled water with 6 repetitions. The results One-Way ANOVA and Post hoc Duncan tests found significant differences in each test treatment with p <0.05. The concentration treatments of 20% and 25% produced inhibition zone diameters of 14.18 mm and 18.19 mm. The results showed that was different antibacterial activity in each test against S.aureus, the strongest antibacterial activity shown by the 25% concentration treatment.*

Keywords: *Antibacterial, hydrogel, stingless bee honey (Heterotrigona itama), Staphylococcus aureus*

Abstrak: Luka kaki diabetes didefinisikan sebagai ulserasi kaki terkait neuropati pasien diabetes. Salah satu terapi topikal luka kaki diabetes dapat menggunakan antiseptik hidrogel yaitu Cutimed® Gel. Alternatif terapi topikal dapat menggunakan antibakteri alami yaitu madu kelulut (*Heterotrigona itama*) yang dimanfaatkan masyarakat Kalimantan Selatan untuk mengobati luka karena mengandung senyawa aktif yaitu kandungan gula, keasaman madu, flavonoid, alkaloid dan tanin. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui apakah terdapat aktivitas antibakteri yang berbeda pada hidrogel madu kelulut (*Heterotrigona itama*) konsentrasi 20%, 25% dan perlakuan kontrol terhadap *S. aureus* ATCC 25923 berdasarkan diameter zona hambat. Penelitian ini menggunakan metode *true experimental* dengan rancangan *posttest only with control group design*. Perlakuan yang diujikan adalah konsentrasi 20%, 25%, dan kontrol positif yaitu Cutimed® Gel serta kontrol negatif *aquadest steril* dengan pengulangan uji sebanyak 6 kali. Hasil penelitian uji *One-Way ANOVA* dan *Post hoc Duncan* ditemukan perbedan nyata pada tiap perlakuan uji dengan p <0,05. Perlakuan konsentrasi 20% dan 25% menghasilkan diameter zona hambat 14,18 mm dan 18,19 mm. Hasil penelitian menunjukkan terdapat aktivitas antibakteri yang berbeda pada tiap perlakuan uji terhadap *S.aureus* dengan aktivitas antibakteri terkuat ditunjukkan oleh perlakuan konsentrasi 25%.

Kata-kata kunci: antibakteri, hidrogel, madu kelulut (*Heterotrigona itama), Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Bakteri merupakan mikroorganisme yang dapat menjadi patogen penyebab infeksi pada tubuh.[1] Salah satu reaksi infeksi bakteri pada tubuh yang dapat timbul salah satunya terbentuk pus pada luka. Timbulnya infeksi bakteri pada luka sering dialami oleh pasien Diabetes Melitus (DM), karena pasien DM rentan mengalami luka dan akan cepat menjadi ulkus kaki diabetes.[2,3] Penelitian melaporkan bahwa bakteri gram positif menjadi penyebab terbanyak dalam infeksi ulkus kaki diabetikum, seperti jenis *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).[2] Data-data distribusi frekuensi pemeriksaan kultur pus pada pasien ulkus diabetikum di RSUD Ulin Banjarmasin periode 2018-2020 menunjukkan bahwa isolat gram positif sebanyak 21 spesimen (31,8%) dan yang paling banyak ditemukan adalah *S. aureus* (24%).[4]

Bakteri *S. aureus* berbentuk rantai kokus pendek, tidak motil dan patogenitasnya berasal dari hasil ekspresi faktor virulensi yang berbeda seperti toksin, imunodulator, dan eksoenzim mengakibatkan terbentuknya biofilm salah satunya pada jaringan mukosa.[5,6] Jika luka infeksi bakteri tidak dilakukan perawatan dengan benar maka akan muncul tanda-tanda infeksi pada kulit yang parah seperti peradangan, pembusukan, dan pembentukaan abses bernanah.[7–9]

Pengobatan luka infeksi bakteri biasanya menggunakan antibiotik sintetik.[10] Selain itu, perawatan luka infeksi juga perlu dilakukan seperti menggunakan antiseptik karena dapat menghentikan berkembangnya mikroba penyebab infeksi luka dan menghasilkan sedikit resistensi antimikroba.[11,12] Pada luka infeksi bakteri dapat didukung dengan sediaan antiseptik berbentuk hidrogel. Hidrogel merupakan obat topikal bersifat tidak berminyak, tiksotropi, mudah menyebar dan bersifat emolien.[13] Salah satu jenis antiseptik yakni Cutimed® *Gel*. Cutimed® *Gel* merupakan *dressing* luka antibakteri melalui tindakan fisik, tanpa bahan aktif kimia dilapisi dengan turunan asam lemak *dialkilkarbamoilklorida* (DACC), menghasilkan balutan dengan sifat hidrofobik dengan mengikat permukaan ekstraseluler hidrofobik bakteri secara permanen sehingga dapat mencegah bakteri bereproduksi atau melepaskan racun berbahaya.[14]

Antiseptik alternatif berbahan alami seperti madu diketahui memiliki efek antibakteri sehingga banyak dimanfaatkan untuk mengatasi luka infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus*. Kandungan fruktosa dan glukosa pada madu sebagai proses osmosis membuat sel bakteri kehilangan banyak air (dehidrasi), dan pada akhirnya bakteri mengalami lisis dan mati.[10,15]

Salah satu jenis madu yang diyakini memiliki khasiat dan dimanfaatkan masyarakat khususnya Kalimantan Selatan untuk mengobati luka adalah madu kelulut.[15] Menurut Hamad madu ini berasal dari lebah *Trigona spp*, dikenal dengan nama madu lebah kelulut. Madu kelulut berperan sebagai nutrisi dalam mempercepat penyembuhan luka, *debridement* luka, antiinflamasi, antibakteri, apoptosis, dan antioksidan.[16–18]

