

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Karakteristik dan Manfaat Madu

Madu merupakan pemanis alami yang digunakan dalam bidang pangan oleh industri makanan di seluruh dunia. Madu dari lebah madu merupakan cairan kental yang mengandung berbagai macam molekul seperti glukosa dan fruktosa sebesar 80-85 %, air sebanyak 15-17 %, protein dan asam amino sebanyak 0,1-0,4 %. Komposisi dari madu sangat bervariasi tergantung pada jenis tanaman yang dihindangi oleh lebah atau menjadi tempat bagi lebah untuk mengambil nektar (Rao dkk., 2016).

Kandungan senyawa dalam madu pada umumnya adalah asam fenolik meliputi *caffeic*, *ellagic*, *ferulic* dan *p-coumaric acids*; flavonoid seperti apigenin, *chrysin*, galangin, hesperetin, kaempferol, *pinocembrin* dan *quercetin*; serta antioksidan seperti *tocopherols*, *ascorbic acid*, *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), dan *reduced glutathione* (GSH). Beberapa studi menunjukkan bahwa madu dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakterial, antiviral, antiulcer, antihiperlipidemik, antidiabetik, dan antikanker (Rao dkk., 2016).

Antibakteri merupakan senyawa yang dapat mengendalikan atau mengganggu pertumbuhan bakteri yang merugikan (Sulistyo, 1971). Antiluka adalah senyawa yang dapat meningkatkan penyembuhan luka atau membantu mengembalikan kontinuitas fungsi dan anatomi jaringan yang rusak dalam waktu singkat (Sadekar dkk, 2012). Madu dapat digunakan sebagai penyembuh

luka karena memiliki aktivitas antibakteri dan antiinflamasi. Madu bekerja baik untuk menghambat pertumbuhan dari *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Helicobacter pylori*, dan *Salmonella* spp. (Rao dkk., 2016).

Aktivitas antibakteri dari madu berasal dari efek osmotik, asiditas, hidrogen peroksida, dan faktor fitokimia. Osmolaritas madu yang tinggi dapat menarik air dari mikroorganisme yang dapat membatasi hidup mereka. Asiditas dari madu berkisar pada pH 3,2-4,9 sehingga dapat menghambat patogen yang tidak tahan asam. Madu dapat menjaga luka dalam kondisi steril sehingga senyawa yang berperan sebagai antioksidan dan antimikrobia dapat bekerja dengan baik (Jalil dkk., 2017). Adanya hidrogen peroksida dapat menghambat pertumbuhan dari mikrobia. Faktor fitokimia yang dimiliki madu adalah fenol kompleks dan flavonoid yang memiliki manfaat sebagai antibakteri (Garedeu dkk, 2003).

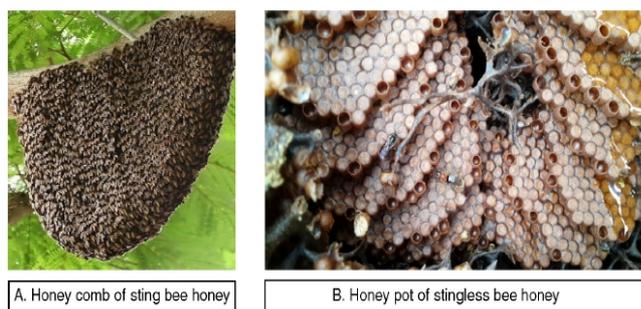
B. Madu Klanceng dari Lebah *Trigona* sp.

Madu klanceng merupakan madu khusus yang dihasilkan oleh lebah tak bersengat yaitu *Trigona* sp.. Lebah ini menggunakan gigitan sebagai cara bertahan dari ancaman yang menggantikan peran dari sengat yang mereduksi.



Gambar 1. Lebah klanceng (*Trigona* sp.). Lebah yang tidak memiliki sengat dan berukuran 4-5 mm (Sumber : Western Australian Museum, 2013)

Lebah klanceng termasuk dalam kingdom Animalia, filum Arthropoda, classis Insecta, ordo Hymenoptera, famili Apidae, genus Trigona, dan spesies *Trigona* sp. (Syafrizal dkk., 2012). Berbeda dengan lebah madu, lebah klanceng membuat sarang menyerupai pot atau kendi bulat secara horizontal (Garedew dkk., 2003).



