

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia adalah salah satu negara berkembang yang masih memiliki banyak masalah kesehatan. Penyakit infeksi adalah salah satu masalah utama kesehatan yang paling sering terjadi dan menjadi penyebab kematian terbanyak di Indonesia dan negara-negara berkembang. Infeksi paling sering terjadi pada anak-anak. Data World Health Organization (WHO) tahun 2012 menunjukkan bahwa tingkat kematian anak <5 tahun di Indonesia disebabkan dengan penyakit infeksi dengan presentasi 1% - 20%.¹ Data World Health Organization (WHO) tahun 2014 juga menyebutkan bahwa infeksi dapat menewaskan 3,5 juta orang yang sebagian besar anak-anak dan orang-orang dengan berpenghasilan menengah kebawah. Data lain dari World Health Organization (WHO) tahun 2015 disebutkan bahwa 85% kejadian kematian dapat disebabkan oleh adanya infeksi dan kondisi gizi pada anak-anak. Data World Health Organization (WHO) tahun 2018 juga menyatakan bahwa angka kejadian infeksi meningkat, salah satunya pada penyakit demam tifoid dengan jumlah kasus berkisar 11-12 juta atau sekitar 128.000-161.000 angka kematian.² Menurut data Riskesdas pada tahun 2018 perkembangan penyakit infeksi di Indonesia dapat dilihat dari data beberapa penyakit infeksi seperti infeksi saluran pernafasan atas (ISPA) dengan prevalensi 25% dan merupakan penyakit infeksi yang paling sering terjadi dimasyarakat, kemudian hepatitis meningkat menjadi 1,2% dan diare pada semua usia di Indonesia mencapai 7%.³ Menurut data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes) tahun 2018 penyakit infeksi masih menjadi perhatian terutama pada prevelensi kasus TB paru yang masih meningkat 0,4% dan Pneumonia yang meningkat dari 1,6% menjadi 2%.⁴

Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh masuk dan berkembangbiaknya mikroorganisme yang bersifat patogen ke dalam

organ tubuh manusia. Mikroorganisme tersebut meliputi bakteri, fungi, parasit, dan virus. Infeksi yang disebabkan oleh bakteri yang bersifat patogen adalah infeksi yang cukup sering terjadi. Bakteri yang paling sering menyebabkan terjadinya infeksi adalah bakteri *Streptococcus beta-hemolyticus group A (GAS)* atau sering disebut bakteri *Streptococcus pyogenes*.¹ Spesies dari Bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah yang paling patogen pada manusia dan merupakan satu dari 10 patogen teratas penyebab kematian.⁵ Kematian oleh infeksi bakteri *Streptococcus pyogenes* cukup tinggi mencapai 25% dengan jumlah kasus sebanyak 650.000 kasus setiap tahunnya.⁶

Bakteri *Streptococcus pyogenes* sering menyebabkan terjadinya penyakit dengan infeksi ringan hingga penyakit dengan infeksi invasif yang lebih parah. Infeksi yang diebabkan oleh bakteri ini dapat meliputi infeksi pada saluran pernafasan dengan jumlah kasus sebanyak 27%, infeksi pada kulit sebanyak 7-10% kasus, infeksi pada saluran cerna sebanyak 5% kasus, dan infeksi pada saluran kemih sebanyak 0,7-0,9% kasus.¹ Hal tersebut dapat disebabkan karena *Streptococcus pyogenes* memiliki berbagai protein eksotoksin, superantigens dan faktor virulensi lain. *Streptococcus pyogenes* dapat ditularkan dari orang ke orang melalui rongga mulut, kulit, dan luka yang kemudian akan berkolonisasi dan menginfeksi.⁶

Penyakit infeksi terutama yang disebabkan oleh infeksi bakteri yang salah satu bakterinya adalah *Streptococcus pyogenes* sering diobati dengan menggunakan antibiotik. Antibiotik yang paling sering digunakan adalah amoxicillin dan ciprofloksasin. Namun resistensi antibiotik juga terus berkembang sehingga infeksi yang ditimbulkan kembali akan sulit untuk disembuhkan dengan antibiotik yang sebelumnya digunakan. Hal ini terjadi karena ketidakpatuhan pasien terhadap penggunaan obat antibiotik.^{6,7} Bahan alami dinilai lebih aman digunakan dibandingkan obat kimia. Efek samping yang ditimbulkan oleh bahan alami terbilang relatif lebih kecil dibandingkan dengan obat kimia.⁶