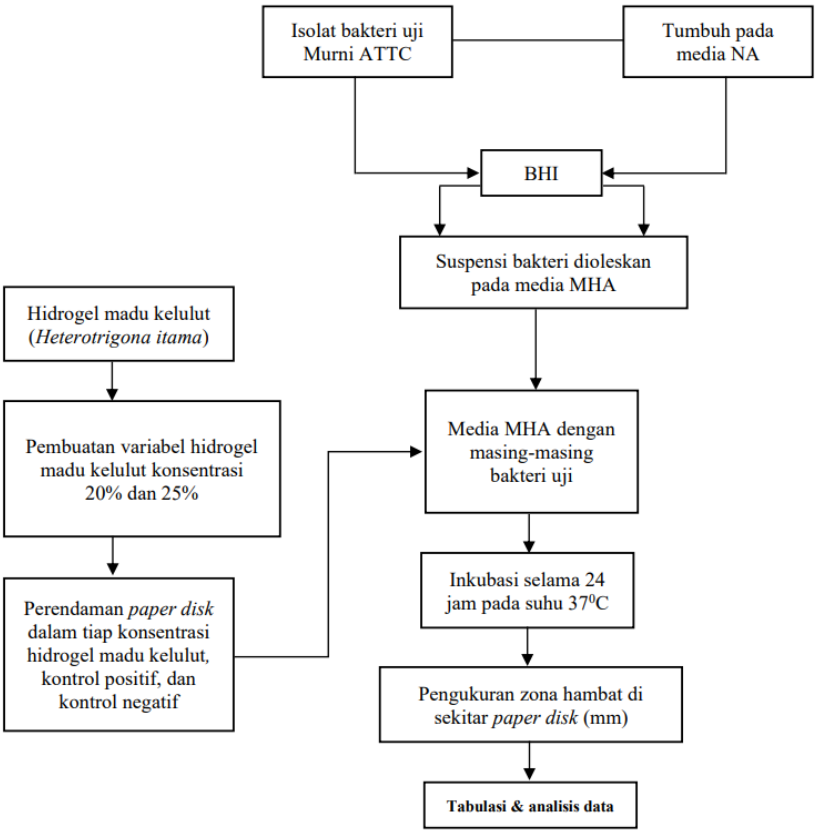
Aktivitas antibakteri pada suatu jenis madu dapat berbeda-beda dipengaruhi oleh konsentrasi.[19] Hasil uji dilusi madu kelulut terhadap *S. aureus* diketahui Kadar Bunuh Minimal (KBM) pada 25%.[20] Hasil uji madu multi flora (madu akasia, madu mente, madu randu, dan madu sono) mulai menghambat pada 25% dan daya hambat terbesar pada 100%.[19] (Lampiran 1) Hasil uji homogenitas, daya lekat dan stabilitas baik pada sediaan gel *carbopol* dan madu kelulut konsentrasi 20% serta 25%.

Uraian diatas menunjukkan adanya kemampuan aktivitas antibakteri pada madu kelulut sebagai antiseptik perawatan luka kaki diabetik. Namun, belum ada dilakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri

pada konsentrasi 20% dan 25%. Oleh karena itu, dilakukan uji aktivitas antibakteri hidrogel madu kelulut (*Heterotrigona itama*) terhadap *S. aureus* ATCC 25923 berdasarkan diameter zona hambat konsentrasi 20% dan 25%.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan *true experimental design* dengan "*Post Test Only Control Group Design*" untuk menganalisis aktivitas antibakteri hidrogel madu kelulut terhadap *S. aureus* ATCC 25923 berdasarkan diameter zona hambat 20% dan 25%.[21,22] Konsentrasi perlakuan hidrogel madu kelulut yang diujikan adalah 20%, 25%, dan kontrol positif yaitu Cutimed® *Gel* serta kontrol negatif yaitu *aquadest* steril. Jumlah pengulangan tiap kelompok dilakukan sebanyak 6 kali, dihitung berdasarkan rumus *Federer*.[23]



Gambar 1. Tahapan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan persiapan isolat bakteri uji yang kemudian dilakukan peremajaan bakteri pada media *nutrient agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni hasil pembentukkan diambil 1 ose untuk dimasukkan ke dalam media *brain heart infusion* (BHI) yang telah dibuat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam**.** Kemudian, dilakukan penambahan *aquadest* steril untuk mendapatkan kekeruhan yang sama dengan larutan standar *Mc Farland* 0,5 (setara 1,5 X 10^8 CFU/mL).[19]

Suspensi bakteri di *swab* menggunakan kapas lidi steril lalu dioleskan pada media *Mueller Hinton* Agar (MHA). Setelah digunakan, kapas lidi diletakkan ke dalam wadah kaca berisi larutan antiseptik. *Paper disk* akan direndam ke dalam masing-masing perlakuan. Dalam perlakuan hidrogel madu kelulut (*Heterotrigona itama*) konsentrasi

20% dan 25% direndam dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dalam perlakuan kontrol positif berupa Cutimed® gel, dan kontrol negatif berupa *aquadest* steril direndam selama 2 jam. Semua perlakuan kemudian diletakkan pada media MHA menggunatan pinset. Selanjutnya, semua media pengujian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil inkubasi akan memperlihatkan adanya besaran diameter zona hambat di sekitar daerah pertumbuhan bakteri uji pada *paper disk*. Kemudian, dilakukan pengukuran diameter zona hambat (zona bening) pada masing-masing media.[19]

pertumbuhan bakteri uji menggunakan *calliper mistar* (mm). Data hasil diameter zona hambat dianalisis statistik dengan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versi 26.0 *for Mac*. Data yang diperoleh diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kecil (<50), kemudian dilakukan uji homogenitas varian menggunakan uji *Levene's test*. Data terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan analisis parametrik secara *One-way ANOVA* pada tingkat kepercayaan 95% (α = 0,05). Hasil uji *One-way ANOVA* bermakna, maka dilanjutkan dengan uji *Post-hoc Duncan* untuk mengetahui salah satu perlakuan yang berbeda makna dibandingkan dengan perlakuan lainnya.[24,25]