Gambar 2. Perbandingan sarang lebah madu dan lebah klanceng. Sarang lebah madu (A) berbentuk heksagonal sedangkan sarang lebah klanceng (B) berbentuk seperti pot (Sumber : Rao dkk., 2016)

Madu klanceng memiliki karakteristik seperti lebih encer dan berwarna coklat amber. Rasa dari madu klanceng cenderung lebih asam karena memiliki pH 3,05-4,55. Kadar air dari madu klanceng lebih banyak yaitu berkisar 30-35 %. Sifat fisikokimia dari madu klanceng dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sifat Fisikokimia dari Madu Klanceng (Souza dkk., 2006)

Sifat Fisikokimia	Madu Lebah Tak Bersengat (Madu Klanceng)
Kenampakan	Coklat amber
Kelembaban (%)	25,02
pH	3,05-4,55
Gula Pereduksi (%)	55-86
Glukosa (%)	8,20-30,98
Fruktosa (%)	31,11-40,20
Sukrosa (%)	0,31-1,26
Konduktivitas (mS/cm)	0,49-8,77
Kadar abu (g/100g)	0,01-0,12

Madu dari lebah tidak bersengat ini mengandung senyawa seperti *protocatechuic acid* (PCA), *4-hydroxyphenylacetic acid*, dan *cerumen* yang berfungsi sebagai antioksidan. PCA yang merupakan antioksidan kuat dapat meningkatkan proliferasi sel dalam penyembuhan luka (Kakkar dan Bais, 2014). Madu klanceng memiliki hidrogen peroksida, flavonoid, senyawa fenolik, dan peptida antibakterial yang berperan sebagai antibakteri (Jalil dkk., 2017). Madu ini juga memiliki efek bakteristatik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri seperti *E. coli*, *B. subtilis*, *P. syringae*, *M. luteus*, *B. megaterium*, dan *B. brevis* (Garedew dkk., 2003).

Hidrogen peroksida meningkatkan produksi sitokin sebagai respon untuk membunuh bakteri. Hidrogen peroksida dapat menarik leukosit ke daerah luka melalui mekanisme gradien konsentrasi. Madu juga dapat menstimulasi limfosit B, limfosit T, dan neutrofil untuk melawan bakteri (Ball, 2007). Flavonoid memiliki mekanisme antibakteri seperti menghambat sintesis asam nukleat, fungsi membran sitoplasmik, dan metabolisme energi sehingga bakteri tidak dapat berkembang (Cushnie dan Lamb, 2005). Senyawa fenolik dapat merusak struktur membran bakteri sehingga dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri (Mace dkk., 2017). Peptida antibakterial dapat menempel dan membuka dinding/membran sel bakteri sehingga bakteri lisis atau mati (Bechinger dan Gorr, 2017).

Sifat atau efek antiinflamasi pada madu diberikan atau disumbangkan oleh senyawa fenolik. Senyawa fenolik dapat menghambat produksi berlebih dari mediator inflamasi seperti nitrat oksida (NO), *tumor necrosis factor* (TNF),

dan prostaglandin E₂ (PGE₂). Senyawa fenolik juga dapat menjadi penangkal radikal bebas sehingga dapat melindungi sel dari sitotoksik yang diinduksi mediator inflamasi (Aljadi dan Kamaruddin, 2004; Alvarez-Suarez dkk., 2010).

Madu juga dapat mengurangi oedema yang terjadi saat inflamasi dan menurunkan tekanan hidrostatis mikrovaskuler jaringan luka sehingga tidak membatasi akses oksigen dan nutrisi untuk penyembuhan luka (Jalil dkk., 2017). Agen antiinflamasi memiliki korelasi yang mirip dengan antioksidan dalam hal menangani *reactive oxygen species* (ROS). Madu lebah klanceng memiliki senyawa fenolik dan antioksidan sehingga dapat memperkuat kemampuannya dalam melawan proses inflamasi (Molan, 2011).

C. Jenis Sediaan Salep dan Basis Salep

Salep merupakan sediaan semi padat yang digunakan untuk obat luar, dapat dioleskan ke kulit tanpa perlu pemanasan atau tekanan. Syarat yang penting untuk sebuah sediaan salep adalah bahan obat yang terkandung harus terdispersi homogen atau terbagi merata. Homogenitas salep ditentukan dengan mengoleskan salep ke kaca transparan dan harus menunjukkan susunan yang homogen atau tidak terdapat butiran maupun gumpalan (Syamsuni, 2005).

