

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Madu

2.1.1. Definisi

Dalam *Codex Alimentarius* (1989), madu didefinisikan sebagai bahan alami manis yang dihasilkan oleh lebah madu dari nektar bunga, sekresi dari bagian tanaman tertentu, atau ekskresi dari bagian tertentu tanaman penghisap serangga yang dikumpulkan oleh lebah madu, diubah dan dikombinasikan oleh bahan spesifik yang dimilikinya, serta disimpan dan ditinggalkan di sarangnya untuk proses pematangan dan pemasakan (Krell, 1996). Menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) 01-3545-2004, madu adalah cairan alami yang memiliki rasa manis yang dihasilkan oleh lebah madu dari sari bunga tanaman (floral nektar) atau bagian lain dari tanaman (ekstra floral nektar) atau ekskresi serangga. Nektar merupakan cairan yang dihasilkan oleh tanaman yang mengandung gula dengan komposisi yang berbeda antar spesies tanaman. Lebah membawa nektar di dalam sebuah kantong madu, untuk kemudian diletakan di sarangnya. Nektar tersebut diproses menjadi lebih kental dan memenuhi ruang diantara sarangnya untuk proses pematangan menjadi madu (Mutsaers *et al.*, 2005).

2.1.2. Penghasil Madu

Madu dihasilkan oleh lebah madu dari nektar yang diperoleh dari tanaman. Lebah madu merupakan hewan tak bertulang belakang, yang

termasuk dalam kelas insekta (serangga) dengan sistematika sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
Phylum : Arthropoda
Subphylum : Hexapoda
Class : Insecta
Sub Class : Pterygota
Ordo : Hymenoptera
Super Family : Apoidea
Family : Apidae
Genus : Apis (Linnaeus, 1758)

Spesies yang banyak terdapat di Indonesia adalah *Apis cerana*, *Apis dorsata* dan *Apis florea*. Sampai saat ini jenis lebah yang umum dibudidayakan adalah *A.cerana* dan *A. mellifera* (Situmorang dan Hasanudin, 2014).



Gambar 2.1 Koloni lebah *Apis mellifera* (Mortensen et al.,2013)

2.1.3. Proses Terbentuknya Madu

Madu terbentuk dari nektar yang dikumpulkan oleh lebah. Nektar adalah suatu zat yang mempunyai susunan yang sangat kompleks yang

dihasilkan oleh kelenjar nektaria tanaman dalam bentuk larutan gula dengan konsentrasi yang bervariasi. Nektar yang berasal dari bunga (nektar flora) dan selain bunga (ekstra flora) terdapat pada batang, daun dan ranting, namun ada kalanya berasal dari embun madu (*honey dew*) yaitu cairan manis yang dikeluarkan oleh kutu tanaman (Aphid). Pada kondisi normal umumnya lebah madu hanya mengambil nektar flora, sedangkan ekstra flora hanya diperlukan pada musim paceklik (Situmorang dan Hasanudin, 2014).

Menurut Suranto (2004), terdapat empat tahap pembentukan madu. Pertama adalah proses pengumpulan nektar dari tanaman. Kedua, nektar diubah menjadi gula *invert* yang terjadi ketika ada kontak antara nektar dan cairan saliva lebah pada saat lebah menghisap nektar. Saliva lebah mengandung enzim-enzim hidrolase yang berguna untuk pemecahan gula. Tahap ketiga adalah proses pengurangan jumlah air. Keempat merupakan proses pematangan madu dalam sarang lebah.

2.1.4. Jenis-Jenis Madu

Jenis madu ada saat ini sangat beragam dan seringkali dinamai berdasarkan sumber utama pakan lebah penghasilnya. Contohnya adalah madu karet, yang berarti sumber pakan lebah penghasilnya berasal dari tanaman karet. Selain itu madu dapat digolongkan berdasarkan jumlah jenis tanaman yang menjadi sumber nektarnya. Apabila madu dihasilkan oleh lebah yang mengambil nektar dari berbagai jenis tanaman tanpa ada tanaman yang dominan maka madu ini disebut madu multiflora atau poliflora. Madu yang mempunyai sumber nektar dominan dari satu tanaman disebut madu monoflora. Di beberapa daerah juga terdapat

madu biflora yang sumber nektar dominannya berasal dari dua jenis tanaman (Suranto, 2004).

Madu juga dapat digolongkan menjadi madu flora, madu ekstra flora, dan madu embun (*honey dew*). Madu flora adalah madu yang bersumber dari nektar yang terdapat dalam bunga. Sebaliknya madu ekstra flora berasal dari cairan yang berasal dalam daun, cabang atau batang pohon. Madu embun dibuat dari cairan yang dihasilkan oleh serangga yang terdapat di pohon. Serangga tersebut biasanya disebut dengan kutu bunga atau kutu pohon yang hidup di daun-daun tanaman dan dapat mengeluarkan cairan yang jika jatuh seperti embun. Biasanya madu jenis ini banyak dijumpai di Selandia baru dan Yunani (Suranto, 2004).