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini telah mendapat persetujuan layak etik dengan nomor 109/KEPK-FKIK ULM/EC/VII/2024 oleh komisi etik penelitian FKIK ULM (Lampiran 7). Pengujian sampel gel *carbopol* + madu kelulut yaitu uji homogenitas, daya lekat, dan stabilitas, serta uji daya sebar telah dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKIK ULM Banjarbaru (Lampiran 1). Metode uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram dengan menggunakan resapan dari zat antibakteri yang diuji pada kertas cakram (*paper disc*) untuk menilai sensitivitas bakteri terhadap zat antibakteri tersebut dengan zona hambat. Penilaian zona hambat bakteri terhadap bakteri uji diperoleh dari diameter daerah atau zona bening yang berada di sekitar kertas cakram pada media *Mueller Hinton* Agar (MHA) Hasil tabulasi data dari pengukuran diameter zona hambat (Lampiran 1).[19] Hasil tabulasi data dari pengukuran diameter zona hambat dapat dilihat pada tabel 1. Hasil pengukuran rerata diameter zona hambat dan standar deviasi (SD) dari beberapa perlakuan dapat dilihat pada tabel 2

Tabel 1. Tabel Pengukuran Aktivitas Antibakteri Hidrogel Madu Kelulut (*Heterotrigona itama*) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

No.	Kelompok Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)						Rata-rata (mm)
		1	2	3	4	5	6	
1	Konsentrasi 20%	14,2	14	14,1	14,2	14,1	14,2	14,1
2	Konsentrasi 25%	18,2	18,1	18,1	18,2	18,2	18,2	18,19
3	Kontrol Positif	0,67	0,6	0,65	0,68	0,62	0,62	0,64
4	Kontrol Negatif	0	0	0	0	0	0	0

Tabel 2. Rerata Diameter Zona Hambat dan Standar Deviasi Aktivitas Antibakteri Hidrogel Madu Kelulut (*Heterotrigona itama*) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Perlakuan	Rerata±SD (mm)
Konsentrasi 20%	14,18±0,04[c]
Konsentrasi 25%	18,19±0,05[b]
Kontrol +	0,64±0,03[a]

Keterangan:

a) Nilai yang tertera pada tabel adalah nilai rerata±SD dari enam kali pengulangan.
b) Huruf *superscript* yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata pada uji *Duncan*.

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel 2. menunjukkan adanya perbedaan rata-rata zona hambat hidrogel madu kelulut konsentrasi 20%, 25%, kontrol positif dan kontrol negatif terhadap bakteri *S.aureus*. Seluruh perlakuan hidrogel madu kelulut memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus.* Zona hambat ditunjukkan oleh perlakuan hidrogel madu kelulut 25% lebih besar yakni 18,19 mm dibandingkan dengan hidrogel madu kelulut 20% dengan zona hambat sebesar 14,17 mm terhadap *S.aureus.* Zona hambat yang terbentuk dari perlakuan kontrol positif (Cutimed® *Gel*) terhadap *S.aureus* sebesar 0,64 mm. Kontrol negatif (*aquadest)* tidak membentuk zona hambat terhadap bakteri uji.

Menurut Davis dkk hasil uji diameter zona hambat ini menunjukkan bahwa hidrogel madu kelulut (*Heterotrigona itama*) konsentrasi 20% dan 25% dikategorikan sebagai antibakteri kuat dan kontrol positif berupa Cutimed® gel dikategorikan sebagai antibakteri lemah.

Tahap berikutnya untuk mengetahui sebaran data hasil penelitian ini apakah terdisitribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kecil (<50) dan uji homogenitas varian dengan uji *Levene's test*. Berdasarkan uji normalitas pada data perlakuan hidrogel madu kelulut dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) terhadap bakteri uji diperoleh nilai p >0,05, yang berarti semua data pada penelitian ini terdistribusi normal. Dapat dilihat pada tabel 3

Tabel 3. Hasil Uji Normalitas Sebaran Data Aktivitas Antibakteri Hidrogel Madu Kelulut (*Heterotrigona itama*) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Perlakuan	*Shapiro-Wilk*
	Signifikansi
Konsentrasi 20%	0,021
Konsentrasi 25%	0,740
Kontrol +	0,085

Hasil uji homogenitas data penelitian ini didapatkan nilai p >0,05, yang artinya sebaran data dari penelitian ini homogen atau dapat dikatakan tidak adanya perbedaan signifikan dalam varians antar kelompok. Hasil uji homogenitas dapat dilihat pada tabel 4.

Setelah asumsi normal dan homogenitas varians terpenuhi, dilanjutkan dengan analisis parametrik menggunakan uji *One-Way* ANOVA untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna dari masing-masing perlakuan terhadap *S.aureus*. Hasil didapatkan nilai signifikansi 0,000 (p <0.05) yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna di antara perlakuan yang telah diuji atau ada perbedaan yang signifikan dalam diameter yang dihasilkan oleh masing-masing konsentrasi sehingga dapat dikatakan bahwa perubahan konsentrasi mempengaruhi diameter secara bermakna, dan setiap pasangan konsentrasi yang dibandingkan menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam pengaruhnya terhadap diameter.[25,26] Hasil analisis uji *One-Way ANOVA* (lampiran 5). Hasil uji *One-Way ANOVA* dapat dilihat pada tabel 5.