Salep harus memiliki pH sekitar 4,5 – 6,5 yang aman bagi kulit. Salep dapat menyebar dengan mudah dan tidak menimbulkan gesekan ketika dioleskan (Nayeem dan Karvekar, 2011). Daya sebar salep yang baik adalah 5-7 cm dan daya lekat salep yang memenuhi syarat adalah tidak kurang dari 4 detik (Lestari dkk., 2017).

Parameter pengukuran karakteristik dan stabilitas yang dilakukan meliputi uji homogenitas, uji organoleptik, uji daya lekat, uji daya sebar, uji iritasi, dan peninggalan warna (Depkes RI, 1995). Efektivitas sediaan salep merupakan ukuran yang menyatakan seberapa besar target tercapat. Target atau parameter yang diamati dari salep yang diuji seperti penyusutan panjang luka dan pembentukan zona hambat (Gennaro, 2001).

Salep dibuat dengan mencampurkan zat yang memiliki khasiat obat dengan dasar salep atau vehikulum. Berdasarkan kegunaannya, salep dapat dikelompokkan menjadi salep epidermis, salep mukosa, salep endodermik, krim, dan gel. Salep epidermis merupakan salep yang digunakan untuk melindungi kulit atau mengobati epitelium, dan basis salep yang sering dipakai adalah vaselin atau hidrokarbon (Joenoës, 1998).

Salep mukosa adalah salep yang digunakan untuk melindungi dan mengobati mukosa. Basis salep yang dapat digunakan untuk salep mukosa adalah campuran vaselin dengan adeps lanae. Salep endodermik merupakan salep yang mengandung bahan obat yang berpenetrasi melalui kulit sehingga bekerja lebih dalam. Basis salep yang dapat digunakan adalah lemak atau campuran yang mirip dengan lemak manusia. Krim adalah salep yang mengandung banyak air yang mudah dibersihkan dari kulit. Gel merupakan salep encer yang dapat digunakan sebagai kontraseptif. Krim dan gel termasuk dalam salep yang dapat tercuci oleh air (Joenoës, 1998).

Pemilihan basis harus disesuaikan dengan sediaan salep yang dibuat karena basis salep akan memengaruhi efek terapeutik dari salep. Pemilihan

basis salep juga bergantung pada kelarutan dan stabilitas obat dalam basis serta sifat luka pada kulit. Basis salep yang digunakan terbagi menjadi 4 golongan yaitu basis hidrokarbon (minyak), basis serap (bentuk anhidrat), basis yang dapat dicuci air, dan basis yang larut dalam air (Joenoës, 1998).

Basis salep hidrokarbon adalah basis salep yang digunakan sebagai penutup oklusif yang dapat menghambat penguapan dan memiliki sifat sukar dicuci. Kemampuan menyerap air yang rendah menyebabkan basis ini dapat digunakan pada eksudat/luka terbuka (Joenoës, 1998). Basis ini tetap meningkatkan hidrasi kulit sehingga meningkatkan absorpsi zat aktif secara perkutan. Basis salep hidrokarbon dapat bertahan lama di kulit namun memiliki kekurangan daya serap air yang kecil dan meninggalkan noda. Contoh basis salep hidrokarbon adalah vaselin dan parafin (Joenoës, 1998).

Basis serap dibuat dengan penambahan zat yang dapat bercampur dengan hidrokarbon dan zat yang mengandung gugus polar. Basis ini dapat menyerap air namun kekurangannya tidak mudah dicuci karena fase kontinyu adalah minyak (Joenoës, 1998). Basis yang dapat dicuci air merupakan emulsi minyak dalam air. Emulsi dari sediaan padat dikenal sebagai campuran atau dispersi yang relatif stabil dari fase hidrofilik dan lipofilik. Basis yang larut air dibuat dengan campuran polietilen glikol. Kombinasi polietilen glikol dengan bobot molekul tinggi dan rendah akan menghasilkan produk yang konsistensinya seperti salep (Joenoës, 1998).