2.1.5. Karakteristik Madu

Madu memiliki beberapa karakteristik yang menentukan kualitas dari madu tersebut. Karakteristik tersebut diantaranya sebagai berikut:

a. Warna

Warna madu bervariasi, mulai dari jernih atau tidak berwarna, kekuningan, hingga gelap kecoklatan. Warna madu bervariasi tergantung sumber tanaman penghasil nektar, usia dan penyimpanan madu. Kejernihan madu dipengaruhi oleh jumlah partikel serbuk sari di dalamnya. Beberapa madu ada juga yang berwarna kuning terang (bunga matahari), kemerahan (*chestnut*), keabu-abuan (*eucalyptus*), dan kehijauan (melon). Pada kondisi madu yang mengkristal warnanya akan terlihat lebih cerah karena Kristal glukosa yang berwarna putih (Krell, 1996).

b. pH

Madu mempunyai pH yang rendah berkisar antara 3,2-4,5 yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Vallianou *et al.*, 2014). Sedangkan menurut Ceyhan dan Ugur (2001) keasaman madu berkisar antara pH 3-6. Keasaman dari madu ini terbentuk karena adanya asam-asam organik penyusunya yang juga menjadi faktor penghambat pertumbuhan bakteri (Amenu, 2013).

c. Kekentalan

Madu merupakan cairan yang kental. Kekentalan (viskositas) madu dipengaruhi oleh susunan senyawa yang ada di dalamnya, terutama kadar air dan juga temperatur. Semakin tinggi kadar air maka viskositasnya semakin rendah. Begitu pula dengan temperatur, semakin tinggi temperatur, semakin rendah kekentalan madu. Pada suhu ruang (20 °C) kekentalan madu mencapai 190 Poise (Krell, 1996; Bogdanov, 2011).

2.1.6. Komponen Penyusun Madu

Madu merupakan substansi kompleks yang terdiri dari setidaknya 600 senyawa (Bogdanov *et al.*, 2004). Madu terutama mengandung gula dan air. Kadar gula yang terkandung dalam madu mencapai 81,3% terdiri dari fruktosa (38,19%), glukosa (31,28%), sukrosa (5%), maltose dan disakarida lain (6,83%). Air merupakan komponen kedua terpenting dalam madu yang mempengaruhi proses penyimpanan madu. Kandungan air dalam madu bisa mencapai 17,2% (Suranto, 2004).

Komponen lain yang menyusun madu diantaranya terdapat asam amino, vitamin, mineral, enzim, hormon, zat bakterisida, dan zat aromatik. Vitamin yang terdapat dalam madu antara lain vitamin C (asam askorbat),

vitamin B6 (piridoksin), thiamin (B1), riboflavin (B2), niasin, asam pantotenat, biotin, asam folat, dan vitamin K. Madu mempunyai setidaknya 30 asam organik berbeda dengan total konsentrasi berkisar 0,2% - 0,8% dari total kandungan madu (Bogdanov, 2011). Beberapa asam organik yang paling umum ditemukan dalam madu adalah asam glukonat, asam asetat, asam sitrat, asam laktat, asam suksinat, dan asam formiat (Mato *et al.*, 2003). Enzim utama yang menyusun madu diantaranya terdapat *invertase* (saccharase), *diastase* (amylase) dan *glucose oxidase* (Amenu, 2013).

Pada beberapa jenis madu dari tanaman tertentu juga terdapat beberapa bahan yang dapat bersifat toksik, seperti *5-hydroxymethylfurfural* (HMF), *Pyrrolizidine alkaloids*, *GTxs*, *Hyoscyamine*, *Hyoscine*, dan *saponin*. Selain itu dapat juga terjadi kontaminasi logam berat saat pemrosesan dan penyimpanan madu. Beberapa logam berat pernah dijumpai dalam madu diantaranya adalah timbal (Pb), arsen (As) dan merkuri (Hg) (Islam *et al.*, 2013).

Madu mempunyai kandungan kalori yang cukup besar. Dalam 1 kg madu setara dengan 3.280 kalori yang setara dengan 4 kg kentang, 5,7 liter susu, 1,68 kg daging, 25 buah pisang, 40 buah jeruk, dan 50 butir telur ayam. Selain itu madu juga memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi dan lemak yang rendah (Suranto, 2004).

2.1.7. Manfaat Madu

Madu telah diketahui mempunyai banyak manfaat baik sebagai bahan makanan maupun sebagai salah satu bahan pengobatan alternatif. Sebagai bahan makanan madu sering kali dikonsumsi dalam keadaan tidak diproses baik yang berbentuk cairan, kristal maupun sisir madu.

Selain itu madu juga bisa digunakan sebagai bahan dalam pembuatan makanan sebagai pengganti gula.

Dalam bidang pengobatan madu mempunyai banyak sekali manfaat, diantaranya adalah sebagai antibakteri, antiinflamasi, antioksidan, dan antikanker. Beberapa penggunaan madu untuk pengobatan antara lain:

- a. Sebagai obat diare, hal ini dikarenakan madu memiliki efek antibakteri terhadap organisme enteropatogen seperti *Salmonella*, *Shigella*, dan *Enteropathogenic Escherichia coli*. Dalam studi klinis menunjukkan pemberian 30 ml madu 3 kali dalam sehari efektif mengobati 66% pasien diare.
- b. Mengontrol nafsu makan, hal ini disebabkan konsumsi madu mempengaruhi *appetite hormone* dimana madu dapat menunda *postprandial ghrelin response* dan meningkatkan kadar *peptide YY*. *Ghrelin* merupakan *gut hormone* yang menstimulasi rasa lapar melalui peningkatan motilitas gaster dan meningkatkan intake makanan, sedangkan *peptide YY* mempunyai efek menghambat motilitas usus dan menurunkan intake makanan (Larson-Meyer *et al.*, 2010; Chaudhri *et al.*, 2006).
- c. Sebagai suplemen dalam pengobatan ulkus lambung, karena madu dapat memberikan efek proteksi pada lambung.
- d. Sebagai penyembuh luka. Madu dapat digunakan untuk penyembuhan luka karena sifatnya *non-irritating*, non-toksik, mempunyai efek bakterisidal, antiinflamasi dan dapat menstimulasi regenerasi jaringan.

- e. Sebagai *immune inducer*. Penelitian Tonks *et al.* (2003) menunjukkan bahwa madu dapat meningkatkan pelepasan IL-1 β , IL-6, dan TNF- α dari sel monosit pada proses penyembuhan luka dan perbaikan jaringan (Singh *et al.*, 2012).