Analisis data dilanjutkan dengan uji *Post-hoc Duncan* pada tingkat kepercayaan 95% untuk mengetahui perlakuan mana yang

memberikan hasil berbeda bermakna atau berbeda secara signifikan satu sama lain dalam hal diameter yang dihasilkan dan standar deviasi (SD) dari beberapa perlakuan dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 4. Hasil Uji Homogenitas Sebaran Data Aktivitas Antibakteri Hidrogel Madu Kelulut (*Heterotrigona itama*) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

	Levene Statistic	Signifikansi
Based on Mean	0,895	0,429
Based on Median	0,605	0,559
Based on Median and with adjusted df	0,605	0,565
Based on trimmed mean	0,853	0,446

Tabel 5. Hasil Uji *One-Way ANOVA* Sebaran Data Aktivitas Antibakteri Hidrogel Madu Kelulut (*Heterotrigona itama*) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

	Nilai Uji *One-way ANOVA*	
	Nilai F	Signifikansi
Between Groups	296382,545	0,000

Tabel 6. Hasil Uji *Post-hoc Duncan* Sebaran Data Aktivitas Antibakteri Hidrogel Madu Kelulut (*Heterotrigona itama*) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Perlakuan	Nilai Uji Lanjutan Duncan		
	Subset		
	1	2	3
Kontrol +	0,3667		
Konsentrasi 20%		2,4271	
Konsentrasi 25%			2,7950

Berdasarkan tabel 6 menggambarkan bahwa terdapat perbedaan bermakna dari masing-masing perlakuan hidrogel madu kelulut terhadap bakteri *S.aureus*. Seluruh perlakuan hidrogel madu kelulut memberikan efek berbeda bermakna terhadap perlakuan hidrogel madu kelulut lainnya.

Zona hambat yang terbentuk pada pertumbuhan bakteri *S.aureus* menunjukkan bahwa hidrogel madu kelulut memiliki kandungan zat antibakteri serta kandungan seperti gula, asam, dan zat antibakteri.[27] Hal ini sesuai dengan hasil skrining fitokimia pada penelitian Afrilliah N dkk menyatakan bahwa adanya kandungan antibakteri pada madu kelulut yaitu flavonoid, tannin dan alkaloid.[27,28] Kandungan flavonoid dengan merusak metabolisme dari bakteri mengalami denaturasi dari dinding sel serta membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang membuat keutuhan membran sel bakteri tersebut terganggu.[29,30] Senyawa alkaloid pada madu kelulut juga terbukti dapat membunuh bakteri dengan cara mengganggu penyusunan dinding peptidoglikan dari bakteri mengakibatkan dinding sel bakteri tidak utuh. Senyawa alkaloid juga melakukan disrupsi regulasi gen virulens, menginhibisi enzim sortase berperan dalam perlekatan protein pada permukaan dinding sel bakteri, serta menginhibisi sistem sekresi pada bakteri.[30,31] Sedangkan senyawa tanin pada madu ini berkerja dengan cara mengganggu pembentukan sel bakteri dengan menghambat enzim *reverse transcriptase* dan DNA topoisomerase sehingga pembentukan dinding sel bakteri kurang sempurna atau bahkan tidak dapat terbentuk.

Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena sehingga sel bakteri akan mati.[30,32]

Selain itu, madu kelulut pada penelitian Mama M dkk madu memiliki kandungan dominan yaitu glukosa oksidase yang mengubah glukosa menjadi glukonolakton dan kemudian menjadi hidrogen peroksida yang dapat mengurangi eskpresi eksotoksin pada *S.aureus* seperti toksin eksfoliatif, TSST-1, dan enterotoksin.[33,34] Pada intensitas warna madu juga mempengaruhi aktivitas antibakteri karena menunjukkan adanya pigmen seperti flavonoid dan karotenoid, yang terkenal berkontribusi pada aktivitas antioksidannya. Antioksidan yang terkandung dapat mempengaruhi aktivitas enzim koagulase yang menjadi salah satu faktor virulensi pada bakteri *S.aureus*, sehingga tidak terjadi migrasi neutrofil ke tempat yang terinfeksi.[34–36] Selain itu, faktor virulensi *S. aureus* yaitu toksin eksfoliatif dapat dihambat produksinya oleh pigmen yang ada pada karotenoid madu bernama stafiloeksantin sehingga mengurangi stres oksidatif yang bisa meningkatkan virulensi bakteri.[34,36,37] Madu yang memiliki pH asam 3,2–4,5 digunakan untuk menghambat banyak organisme patogen dan meningkatkan proses penyembuhan luka melalui epitelisasi serta larutan jenuh yang menghambat pertumbuhan bakteri terutama karena osmolalitasnya yang tinggi.[33]

Selain itu kandungan dominan yang tinggi akan antioksidan yakni asam fenolat, asam organik, hidrogen peroksida yang terbentuk melalui aktivitas enzim glukosa oksidase dapat merusak DNA, membran sel dan menghambat pertumbuhan bakteri. Kandungan lainnya yang berkontribusi pada sifat antimikroba dan antioksidan madu kelulut yakni Peptida Antibakteri, *Methylglyoxal* dan *Bee defensin-1* dapat melemahkan membran sel bakteri dan mengganggu proses metabolisme.[38]