D. Salep Antibiotik

Contoh salep antibiotik yang beredar di pasaran dan digunakan untuk

mengobati luka dan infeksi pada kulit adalah Kalmicetine. Kandungan utama dari Kalmicetine adalah kloramfenikol. Kloramfenikol merupakan antibiotik semisintetik dan berspektrum luas terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Kloramfenikol memiliki aktivitas bakteriostatik dan bakterisidal bila konsentrasinya ditingkatkan atau digunakan untuk menangani *Streptococcus pneumoniae* dan *Haemophilus influenzae* (Eliakin-Raz dkk., 2015).

Kloramfenikol termasuk golongan antibiotik yang menghambat sintesis protein (Eliakin-Raz dkk.,2015). Kloramfenikol dapat masuk ke sel bakteri dengan melewati membran sel bakteri dan mengikat subunit 50S ribosom dari bakteri. Ikatan tersebut mengganggu aktivitas peptidil transferase, mencegah transfer dari asam amino untuk membentuk rantai peptida dan menghentikan pembentukan ikatan peptida. Sintesis protein dari bakteri terhalang sehingga proliferasi dari bakteri menjadi terhambat dan bakteri tidak dapat berkembang (Versalovic dkk., 2011).

E. Bakteri pada Kulit dan Luka

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk kokus, nonmotil, tidak membentuk spora, dan bersifat fakultatif anaerob. Bakteri *S. aureus* dapat mensintesis enzim katalase yang dapat memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Bakteri *S. aureus* juga dapat hidup di lingkungan yang memiliki kadar garam tinggi dengan konsentrasi hingga 25% (Roberts dan Tompkin, 1996). *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMM) oleh *S. aureus* memfasilitasi bakteri

tersebut berikatan dengan molekul sel inang seperti kolagen, fibronektin, dan fibrinogen (Baron, 1996).

Interaksi antara fibrinogen dan kolagen mendukung penempelan *S. aureus* ke sel inang. Ikatan dan penempelan ini bertujuan supaya *S. aureus* tetap menempel pada inang saat melakukan invasi (Roberts dan Tompkin, 1996). Kemampuan produksi koagulase oleh *S. aureus* dapat melindungi bakteri tersebut dari sistem pertahanan sel inang. Bakteri *S. aureus* dapat mensintesis alfa hemolisin yang dapat membentuk pori pada membran inang dan menyebabkan lisis sel. Infeksi dari *S. aureus* membentuk biofilm yang dapat menghambat proses reepitelisasi dan membuat penyembuhan lama. Biofilm juga melindungi bakteri dari fagositosis dan senyawa antimikrobia (Gordon dan Lowy, 2008; Schierle dkk., 2009).

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri Gram negatif motil yang dapat ditemukan pada infeksi saluran respirasi, infeksi saluran urin, infeksi saluran pencernaan, dan keratitis (Morita dkk., 2014). *P. aeruginosa* juga menimbulkan infeksi pada luka dan dapat menimbulkan nanah berwarna hijau kebiruan (Jawetz dkk., 2001). Bakteri ini dapat hidup dan tumbuh pada kondisi yang aerobik dan anaerobik karena dapat menggunakan oksigen serta nitrat untuk metabolismenya. *P. aeruginosa* dapat ditemukan dimana-mana dan merupakan bakteri yang dapat hidup di berbagai lingkungan (Morita dkk., 2014).

Bakteri ini memiliki resistensi intrinsik terhadap antimikroba karena memiliki pelindung membran luar, adanya *multidrug efflux transporter*, dan inaktivasi antimikroba endogen. Inaktivasi antimikrobia seperti betalaktam

disebabkan oleh bakteri memiliki enzim hidrolitik betalaktamase yang dapat mengganggu ikatan amida dari betalaktam (Poole, 2011). Contohnya, *P. aeruginosa* resisten terhadap betalaktam, kloramfenikol, dan makrolida secara intrinsik (Morita dkk., 2014).

F. Luka dan Proses Penyembuhannya

Luka adalah terganggunya kontinuitas sel-sel yang diikuti dengan penyembuhan sebagai respon untuk memulihkan kontinuitas sel, kerusakan sel, ataupun sel-sel yang hilang (Smeltzer dan Bare, 2002). Luka dapat terjadi karena adanya faktor kesengajaan maupun tidak disengaja. Berdasarkan jenisnya, luka dibagi menjadi dua jenis yaitu luka tertutup dan terbuka. Resiko infeksi dapat terjadi pada luka akibat masuknya mikroorganisme atau benda asing ke luka tersebut (Potter dan Perry, 2006).