2.1.8. Penyimpanan Madu

Penyimpanan madu yang baik dan benar dapat mempertahankan kualitas madu hingga bertahun-tahun. Madu harus disimpan di tempat yang kering dan tidak lembab. Hal ini dikarenakan madu memiliki sifat higroskopis yang artinya dapat menarik air. Sifat ini terjadi karena zat gula yang dimiliki madu sebagian besar berupa fruktosa yang lebih larut dalam air dibandingkan glukosa. Kadar air yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya fermentasi hingga keawetannya berkurang dan menghasilkan alkohol. Suhu penyimpanan yang optimum untuk madu adalah 11 °C dan pada suhu kamar (21-27 °C) dapat disimpan dalam wadah kaca yang kedap udara. Tempat penyimpanan juga harus terhindar dari sinar matahari karena sinar matahari dapat merusak zat antibakteri dan mengoksidasi zat besi di dalamnya sehingga warnanya berubah menjadi lebih gelap (Suranto, 2004).

Wadah penyimpanan juga dapat mempengaruhi kualitas madu. Wadah yang baik untuk penyimpanan madu adalah wadah yang terbuat dari kaca, seperti gelas dan botol dan wadah yang tidak berpori. Wadah yang terbuat dari besi atau logam lainya dapat menyebabkan terjadinya reaksi kimia antara wadah dengan asam-asam organik di dalam madu dan menghasilkan senyawa yang bersifat racun. Wadah yang berpori dapat menarik air dan udara, sehingga kadar airnya meningkat dan terjadi proses fermentasi (Suranto, 2004).

Penyimpanan madu juga harus dihindarkan dari panas dan sinar matahari (terutama sinar ultra violet). Hal ini dikarenakan dapat merusak kualitas madu baik saat dilakukan paparan tinggi dalam waktu singkat atau paparan tingkat rendah selama periode waktu yang panjang. Radiasi ultra violet dapat menghancurkan oksidase glukosa dan juga sebagian besar aktivitas antibakteri. Selain itu penyimpanan madu juga harus dihindarkan dari hal-hal yang berbau. Hal ini dikarenakan madu dapat dengan mudah menyerap bau yang ada di sekitarnya (Krell, 1996).

2.1.9. Mekanisme Antimikroba Madu

Madu mengandung senyawa yang bersifat sebagai antibakteri. Namun daya antibakteri madu berbeda pada tiap jenis madunya. Menurut Molan dan Cooper (2000) perbedaan daya antibakteri dari madu dipengaruhi oleh letak geografis, musim dan sumber tanaman serta kondisi pemanenan, pemrosesan, dan penyimpanan. Madu memiliki sifat antibakteri dikarenakan madu memiliki osmolaritas yang tinggi, keasaman (pH rendah), kandungan hydrogen peroksida (H_2O_2), dan komponen non-peroksida seperti komponen fitokimia berupa *methylglyoxal* dan flavonoid (Mandal *et al.*, 2011).

Madu merupakan larutan jenuh dimana lebih dari 80% kandungan madu berupa gula yang sebagian besar terdiri dari fruktosa dan glukosa serta sedikit maltosa dan sukrosa, sedangkan kandungan air pada madu hanya kurang dari 18%. Konsentrasi gula yang tinggi dan rendahnya komponen air menyebabkan *osmotic stress* yang mencegah pembusukan madu akibat mikroorganisme. Interaksi yang kuat dari molekul-molekul gula dengan molekul air menghasilkan sangat sedikit molekul air tersedia untuk mikroorganisme. Mikroorganisme akan kehilangan air dari proses

osmosis ini dan akan mengalami dehidrasi sehingga dapat membunuh mikroorganisme tersebut (Kwakman dan Zaat, 2012; Nadhilla, 2014).

Umumnya madu mempunyai pH yang rendah berkisar antara 3,2-4,5 yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Vallianou *et al.*, 2014). Menurut Ceyhan dan Ugur (2001) keasaman madu berkisar antara pH 3-6. Keasaman dari madu ini terbentuk karena adanya asam-asam organik penyusunya yang juga menjadi faktor penghambat pertumbuhan bakteri (Amenu, 2013). Salah satu asam organik yang dominan adalah asam glukonat. Asam ini merupakan hasil perubahan enzimatis glukosa oleh enzim *glukosa oksidase*, yang disekresikan lebah dari kelenjar hipofaring, menjadi sebuah keseimbangan antara asam glukonat dan glukonolaktone (Nadhilla, 2014).

Salah satu enzim yang terdapat di dalam madu adalah enzim *glucose oxidase*, yang diperoleh dari lebah ketika lebah menghisap nektar. Enzim ini berfungsi dalam metabolisme karbohidrat dengan cara mengubah glukosa menjadi hydrogen peroksida dan asam glukonat dalam kondisi aerob. Hidrogen peroksida berperan dalam pencegahan pembusukan madu mentah ketika konsentrasi gula belum cukup untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme (Kwakman dan Zaat, 2012). Hidrogen peroksida telah dikenal sebagai antibiotik yang efektif. Hidrogen peroksida bertindak sebagai oksidan dengan memproduksi radikal bebas hidroksil (OH) yang mengganggu komponen penting sel bakteri, termasuk lipid, protein dan DNA (McDonnell dan Russell, 1999).

Madu juga memiliki senyawa yang bersifat sebagai antibakteri berupa flavonoid. Menurut Takaisi dan Scjonjer (1994) madu mempunyai efek antibakteri dikarenakan adanya aktivitas dari flavonone pinocembrin,

flavonol galangin, dan *caffeic acid phenyl ester* (CAPE) yang dapat menghambat polymerase RNA bakteri. Sedangkan menurut Cushnie dan Lamb (2005), flavonoid seperti galangin dapat mendegradasi membrane sitoplasma bakteri, sehingga menyebabkan hilangnya ion kalium dan berujung pada *autolysis* sel. Flavonoid jenis lain yang dimiliki madu adalah quercetin. Quercetin mempunyai efek anti bakteri dikarenakan quercetin dapat meningkatkan permeabilitas membran dan menghilangkan potensial membran, sehingga berujung pada hilangnya kapasitas produksi ATP, *transport* membran, dan motilitas bakteri (Boukraa *et al.*, 2013).