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan rerata diameter zona hambat setiap konsentrasi hidrogel madu kelulut terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Pada hidrogel madu kelulut konsentrasi 20% memiliki kadar madu kelulut yang lebih tinggi namun memiliki zona hambat yang lebih kecil sedangkan hidrogel madu kelulut konsentrasi 25% memiliki kadar madu kelulut yang lebih rendah namun menghasilkan zona hambat yang lebih besar. Perbedaan ini terjadi karena kandungan air pada hidrogel madu kelulut konsentrasi 20% lebih rendah sehingga keterbatasan dalam mempertahankan kelembapan karena terjadi proses evaporasi yang lebih cepat membuat lapisan hidrogel ikut mengering lebih cepat, sehingga *S.aureus* mudah berkembang biak pada kondisi kering.[39,40] Sedangkan pada hidrogel madu kelulut konsentrasi 25% memiliki kandungan air lebih tinggi membuat lingkungan yang lembap mempengaruhi difusi nutrisi atau menggangu metabolisme bakteri. Selain itu, struktur hidrogel yang ditambahkan lebih besar air (25%) dapat meningkatkan kemampuan hidrogel untuk menyerap dan mempertahan air serta mempengaruhi kemampuan penghalang hidrogel terhadap bakteri *S.aureus*.[39,40]

Kandungan gula yang tinggi pada madu kelulut juga mempengaruhi sifat osmotik, karena ketika konsentrasi air lebih tinggi (25%), efek osmotik madu kelulut konsentrasi 25% cenderung lebih kuat, membuat lebih banyak medium mengaktifkan enzim-enzim antimikroba dan antioksidan di dalam madu kelulut [41]

Kandungan total fenolik yang mengandung antioksidan pada madu kelulut dapat dipengaruhi oleh suhu. Pada saat proses pembuatan hidrogel madu kelulut dan perendaman *paper disk* dilakukan ke dalam hidrogel madu kelulut pada 37°C selama 24 jam untuk mendapatkan hasil diameter zona hambat karena adanya peningkatan suhu sehingga mempengaruhi tingkat fenoliknya.

[36,42] Hal ini didukung pada penelitian Ramlan N dkk menunjukkan nilai total fenolik meningkat pada madu lebah tanpa sengat spesies *Heterotrigona itama* pada suhu 45°C.[42] selain itu penelitian terbaru oleh Majid M dkk, madu lebah tanpa sengat kaya akan senyawa fenolik asam klorogenat (CLA) dan asam p-kumara bertindak sebagai antioksidan berkontribusi pada total fenolik.[43]

Studi lain oleh Braghini dkk menggunakan periode pemanasan singkat pada suhu tinggi yakni 90°C dan 95°C, menyatakan bahwa peningkatan total fenolik setelah perlakuan panas. Senyawa fenolik individual seperti asam p-coumaric, asam ferulat, asam klorogenat, dan asam protocatechuic ditemukan meningkat.[44]Beberapa madu menimbulkan reaksi fenolik yang berbeda-beda bahkan ada memerlukan pemanasan pada suhu yang sangat tinggi atau waktu yang lama , dalam pemuatan kandungan fenolik yang lebih tinggi.[42]

Kandungan flavonoid juga berperan penting dalam menghasilkan sifat antioksidan pada madu kelulut. Pada penelitian Ramlan N dkk pada sampel madu jenis *Heterotrigona itama* meningkat secara signifikan ($p > 0,05$) dengan peningkatan suhu terutama pada suhu 65°C.[42] Peningkatan kandungan flavonoid mungkin terjadi karena senyawa flavonoid tertentu diaktifkan karena panas sehingga meningkatkan bioaksesibilitasnya. Temuan ini sesuai dengan penelitian Braghini dkk yang melaporkan munculnya senyawa flavonoid, rutin, dan isoquercetin dalam madu Tetragonisca angustula setelah dipanaskan pada suhu tinggi 60 ◦C hingga 71°C.[42,44]

Hal ini juga sesuai dari hasil penelitian El-Kased RF dkk yang menunjukkan bahwa nilai zona hambat tertinggi pada hidrogel madu kitosan dengan konsentrasi 25% pada *S.aureus* dibandingkan dengan konsentrasi lainnya yang mengandung lebih banyak madu kitosan sebesar 20,2 mm.[45] Menurut Davis dkk menyatakan bahwa diameter zona hambat 11-20 mm dikategorikan sebagai antibakteri kuat sehingga konsentrasi 20% dan 25% pada hidrogel madu kelulut dengan rata-rata diameter zona hambat 14,17 mm dan 18,19 mm termasuk kategori kuat dalam menghambat bakteri. Hal ini menandakan bahwa hidrogel madu kelulut sudah memiliki aktivitas sebagai antibakteri pada konsentrasi 20% dan 25%.[46,47]

Pada penelitian ini, besar rata-rata zona hambat yang terbentuk dari perlakuan kontrol positif yaitu Cutimed® *Gel* terhadap *S.aureus* adalah sebesar 0,64 mm. Menurut Davis dkk menyatakan bahwa zona hambat yang ada pada Cutimed® *Gel* termasuk dalam kategori antibakteri lemah.[47] Hal ini dikarenakan pada Cutimed® *Gel* hanya bekerja dengan cara mengikat permukaan ekstraseluler hidrofobik bakteri secara permanen, menyerap atau menahan eksudat tanpa sumbangan bahan kimia, dan tidak ada mengandung agen antiseptik maupun antibiotik lokal membuat bakteri lembam mencegah untuk bereproduksi atau melepaskan racun berbahaya. Maka dari itu hasil dari rata-rata diameter zona hambat pada Cutimed® *Gel* hanya dikategorikan sebagai antibakteri lemah.[14,48]