Proses penyembuhan luka terbagi dalam 3 fase yaitu inflamasi, proliferasi, dan maturasi. Fase inflamasi terjadi sekitar 0-3 hari, ditandai dengan vasokonstriksi pembuluh yang rusak, dan pelepasan histamin oleh jaringan yang rusak yang menyebabkan vasodilatasi pada pembuluh darah yang tidak rusak sehingga suplai darah ke daerah yang rusak meningkat (Sussman dan Jensen, 1998). Fase proliferasi terjadi sekitar 3-24 hari dimana fibroblas meletakkan substansi dasar dan serabut kolagen untuk menutup luka atau kerusakan yang terbentuk (Morison, 2004). Fase maturasi terjadi sekitar 24-365 hari. Inflamasi sudah tidak terjadi dan jaringan kulit berwarna merah muda (Sussman dan Jensen, 1998).

Kecepatan proses penyembuhan luka dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti nutrisi, oksigenasi, status imunologi, infeksi, pengobatan, serta teknik operasi. Luka lebih cepat sembuh dengan vaskularisasi yang baik. Nutrisi seperti vitamin C diperlukan supaya hidroksilasi prolin dan lisin terjadi sehingga kolagen dikeluarkan oleh fibroblas. Adanya steroid dan obat-obatan yang toksik dapat menghalangi penyembuhan luka karena terhambatnya pembentukan kolagen (Sjamsuhidajat dan Jong, 1997).

G. Hewan Uji Kelinci

Kelinci domestik atau *Oryctolagus cuniculus* merupakan kelinci yang berasal dari Eropa dan Afrika Utara (Cheeke dkk., 1987). Kelinci ini termasuk dalam hewan herbivor nonruminan atau pseudoruminansia karena memiliki sistem pencernaan monogastrik dengan perkembangan sekum seperti rumen ruminansia. Berikut ini merupakan klasifikasi dari kelinci domestik *Oryctolagus cuniculus* (Cheeke dkk., 1987):

Kingdom : Animalia
 Filum : Chordata
 Classis : Mamalia
 Ordo : Lagomorpha
 Famili : Leporidae
 Genus : *Oryctolagus*
 Spesies : *Oryctolagus cuniculus*

Awal mulanya kelinci termasuk dalam ordo Rodentia yang bergigi seri empat, namun akhirnya dimasukkan ke dalam ordo Lagomorpha karena memiliki gigi seri enam. Beberapa hal yang menjadi ciri khas dari kelinci adalah ukuran tubuh yang kecil dengan berat 1-2 kg, reproduksi hingga 20 anak/tahun, tumbuh dewasa sekitar 4-5 bulan, jarak beranak pendek, dan sifat

genetik yang beragam (Cheeke dkk., 1987).



Gambar 3. Kelinci domestik *Oryctolagus cuniculus* (Sumber : Adam, 2007)

Kelinci memiliki kepekaan tinggi terhadap suhu lingkungan yang tinggi (di atas 30°C) dan kelembaban udara yang tinggi (di atas 65%). Suhu lingkungan yang ideal bagi kelinci sebesar 15-20°C. Jika suhunya melebihi suhu ideal maka dapat mengganggu kesehatan dan produktivitas dari kelinci (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Gangguan kesehatan dapat berupa stress, infertilitas, dan kematian (Whary dkk., 1993).

H. Hipotesis

1. Karakteristik sediaan salep madu klanceng ditunjukkan dengan sifat fisik yang homogen, memiliki pH 4,55 yang aman bagi kulit, memiliki daya sebar sekitar 2,1-2,7 cm dan daya lekat selama 3 menit, serta tidak menimbulkan gesekan saat dioles (Sinambela dkk., 2013).
2. Salep madu klanceng efektif dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *P. aeruginosa* dengan zona hambat sebesar 5 mm (Garedew dkk., 2003).
3. Salep madu klanceng dapat meningkatkan proses penyembuhan luka pada kelinci berupa penyusutan panjang luka hingga 1 cm dalam waktu 1 minggu (Paju dkk., 2013).