Efek madu terhadap mikroflora pada saluran pencernaan menunjukkan efek yang berbeda dibandingkan dengan efek madu terhadap bakteri patogen lainnya. Hal ini memungkinkan penggunaan madu secara peroral tanpa harus membunuh flora normal dalam saluran pencernaan. Pada penelitian El-Arab *et al.* (2006) menunjukan bahwa madu meningkatkan jumlah koloni probiotik endogen pada kolon seperti *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria*. Madu diketahui mengandung 4-5% fruktooligosakarida. Oligosakarida pada madu memiliki derajat polimerisasi yang rendah dan merupakan substrat yang menguntungkan bagi *Bifidobacteria*. Pada beberapa penelitian, usus halus manusia normal tidak menyerap fruktosa secara komplit. Prevalensi malabsorpsi fruktosa pada orang dewasa berkisar 30-50%. Fruktosa dan sakarida lain yang tidak dicerna dan diabsorpsi akan berpindah ke kolon dan menstimulasi secara selektif pertumbuhan probiotik kolon tersebut (El-Arab *et al.*, 2006).

2.2. Propolis

2.2.1. Definisi

Kata propolis berasal dari bahasa Yunani kuno “pro” yang berarti di depan atau pertahanan dan “polis” yang artinya kota atau komunitas, sehingga propolis dapat diartikan sebagai substansi yang digunakan untuk pertahanan kota atau sarang lebah. Propolis (lem lebah) adalah material lengket berwarna gelap yang dikumpulkan lebah dari tanaman hidup, dicampur dengan lilin dan digunakan dalam konstruksi dan adaptasi dari sarang lebah (Bankova, 2000).

Menurut Karl (1996), propolis adalah campuran dari berbagai macam lilin lebah dan resin yang dikumpulkan oleh lebah dari tumbuh-tumbuhan, terutama dari bunga dan tunas daun. Lebah mendapatkan resin dari bunga dan tunas daun dengan menggunakan rahang mereka dan kemudian dibawa ke sarang. Hal ini dapat diasumsikan bahwa dalam proses pengumpulan dan pembentukan resin, resin dicampur dengan air liur dan sekresi lain dari lebah serta lilin (Karl, 1996).

2.2.2. Karakteristik Fisik Propolis

Warna propolis bervariasi mulai dari kuning hingga coklat tua tergantung dari asal resin penyusunnya. Bahkan pernah dilaporkan propolis transparan oleh Coggsall dan Morse (1984). Sedangkan bentuk fisik propolis juga bervariasi dipengaruhi oleh suhu penyimpanan (Karl, 1996). Propolis dapat berbentuk cair sampai padat. Semakin tinggi temperatur penyimpanan, propolis akan semakin cair (Siregar *et al.*, 2011). Bentuk propolis berdasarkan temperature penyimpanan dapat dilihat dalam tabel 2.1 di bawah ini.

Tabel 2.1 Bentuk Propolis

Temperatur (°C)	Bentuk Propolis
< 15	Keras dan <i>brittle</i> (rapuh). Tetap <i>brittle</i> meskipun disimpan pada temperatur yang lebih tinggi
25-45	Lunak, <i>paliabile</i> , sangat lengket
>45	Semakin lengket dan <i>gummy</i> (seperti karet)
60-70	Cair
100	Titik cair beberapa jenis propolis

Sumber: Siregar *et al.*, 2011

2.2.3. Komponen Penyusun Propolis

Komposisi propolis mentah terdiri atas resin (50%), lilin (30%), minyak esensial dan minyak aromatik(10%), pollen (5%), dan bahan organik lain (5%). Jenis senyawa kimia yang terdapat pada propolis sangat kompleks dan tergantung flora yang ada di wilayah tempat propolis dikumpulkan. Selain itu, keragaman senyawa kimia yang dimiliki propolis juga dipengaruhi oleh musim, pencahayaan, ketinggian tempat, tipe lebah, dan ketersediaan sumber pangan lebah. Hingga tahun 2000, telah ditemukan lebih dari 300 komponen kimia yang terkandung dalam propolis, termasuk di dalamnya yaitu flavonoid, fenol, senyawa aromatik, terpenoid, gula, hidrokarbon, dan elemen mineral (Bankova, 2000; Toreti *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014). Kandungan seyawa dalam propolis dapat dilihat dalam tabel 2.2.

Flavonoid mempunyai efek biologis yang cukup luas seperti efek antibakteri, antivirus, dan anti inflamasi. Berdasarkan struktur kimianya, flavonoid pada propolis diklasifikasikan menjadi flavones, flavonol, flavonone, flavanonol, chalcone, dihydrochalcone, isoflavone,

isodihydroflavone, flavan, isoflavan dan neoflavonoid. Beberapa senyawa fenolat yang terkandung dalam propolis antara lain hidroksisinamat, asam sinamat, asam kafeat, asam kumarat, asam ferulat serta turunan-turunannya (Huang *et al.*, 2014).