Berdasarkan hasil penelitian maka, hipotesis penelitian ini diterima yaitu terdapat aktivitas antibakteri pada hidrogel madu kelulut terhadap *S.aureus*. Hasil dari uji *Post-Hoc Duncan* pada lampiran 6 menunjukkan bahwa perlakuan hidrogel madu kelulut konsentrasi 25% memberikan efek paling besar dalam menghambat pertumbuhan *S.aureus* lebih besar daripada kontrol positif. Hasil ini relatif sama dengan hasil penelitian Wulandari, Supomo, & Warnida menyatakan bahwa ekstrak metanol propolis lebah madu kelulut menghambat pertumbuhan bakteri 30% (10,20 mm) sedangkan pada penelitian Braunwarth dan

Brill menyatakan bahwa rata-rata diameter zona hambat Cutimed® *Gel* pada bakteri MRSA yakni sebesar 0,4 mm yang berarti hidrogel madu kelulut memiliki rata-rata diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan rata-rata diameter zona hambat Cutimed® *Gel* pada bakteri S.*aureus*.[49,50] Hidrogel madu kelulut konsentrasi 25% pada penelitian ini menghasilkan zona hambat terbesar yakni 18,19 mm, sedangkan kontrol positif menghasilkan zona hambat sebesar 0,64 mm.

Penelitian ini tidak dilakukan uji kuantitatif metabolit sekunder, sehingga tidak diketahui kadar total senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam hidrogel madu kelulut dan senyawa metabolit mana yang paling dominan. Pada penelitian ini sudah didapatkan konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji melebihi kontrol positif. Namun, dapat dilakukan penelitian lanjutan menggunakan sediaan hidrogel madu kelulut dengan konsentrasi yang lebih tinggi untuk dapat menghasilkan rata-rata diameter zona hambat yang lebih besar agar kandungan zat antibakteri pada madu kelulut bekerja lebih maksimal. Selain menggunakan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram, penelitian ini juga dapat menggunakan metode sumuran dengan menaruh ekstrak secara langsung pada media agar menghasilkan zona hambat yang optimal.[51] Pada penelitian ini menggunakan metode *in vitro* namun metode *in vivo* juga dapat dilakukan karena dapat menghasilkan aktivitas formulasi yang lebih efektif.[45]

Sediaan hidrogel *carbopol* yang memiliki daya dikombinasikan madu lainnya yang memiliki kandungan senyawa fitokimia antibakteri yang sama dapat menghasilkan suatu efek sinergis. Adanya suatu efek sinergis pada sediaan hidrogel *cabopol* dengan kombinasi madu, akan menghasilkan stabilitas dan meningkatkan aktivitas daya hambat dari senyawa masing-masing tanaman tersebut, sehingga menghasilkan aktivitas antibakteri yang lebih kuat dan menghasilkan formula optimal yang memenuhi persyaratan evaluasi hidrogel dalam pertahanan stabilitas.[52]

Penelitian ini menggunakan *aquadest* steril sebagai pelarut karena mampu melarutkan hampir semua zat dan tidak dapat menumbuhkan mikroorganisme sehingga pada saat pengujian *S. aureus* tidak mengganggu pengamatan pengujian aktivitas antibakteri sekaligus digunakan sebagai kontrol negatif.[53] Penggunaan pelarut yang berbeda dapat digunakan saat proses pelarutan karena dapat berpengaruh terhadap daya hambat yang dihasilkan oleh senyawa antibakteri alami membuat ikatan pelarut dengan senyawa antibakteri alami pada madu lebih optimal.[53,54]

PENUTUP

Berdasarkan hasil analisis aktivitas antibakteri hidrogel madu kelulut terhadap *S. aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi cakram dengan pengukuran diameter zona hambat konsentrasi 20% dan 25%, didapatkan kesimpulan pada diameter zona hambat terkecil dan terbesar dari perlakuan hidrogel madu kelulut konsentrasi 20% terhadap S. *aureus* ATCC 25923 adalah 10,8 mm dan 12 mm. Diameter zona hambat terkecil dan terbesar dari perlakuan hidrogel madu kelulut konsentrasi 25% terhadap S. *aureus* ATCC 25923 adalah 15,9 mm dan 16,8 mm. Terdapat perbedaan aktivitas antibakteri hidrogel madu kelulut terhadap *S. aureus* ATCC 25923 berdasarkan diameter zona hambat konsentrasi 20% dan 25%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kesuma S, Saputri MJ, Aleksandra P. Profil bakteri penginfeksi pus pada luka di laboratorium mikrobiologi RSUD Abdoel Wahab Sjahranie periode bulan Januari-Juni tahun 2023.

Jurnal Kesehatan Tambusai. 2023;4(4):6013–23.
2. Zuliana NM, Suliati S, Endarini LH. Identifikasi bakteri pada luka ulkus pasien diabetes mellitus. JPP (Jurnal Kesehatan Poltekkes Palembang). 2023;18(2):205–11.
3. Adnan ML. Pengaruh probiotik terhadap aktivitas penyembuhan luka pada pasien dengan ulkus kaki diabetes. Essential: Essence of Scientific Medical Journal. 2022;19(2):20.
4. Sinaga JT, Liani FN, Pratiwi DI. Pola kepekaan bakteri dari kultur pus ulkus kaki diabetikum berdasarkan tingkat keparahan di RSUD Banjarmasin. homeostatis. 2021 Sep 15;4(2):297–304.
5. Levinson W. Review of medical microbiology & immunology. 15th ed. California: McGraw-Hill Education; 2018.
6. Khaerunnisa R, Kurniati I, Nurhayati D, Dermawan A. Pemanfaatan air eebusan umbi kuning dan ungu sebagai media alternatif pertumbuhan *Escherichia col*i dan *Staphylococcus* aureus. Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung. 2019;11(1):269–76.
7. Carrol KC, Morse SA MT. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 27th Ed. New York: McGrawhill Education; 2016.
8. Zuliana NM, Suliati S, Endarini LH. Identifikasi bakteri pada luka ulkus pasien diabetes mellitus. JPP (Jurnal Kesehatan Poltekkes Palembang). 2023;18(2):205–11.
9. Rizqiyah H, Soleha TU, Hanriko R, Apriliana E. Pola bakteri ulkus diabetikum pada penderita diabetes melitus di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek. majority. 2020;9(2)(Vol.9 No.2 (2020); Majority):128–35.
10. Ratna YR, Ardani US, Fathiana Z, Rahmatillah A, Trisharyanti K ID. Daya antibakteri ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu mete (*Anacardium occidentale L*.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* sensitif dan multiresisten. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 2015;57162(1):103–10.
11. Antony IR, Pradeep A, Pillai AV, Menon RR, Kumar VA, Jayakumar R. Antiseptic chitosan-poly (hexamethylene) biguanide hydrogel for the treatment of infectious wounds. J Funct Biomater. 2023 Oct 1;14(10).
12. Kurnia S, Sumangkut R, Hatibie M, Ratulangi. Perbandingan kepekaan pola kuman ulkus diabetik terhadap pemakaian PHMB gel dan NaCl gel secara klinis. Biomedik. 2017;9(1)(Vol.9 No.1 (2017): Jurnal Biomedik : JBM).
13. Novelni R. Identifikasi dan uji resistensi bakteri pada pasien ulkus diabetikum di bangsal interne RSUP Dr. M. Djamil Padang. Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia. 2019;8(2):67–74.
14. Kleintjes WG, Kotzee EP, Naidoo N. Mastery of cutimed sorbact dressings. South African Journal of Plastic & Reconstructive Aesthetic Surgery & Burns. 2019 Oct 15;2(2):49–53.
15. Ma'ruf M, Mawaddah GA, Eriana NNA, Swari FI, Aslamiyah S, Lutpiatina L. Madu lebah kelulut (*Trigona Spp*.) dalam aktifitas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* resisten. Jurnal Skala Kesehatan. 2018;9(1).
16. S, Samarghandian, Farkhondeh T SF. Honey and health: a review of recent clinical research. Pharmachognosy research. 2017;9(2) (honey and health):121.

17. Hasaini A, Muhlisoh. Daya Hambat madu kelulut dan daun belimbing wuluh secara in vitro terhadap aktivitas bakteri pada luka post operasi. Dunia keperawatan: Jurnal Keperawatan dan Kesehatan. 2022;10(1):32–8.
18. Qadariah L, Andrie WT. Uji sifat fisik sediaan salep kombinasi madu kelulut (*Heterotrigona itama*), ekstrak sirih hijau (*Piper betle L.*), dan minyak cengkeh (*Syzygium aromaticum L.*). jurnal mahasiswa farmasi fakultas kedokteran UNTAN. 2022;10(1):1–52.
19. Putri SAR, Susanto FH, Tambun SH, Oktiarso T. Uji aktivitas antibakteri pada macam-macam madu pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi agar dan dilusi cair. Sainsbertek Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi. 2022;2(2):85–97.
20. Omar S, Farhana Mat-kamir N, Sanny M. Antibacterial activity of malaysian produced stingless-bee honey on wound pathogens. J Sustain Sci Manag. 2019 Jun;14(3):67–79.
21. Juariah S. Uji efektivitas ekstrak daun serai (*Cymbopogon citratus L*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* secara in vitro. Jurnal Penelitian Kesmasy. 2021;4(1):63–27.
22. Harliatika Y. Formulation and evaluation of hydrogel from agarwood leaf (*Aquilaria malacensis Lamk*.) ethanol extract with carbopol 940 and HPMC K4M combination. Journal of Pharmacy and Science. 2021;6(1).
23. Federer WT. Statistics and society: data collection and interpretation. (No Title). 1991;
24. Dahlan MS. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan seri 1 edisi 6. Jakarta: Epidemiologi Indonesia. 2014;6(1):100–234.
25. Purnomo H, Syamsul E. Statistika farmasi (aplikasi praktis dengan SPSS). Purnomo H, Syamsul ES, editors. Yogyakarta: Penerbit Grafika Indah; 2017.
26. Dahlan M. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan: deskriptif, bivariat, dan multivariate, dilengkapi aplikasi dengan menggunakan SPSS. . Dahlan M, editor. Jakarta: Salemba Medika; 2014.
27. Afriliah N, Taurina W, Andrie M. Karakterisasi simplisa madu kelulut (*Heterotrigona itama*) sebagai bahan baku sediaan obat penyembuhan luka. Majalah Farmasi dan Farmakologi [Internet]. 2022 Dec 30;26(3):104–110. Available from: http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff
28. Saputra SH, Saragih B, Kusuma IW, Arung ET. Antioxidant and antibacterial screening of honey of Hiterotrogona itama collected from differents meliponiculture areas in East Kalimantan, Indonesia. Nusantara Bioscience. 2021 Dec 2;13(2).
29. Wientarsih I, Winarsih W, Sutardi LN. The Efficacy and safety of topical gel formulation of n-hexane fraction of curcuma longa in wound healing of hyperglycemic mice. Jurnal Veteriner [Internet]. 2013;14(1):19-23–23. Available from: https://ojs.unud.ac.id/index.php/jvet/article/download/6214/4706
30. Panuluh PD. Potensi cengkeh (*Syzigium Aromaticum*) sebagai antibakteri methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). JIKSH [Internet]. 2019;10(2):270–4. Available from: https://akper-sandikarsa.e-journal.id/JIKSH
31. Sakti B, Andriana D, Widyaningrum I. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol

dan fraksi etanol-air daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa.* journal Kedokteran Komunitas (Journal of Community Medicine). 2023 Sep 13;11(2).