Tabel 2.2 Kandungan Senyawa dalam Propolis

Komposisi	Presentase (%)	Kandungan
Resin	45-55	Flavonoid, asam fenol dan esternya
Lilin (<i>wax</i>)	7,5-35	Kebanyakan <i>beeswax</i>
Minyak esensial	5-10	Minyak volatile
Asam lemak	5	Kebanyakan dari lilin lebah
<i>Pollen</i>	5	Protein dan asam amino bebas (arginin dan prolin)
Senyawa Organik dan Mineral	5	Keton, lakton, quinon, steroid, asam benzoate dan esternya Vitamin B1, B2, B3, B6, dan gula Elemen Fe, Zn, Au, Ag, Cs, Hg, K, dan Sb

Sumber : Siregar *et al.*, 2011

2.2.4. Manfaat Propolis

Bagi lebah, propolis berfungsi untuk melapisi sarang lebah, mengisi retakan dan celahnya, mempersempit atau menutup sarang agar tidak terbuka, melindunginya dari kontaminasi yang berasal dari luar, untuk memperkuat dan menyambung sel-sel dalam sarang dan melindunginya dari rembesan air. Sebelum lebah ratu meletakkan telur ke dalam sel sarangnya, terlebih dulu sel tersebut dilapisi dengan propolis agar larva

yang tumbuh tidak terkontaminasi oleh mikroba. Lebah juga menggunakan propolis pada pintu masuk rumah mereka agar tetap steril selama mereka keluar masuk rumah (Susilo *et al.*, 2009).

Selain bermanfaat bagi lebah, propolis juga telah banyak digunakan dalam pengobatan tradisional karena memiliki komponen kimia dengan efek farmakologi yang kuat dan toksisitas yang rendah. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa propolis mempunyai efek antibakteri, antitumor, antikanker, anti-inflamasi, antioksidan dan *hepatoprotective* (Toreti *et al.*, 2013). Oleh karena itu, penggunaan propolis dalam bidang medis cukup luas, yaitu meliputi terapi gangguan pada sistem kardiovaskular (anemia), gangguan sistem respirasi (berbagai infeksi), perawatan gigi, gangguan dermatologi (regenerasi jaringan, ulcer, eksim, penyembuhan luka - terutama luka bakar, mycosis, infeksi dan lesi membrane mukosa), terapi kanker, gangguan sistem pencernaan (ulcer dan infeksi), meningkatkan sistem kekebalan tubuh, perlindungan hepar dan masih banyak lagi (Karl, 1996).

2.2.5. Penyimpanan Propolis

Secara umum, propolis cukup stabil, akan tetapi cara penyimpanan yang baik juga diperlukan untuk mempertahankan kualitas propolis. Propolis yang disimpan dengan yang baik akan kehilangan sedikit atau bahkan tidak kehilangan aktivitas antibakterinya hingga penyimpanan lebih dari 12 bulan. Sedangkan propolis yang diekstrak menggunakan ethanol menunjukkan tidak adanya perubahan aktivitas antimikroba setelah 15 tahun penyimpanan. Stabilitas ini disebabkan karena stabilnya senyawa fenolat yang bertanggung jawab atas aktivitas antimikroba dari propolis. Ekstrak propolis harus disimpan pada wadah yang gelap dan

kedap udara. Suhu terbaik untuk penyimpanan berkisar antara 10 - 12 °C dan jauh dari pemanasan langsung seca berlebihan (Karl, 1996; Bankova, 2015).

2.2.6. Mekanisme Antimikroba Propolis

Mekanisme antimikroba propolis merupakan mekanisme kompleks yang terbentuk karena aktivitas sinergisme antara senyawa fenolat dan senyawa-senyawa lain terutama flavonoid, pinocembrin, galangin dan pinobanksin (Junior *et al.*, 2005). Menurut Boukraa *et al.* (2013), mekanisme antimikroba propolis banyak dipengaruhi senyawa fenolat seperti flavonoid. Senyawa flavonoid yang paling poten sebagai senyawa *microbicidal* adalah flavonone pinocembrine, analog flavonol galangin, asam cafeat dan esternya, terpenoid dan chrysin.

Efek antibakteri dari flavonoid memiliki beberapa target seluler. Salah satunya adalah dengan cara membentuk kompleks protein ekstraseluler dan terlarut dengan dinding mikroba. Mekanisme antimikroba flavonoid berkaitan dengan inkativasi dari adhesin, enzim dan protein transport dari envelope sel (Kumar dan Pandey, 2013). Selain itu, flavonoid juga dapat mendegradasi membran sitoplasma bakteri yang berujung pada hilangnya ion kalium dan kerusakan sel akibat *autolysis* (Boukraa *et al.*, 2013).

2.3. *Staphylococcus aureus*

2.3.1. Klasifikasi dan Morfologi

Sebagian bakteri *Staphylococcus* merupakan flora normal pada kulit, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan makanan pada manusia. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar. Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif. Bakteri ini

termasuk dalam genus *Staphylococcus*, dengan sistematika klasifikasi dari Rosenbach (1884) sebagai berikut:

Domain : Bacteria

Kerajaan: Eubacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacilli

Ordo : Bacillales

Famili : Staphylococcaceae

Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *S. aureus*

Bakteri ini berbentuk bulat atau kokus dengan diameter 0,4-1,2 μm (rata-rata 0,8 μm) yang terlihat bergerombol seperti buah anggur pada pewarnaan yang berasal dari perbenihan padat. *Staphylococcus aureus* bersifat aerob atau anaerob fakultatif, tes katalase positif dan tahan hidup di lingkungan yang mengandung garam dengan konsentrasi tinggi (halofilik), misalnya NaCl 10%. Bakteri ini tidak dapat bergerak meskipun pada percobaan tetes gantung ditemukan suatu gerakan Brown (Dzen et al., 2010).