32. Sa'adah H, Supomo S, Musaenah M. Aktivitas antibakteri ekstrak air kulit bawang merah (*Allium cepa L.*) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Jurnal Riset Kefarmasian. 2020 May 2;2(2):80–88.
33. Mama M, Teshome T, Detamo J. Antibacterial activity of honey against methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Laboratory-Based Experimental Study. Int J Microbiol. 2019;2019.
34. Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence . Microbiol Spectr. 2019 Apr 12;7(2).
35. Rosli MA, Mohd Nasir NA, Mustafa MZ, Othman MA, Zakaria Z, Halim AS. Effectiveness of stingless bee (Kelulut) honey versus conventional gel dressing in diabetic wound bed preparation: A randomized controlled trial. J Taibah Univ Med Sci. 2024 Feb 1;19(1):209–219.
36. Braghini F, Biluca FC, Ottequir F, Gonzaga LV., da Silva M, Vitali L, et al. Effect of different storage conditions on physicochemical and bioactive characteristics of thermally processed stingless bee honeys. LWT. 2020 Sep 1;131.
37. Wavinya F, Omolo M, Malebo H, Sifuna A, Nyongesa P, Nonoh J. Antibacterial activity of honey from wild species of stingless bees; *Plebenia hylderbrandii* and *Meliponula bocandei*. J Biosci Med (Irvine). 2021;09(07):67–84.
38. Zainol MI, Yusoff KM, Yusof MY. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. BMC Complement Altern Med. 2013 Jun 10;13.
39. Hu X, Yang J, Tu Y, Su Z, Guan Q, Ma Z. Hydrogel-based interfacial solar-driven evaporation: essentials and trails. Gels. 2024 Jun 1;10(6):371.
40. Li B, Thomas ·, Moriarty F, Webster T, Xing M. Racing for the surface. springer International Publishing; 2020.
41. Mahmood AL, Lani MN, Hassan Z, Razak SBA, Ahmad FT. Antioxidant and antimicrobial properties of Indo-Malayan stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey from different seasons and distribution of flowers. Food Res. 2021;5(2):498–507.
42. Ramlan NAFM, Zin ASM, Safari NF, Chan KW, Zawawi N. Application of heating on the antioxidant and antibacterial properties of malaysian and australian stingless bee honey. Antibiotics. 2021 Nov 1;10(11).
43. Majid M, Ellulu MS, Abu Bakar MF. Melissopalynological study, phenolic compounds, and antioxidant properties of *Heterotrigona itama* honey from Johor, Malaysia. Scientifica (Cairo). 2020 Jun 22;2020:1.
44. Braghini F, Biluca FC, Gonzaga L V., Vitali L, Costa ACO, Fett R. Effect thermal processing in the honey of Tetragonisca angustula: profile physicochemical, individual phenolic compounds and antioxidant capacity. J Apic Res. 2021 Mar 15;60(2):290–296.
45. El-Kased RF, Amer RI, Attia D, Elmazar MM. Honey-based hydrogel: In vitro and comparative in vivo evaluation for burn wound healing. Sci Rep. 2017 Dec 1;7(1).
46. Oroh SB, Kandou FE, Pelealu J, Pandiangan D. Uji daya hambat ekstrak *metanol Selaginella delicatula*

dan *Diplazium dilatatum* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Jurnal Ilmiah Sains. 2018 Apr;15(1):52–58.

47. Utomo SB, Fujiyanti M, Lestari WP, Mulyani S. Antibacterial Activity test of the C-4-methoxyphenylcalix[4]resorcinarene compound modified by hexadecyltrimethylammonium-bromide against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteria. JKPK (Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia). 2018 Dec 31;3(3):201.
48. Dissemond J, Aare K, Ozer K, Gandhi D, Ryan JL, DeKoven M. Aquacel Ag advantage/Ag+ extra and cutimed sorbact in the management of hard-to-heal wounds: a cohort study. J Wound Care. 2023;32(10):624–623.
49. Wulandari DT, Warnida H, Farmasi PS, Tinggi S, Abdul J, et al. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol propolis dari lebah kelulut (*Heterotrigona itama*) terhadap Bakteri Pseudomonas aeruginosa dan *Staphylococcus aureus*. Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi. 2023 Dec 30;11(2):1933–1945.
50. Braunwarth H, Brill FHH. Antimicrobial efficacy of modern wound dressings: Oligodynamic bactericidal versus hydrophobic adsorption effect. Wound Medicine. 2014;5:16–20.
51. Nurhayati LS, Yahdiyani N, Hidayatulloh A. Perbandingan pengujian aktivitas antibakteri starter yogurt dengan metode difusi sumuran dan metode difusi cakram. Jurnal Teknologi Hasil Peternakan. 2020;1(2):41.
52. Harliatika Y. Formulation and evaluation of hydrogel from agarwood Leaf (*Aquilaria malacensis Lamk*.) ethanol extract with carbopol 940 and HPMC K4M combination. Journal of Pharmacy and Science. 2021;6(1):2549–3558.
53. Wardaniati I, Gusmawarni V. Uji Aktivitas antibakteri ekstrak etanol propolis terhadap *Streptococcus Mutans*. Jurnal Farmasi Higea. 2021;13(2).
54. Esa NEF, Ansari MNM, Razak SIA, Ismail NI, Jusoh N, Zawawi NA, et al. A Review on Recent progress of stingless bee honey and its hydrogel-based compound for wound care management. Vol. 27, Molecules. MDPI; 2022.