Gambar 2.2 Morfologi *Staphylococcus aureus* (Brooks et al., 2013)

2.3.2. Kultur

Perbenihan *Staphylococcus* memerlukan suhu optimal antara 28-38 °C, atau sekitar 35 °C dan 37°C jika bakteri disolasi dari penderita. Akan tetapi bakteri ini membentuk pigmen terbaik pada suhu ruang antara 20-25 °C. pH optimal yang diperlukan bagi bakteri ini untuk tumbuh adalah 7,4. Medium yang dapat dipakai untuk membiakan bakteri ini antara lain *Nutrient Agar Plate* (NAP), *Blood Agar Plate* (BAP), dan *Manitol Salt Agar* (MSA). Perbenihan pada medium NAP bertujuan untuk mengetahui adanya pembentukan pigmen. Pada medium ini *Staphylococcus aureus* akan membentuk pigmen berwarna kuning emas serta koloni berbentuk bulat dengan diameter 1-2 mm, konveks, tepi rata, permukaan mengkilat dan konsistensi lunak. Pada medium BAP koloni tampak lebih besar dengan adanya zona hemolisa yang jernih di sekitar koloni. Medium MSA digunakan untuk melihat sifat fermentasi terhadap manitol. *Staphylococcus aureus* mempunyai sifat dapat meragikan manitol, sehingga pada kultur di media MSA akan terlihat adanya daerah terang (halo) berwarna kuning di sekitar koloni yang terbentuk (Dzen *et al.*, 2010).

2.3.3. Struktur Antigen

Staphylococcus aureus mengandung Ag-Karbohidrat (Ag-KH) dan Ag-Protein. Pada strain yang patogen ditemukan Ag-KH tipe A yang apabila disuntikan secara intradermal pada penderita yang terinfeksi stafilokokus akan terjadi reaksi hipersensiti tipe segera (*immediate type*) dalam 20-30 menit berupa *wheal* dan eritema. Sedangkan kompleks Ag-protein dari stafilokokus jika disuntikan pada kelinci akan menghasilkan presipitin (Dzen *et al.*, 2010).

Pada sebagian besar *Staphylococcus aureus* memiliki dinding sel yang mengandung protein A yang berikatan dengan peptidoglikan secara kovalen. Protein A pada *Staphylococcus* dapat berikatan dengan fragmen Fc dari immunoglobulin sehingga dapat dipakai untuk membantu identifikasi karena fragmen Fab bebas dapat berikatan dengan antigen spesifik (Brooks *et al.*, 2013).

Beberapa strain *S. aureus* memiliki kapsul, yang menghambat fagositosis oleh leukosit polimorfonuklear kecuali jika terdapat antibodi spesifik. Sebagian besar strain *S. aureus* mempunyai koagulase atau faktor penggumpal, pada permukaan dinding sel terjadi koagulase dengan fibrinogen secara nonenzimatik, sehingga menyebabkan agregasi bakteri (Brooks *et al.*, 2013).

2.3.4. Penentu Patogenisitas

2.3.4.1. Metabolit non-toksin

- a. **Antigen Permukaan (materi kapsul)**, berfungsi untuk mencegah fagositosis, reaksi koagulase dan melekatnya bakteriofaga.
- b. **Koagulase**, merupakan antigen protein yang bersifat sebagai *clotting agent*, proteolitik dan esterolitik. Enzim ini dapat menggumpalkan plasma oksalat atau plasma sitrat, karena adanya faktor koagulase reaktif dalam serum yang bereaksi dengan enzim tersebut. Esterase yang dihasilkan dapat meningkatkan aktivitas penggumpalan, sehingga terbentuk deposit fibrin pada permukaan sel bakteri yang dapat menghambat fagositosis.
- c. **Hialuronidase**, menyebabkan bakteri bersifat invasif pada fase awal infeksi. Secara *in vitro* dapat dihasilkan bila medium diperkaya dengan tirosin dan triptofan.

- d. **Stafilokinase**, merupakan enzim yang bekerja sebagai aktivator enzim protease dalam plasma untuk menghasilkan *lytic agent*, bersifat antigenik dan tidak tahan panas.
- e. **Protease**, bersifat proteolitik dan menyebabkan nekrosis pada jaringan yang diinvasi.
- f. **Lipase**, bersifat antigenik dan dapat memutuskan ikatan asam oktadenoat dengan lipid (Dzen *et al.*, 2010).

2.3.4.2. Eksotoksin

Eksotoksin dari *Staphylococcus* bersifat mematikan, tidak tahan panas dan dapat menyebabkan nekrosis lapisan dermis. Eksotoksin *Staphylococcus* dapat dibedakan menjadi:

- a. **Toksin Alfa (α -toxin)**, bersifat mematikan leukosit dan makrofag (*leucocidal*), menyebabkan lisis eritrosit kelinci, merusak trombosit, dan pada penyuntikan intrakutan dapat menyebabkan nekrosis serta mempunyai efek letal.
- b. **Toksin Beta (β -toxin)**, menimbulkan lisis pada eritrosit biri-biri dan toksik terhadap hewan.
- c. **Toksin Delta (δ -toxin)**, bersifat non-toksik tetapi dapat merusak sel eritrosit manusia dan kuda.
- d. **Panton Valentin (PV) atau Leukosidin**, bersifat tahan panas, non-hemolitik, dinetralkan oleh kolesterol dan *leucocidal* pada semua spesies kecuali biri-biri (Dzen *et al.*, 2010).

2.3.4.3. Enterotoksin

Sekitar 50% dari galur *Staphylococcus aureus* dapat memproduksi satu atau lebih enterotoksin. Enterotoksin tahan terhadap pemanasan / pendidihan selama 30 menit dan aktivitas

enzim pencernaan. Toksin ini merupakan penyebab tersering dari kasus keracunan makanan. Seseorang yang menelan lebih dari 25 µg enterotoksin B akan menyebabkan muntah dan diare. Efek emetik ini terjadi akibat stimulasi *Central Nervous System* (CNS) pada pusat muntah setelah toksin bekerja pada reseptor neural di usus (Dzen et al., 2010).

2.3.4.4. Toksin Epidermolitik

Toksin ini mempunyai aktivitas proteolitik dan dapat melarutkan matriks mukopolisakarida epidermis. Toksin ini menyebabkan *Scalded Skin Syndrome* yang ditandai dengan adanya perlepasan epidermis kulit akibat lisisnya perekatan antar sel pada stratum germinativum tanpa adanya peradangan atau kematian sel (Dzen et al., 2010).

2.3.4.5. Toxic Shock Syndrome Toxin

Sebagian besar galur *S. aureus* yang diisolasi dari penderita sindrom syok toksik menghasilkan eksotoksin pirogenik. Pada manusia, toksin ini menyebabkan demam, syok, ruam kulit, dan gangguan multisistem organ dalam tubuh. Toksin ini diperkirakan menyerang sel-sel imunokompeten dalam jumlah yang cukup banyak, sehingga digolongkan sebagai supeantigen (Dzen et al., 2010).

2.3.5. Infeksi Klinis

Staphylococcus aureus dapat menginfeksi seluruh bagian tubuh, sehingga bentuk klinisnya bervariasi tergantung bagian tubuh yang diserang. Diantaranya yaitu:

- Pada kulit dapat berupa furunkel, karbunkel, impetigo, *scalded skin syndrome*, dan sebagainya.
- Pada kuku berupa paronikhia
- Pada tulang berupa osteomyelitis
- Pada sistem pernafasan berupa tonsillitis, bronchitis, dan pneumonitis
- Pada otak dapat berupa meningitis dan ensefalomyelitis
- Pada traktus urogenitalis dapat berupa sistitis dan pyelitis
- *Toxic shock syndrome* yang ditandai dengan adanya panas mendadak, diare, syok, *diffuse macula erythematous rash*, hyperemia konjungtiva, orofaring dan membrane mukosa vagina.
- Keracunan makanan akibat makanan yang terkontaminasi enterotoksi stafilokokus dengan gejala muntah dan diare (Dzen *et al.*, 2010)

Infeksi oleh *S. aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah. Mula-mula terjadi nekrosis jaringan setempat, lalu terjadi koagulasi fibrin di sekitar lesi dan pembuluh getah bening, sehingga terbentuk dinding yang membatasi proses nekrosis. Infeksi dapat menyebar ke bagian tubuh lain melalui pembuluh getah bening dan pembuluh darah, sehingga terjadi peradangan pada vena, trombosis, bahkan bakteremia. Bakteremia dapat menyebabkan terjadinya endokarditis, osteomyelitis akut hematogen, meningitis atau infeksi paru-paru. Selain itu, infeksi *Staphylococcus aureus* juga dapat terjadi akibat kontaminasi langsung *Staphylococcus aureus* pada luka terbuka (seperti luka pasca bedah) atau infeksi setelah trauma (seperti osteomyelitis kronis

setelah fraktur terbuka) dan meningitis setelah fraktur tengkorak (Brooks, *et al.*, 2013).

Keracunan makanan dapat disebabkan kontaminasi enterotoksin dari *Staphylococcus aureus*. Waktu onset dari gejala keracunan biasanya cepat dan akut (1-8 jam), tergantung pada daya tahan tubuh dan banyaknya toksin yang termakan. Gejala keracunan ditandai oleh rasa mual, muntah-muntah, dan diare yang hebat tanpa disertai demam.

Sindroma syok toksik (SST) pada infeksi *S. aureus* timbul secara tiba-tiba dengan gejala demam tinggi, muntah, diare, mialgia, ruam, dan hipotensi, dengan gagal jantung dan ginjal pada kasus yang berat. SST sering terjadi dalam lima hari permulaan haid pada wanita muda yang menggunakan tampon, atau pada anak-anak dan pria dengan luka yang terinfeksi *Staphylococcus. S. aureus* dapat diisolasi dari vagina, tampon, luka atau infeksi lokal lainnya (Brooks *et al.*, 2013).

2.3.6. Diagnosis Laboratorium

Bahan untuk pemeriksaan tergantung bentuk klinisnya, bahan tersebut dapat berupa eksudat atau pus dari abses, sputum, feses, sisa bahan makanan pada kasus keracunan makanan, darah jika terdapat bakteremia, dan urin. Bahan-bahan tersebut selanjutnya dilakukan pemeriksaan sebagai berikut:

- a. Pewarnaan gram
- b. Perbenihan pada medium *Blood Agar Plate* (BAP) atau pada medium selektif *Manitol Salt Agar* (MSA), kemudian koloni yang tumbuh dilakukan pewarnaan gram
- c. Tes biokimia untuk keperluan identifikasi dengan tes katalase. Tes ini untuk membedakan dengan bakteri streptokokus. Pada stafilokokus

tes katalase akan memberikan hasil positif. Selain Tes Katalase juga dilakukan tes patogenisitas yang dapat berupa tes koagulase, tes produksi DNase dan fermentasi manitol.

d. Penentuan tipe bakteriofaga.

2.4. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan galur *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik methicillin. Pada awalnya, obat pilihan untuk terapi infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* adalah Penicillin, namun pada perkembangannya di tahun 1940-an mulai terjadi resistensi pada obat tersebut. Methicillin diperkenalkan pada tahun 1959 untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap Penicillin. Namun dua tahun kemudian bakteri *Staphylococcus aureus* dilaporkan juga mengalami resistensi terhadap Methicillin. Hingga saat ini MRSA telah menjadi salah satu masalah kesehatan di seluruh dunia (Enright *et al.*, 2002; Stryjewsky dan Corey, 2014). Di Indonesia, angka resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap methicillin (MRSA) mencapai 28%. Pada beberapa negara di Asia Tenggara lainnya resistensi *Staphylococcus* terhadap methicillin menunjukkan angka yang lebih tinggi, yaitu 59 % di Filipina, 57% di Thailand dan 74,1% di Vietnam (Chen dan Huang, 2014).

Mekanisme terjadinya resistensi methicillin teridentifikasi pada tahun 1981. Resistensi methicillin terjadi karena adanya perubahan pada *Penicillin Binding Protein* (PBP). Mekanisme resistensi *S. aureus* terhadap methicillin dapat terjadi melalui pembentukan PBP lain yang sudah dimodifikasi, yaitu PBP2a yang mengakibatkan penurunan afinitas

antimikroba golongan β -laktam. Akibatnya suatu strain yang resisten terhadap methicillin berarti akan resisten juga terhadap semua turunan penicillin, sefalosporin dan carbapenem. Penurunan afinitas ini menyebabkan bakteri tidak dapat diinaktivasi (Stryjewsky dan Corey, 2014). PBP-2a ini dikode oleh gen *mecA* yang berada dalam elemen *genetic mobile* yang disebut *Staphylococcal Chromosome mec* (SCCmec) (Enright *et al.*, 2002).

Berdasarkan asal didapatnya infeksi, infeksi MRSA dibedakan menjadi HA-MRSA (*Hospital Acquired MRSA*) dan CA-MRSA (*Community Acquired MRSA*). HA-MRSA artinya pasien mendapatkan infeksi MRSA ketika pasien mendapatkan perawatan di tempat pelayanan kesehatan. CA-MRSA artinya pasien mendapatkan infeksi MRSA dari lingkungan sekitarnya dan bukan dari tempat pelayanan kesehatan. Secara umum bentuk infeksi yang disebabkan oleh HA-MRSA dan CA-MRSA berbeda. CA-MRSA seringkali menyebabkan infeksi kulit dan jaringan lunak. HA-MRSA lebih sering menginfeksi saluran nafas, aliran darah, saluran urin, dan tempat operasi. Selain itu CA-MRSA seringkali lebih sensitif terhadap antibiotik non-beta laktam, seperti clindamycin, trimethoprim sulfamethoxazole, dan tetracycline dibandingkan dengan HA-MRSA (Rehm dan Tice, 2010).

2.5. Uji Sensitivitas Antimikroba

Uji sensitivitas antimikroba merupakan uji kepekaan bakteri terhadap antimikroba untuk mengetahui obat antimikroba yang masih dapat digunakan untuk mengatasi infeksi oleh mikroba tertentu. Uji ini dapat

dilakukan melalui beberapa cara, diantaranya yang sering dipakai untuk uji sensitivitas bahan antimikroba yaitu dengan metode dilusi dan difusi.

2.5.1. Metode Dilusi

2.5.1.1. Metode Dilusi Tabung

Metode dilusi tabung merupakan metode uji kepekaan bakteri terhadap antimikroba dengan cara pengenceran secara serial antimikroba yang diuji. Pengujian ini bertujuan untuk mencari kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) dari sebuah antimikroba. Metode ini menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Kemudian tabung diisi dengan antimikroba yang telah diencerkan secara serial dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu tabung diamati kekeruhannya. Pada tabung dengan konsentrasi terendah yang telah menunjukkan hasil biakan mulai tampak jernih merupakan KHM dari antimikroba. Tahap selanjutnya hasil biakan pada tabung yang tampak jernih diinokulasikan pada media agar padat dan diinkubasi. Konsentrasi terendah antimikroba pada biakan padat dimana tidak ditemukan pertumbuhan koloni bakteri menunjukkan KBM dari antimikroba yang diuji (Dzen *et al.*, 2010).

2.5.1.2. Metode Dilusi Agar

Pada metode dilusi agar bahan antimikroba dan organisme diuji pada media agar padat. Setiap konsentrasi bahan antimikroba diuji dalam sebuah cawan petri. Bahan antimikroba yang diuji dituangkan ke dalam cawan petri saat media agar belum mengeras dan dicampur secara merata dengan agar. Setelah campuran media agar

dan bahan antimikroba mengeras, bakteri diinokulasikan di permukaan agar. Standar bakteri yang diinokulasikan adalah 1×10^4 CFU/ml. Selanjutnya cawan petri diinkubasi. Setelah proses inkubasi, plate diamati untuk melihat pertumbuhan koloni bakteri. Kadar Hambat Minimum (KHM) ditentukan pada konsentrasi terendah yang tidak didapatkan pertumbuhan bakteri. Dengan metode ini dapat dilakukan pengujian lebih dari satu isolat bakteri dalam satu cawan petri (Tille, 2014).

2.5.2. Metode Difusi

2.5.2.1. Metode Difusi Cakram

Pada metode difusi cakram obat antimikroba dijenuhkan ke dalam cakram kertas terlebih dahulu untuk selanjutnya ditanam pada media agar padat yang telah dicampur mikroba yang diuji. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C . Hasil inkubasi diamati adanya zona inhibisi (zona jernih) di sekitar cakram kertas yang ditanam dan diukur diameter daerah jernih yang terbentuk. Daerah jernih menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Hasil pengukuran diameter zona jernih selanjutnya dibandingkan dengan tabel CLSI (Dzen *et al.*, 2010).

2.5.2.2. Metode Difusi Sumuran

Metode difusi sumuran merupakan metode yang banyak digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba dari tanaman atau ekstrak antimikroba dari bahan alam. Prosedurnya hampir sama dengan prosedur dari metode difusi cakram. Kelebihan metode ini adalah prosedurnya yang sederhana, tidak memakan waktu lama dan lebih murah dari metode difusi cakram (Valgas *et al.*, 2007).

Bakteri terlebih dahulu diinokulasi pada seluruh permukaan medium agar padat. Kemudian medium agar dilubangi dengan menggunakan pelubang steril dengan diameter 6-8 mm. Bahan antimikroba yang akan diuji selanjutnya dimasukkan ke dalam lubang sumuran yang telah dibuat dengan volume 20-100 μ L. Cawan petri agar diinkubasi dengan waktu dan suhu sesuai dengan mikroorganisme yang diuji. Setelah diinkubasi, kemudian diamati dan diukur diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dalam satuan mm (Balouiri *et al.*, 2016).