Madu adalah salah satu bahan alami yang sudah sejak lama digunakan dalam berbagai pengobatan penyakit, salah satunya sebagai antibakteri.⁷ Di Indonesia terdapat beberapa jenis madu yaitu, madu ternak (monofloral) yang nektarnya diperoleh dari satu jenis tumbuhan dan madu hutan (multifloral) yang berasal dari nektar beberapa jenis tumbuhan dan diproduksi oleh lebah-lebah yang berada di hutan, sehingga hal ini juga memungkinkan aktivitas antibakteri di dalam madu hutan lebih bervariasi.^{8,9} Beberapa daerah yang terkenal sebagai penghasil madu hutan diantaranya adalah Pulau Sumbawa, Provinsi Riau, Provinsi Kalimantan Barat, Provinsi Sulawesi Selatan, Provinsi Sulawesi Tenggara, Provinsi Bangka Belitung, dan beberapa daerah di Pulau Jawa.¹⁰ Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mira Andam Dewi, Rahmana Emran Kartasasmita, dan Marlia Singgih Wibowo pada tahun 2017 menunjukkan bahwa madu asli lebah yang berasal dari beberapa daerah, dapat menghambat adanya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada konsentrasi 100% dengan daya hambat kuat. Madu yang digunakan terdiri dari empat madu asli dari Maribaya, satu madu asli dari Gunung Halu, dan satu madu asli dari Kepulauan Riau.¹¹ Penelitian yang dilakukan oleh Evi Puspita Sari pada tahun 2020 menunjukkan bahwa efektivitas madu ternak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi tertentu, dimana pada penelitian tersebut madu yang digunakan adalah madu murni hasil peternakan lebah (monofloral) dari spesies *Avis meliver*, dengan menggunakan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Hasil percobaan tersebut memberikan gambaran bahwa madu murni hasil ternak dengan konsentrasi 20%-40% tidak memiliki daya hambat, konsentrasi 60% memiliki daya hambat lemah dan dengan konsentrasi 100% memiliki daya hambat sedang.⁶

Maka dari uraian tersebut peneliti tertarik untuk menguji efektivitas madu, dengan menggunakan madu hutan (multifloral) yaitu Madu Hutan Baduy yang berasal dari Provinsi Banten dan Madu Hutan Pematang

Rebah yang berasal dari Provinsi Riau terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* In Vitro.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimanakah efektivitas antibakteri madu hutan Pematang Rebah dan madu hutan Baduy terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* in vitro?

1.3. Hipotesis Penelitian

1.3.1 Hipotesis Alternatif (Ha)

Ditemukan adanya daya hambat antibakteri madu terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk menilai efektivitas madu terhadap pertumbuhan kuman *Streptococcus pyogenes*.

1.4.2. Tujuan Khusus

1. Untuk menilai daya hambat madu hutan Pematang Rebah dan madu hutan Baduy.
2. Untuk mengetahui kadar madu hutan Pematang Rebah dan madu hutan Baduy dengan daya hambat terbesar.
3. Untuk membandingkan daya hambat madu hutan Pematang Rebah dan madu hutan Baduy dengan kontrol positif.
4. Untuk membandingkan daya hambat madu hutan Pematang Rebah dan madu hutan Baduy dengan kontrol negatif.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Bagi Peneliti

Menambah pengetahuan, wawasan dan pengalaman peneliti tentang efektivitas antibakteri madu terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*.

1.5.2. Bagi Masyarakat

Memberikan wawasan kepada masyarakat mengenai manfaat dan kegunaan madu sebagai antibakteri.

1.5.3. Bagi Instansi

Menambah referensi di Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan dan pelayanan kesehatan setempat sehingga penelitian ini dapat dipergunakan sebagai dasar dalam melakukan penelitian yang lebih lanjut.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Madu

2.1.1. Definisi Madu

Madu adalah cairan alami organik yang dihasilkan oleh lebah yang memiliki rasa manis. Madu yang dihasilkan oleh lebah didapatkan pada sari bunga dan bagian tanaman lain atau hasil dari ekskresi serangga.^{12,10} Madu berbentuk larutan jenuh yang secara umum terdiri dari fruktosa dan glukosa serta mengandung asam amino, vitamin, enzim, mineral dan komponen mikro lainnya.¹⁰

2.1.2. Kegunaan Madu

Sejak zaman dahulu madu tidak hanya dikenal sebagai pemanis saja, tetapi juga digunakan sebagai pengobatan.^{7,13} Kegunaan madu sendiri sudah diakui oleh seluruh dunia dan secara tradisional banyak digunakan oleh orang Mesir, Romawi dan Cina untuk menyembuhkan luka dan gangguan pada saluran pencernaan seperti usus dan lambung. Di India sendiri secara tradisional madu digunakan sebagai obat infeksi mata.¹⁴

Seiring dengan kemajuan teknologi maka banyak penelitian yang menguji kegunaan madu sendiri. Khasiat madu dipercaya sebagai antibakteri terutama yang berkaitan dengan proses penyembuhan luka seperti mensterilkan luka, merangsang pertumbuhan kulit kembali, mengurangi edema dan mengurangi bekas luka, hal ini juga berhubungan dengan kejadian luka infeksi pada saluran pencernaan. Selain itu madu juga berkhasiat sebagai antivirus dimana pada kejadian sel melanoma ganas oleh virus *varicella zooster* dan infeksi oleh virus influenza ditemukan adanya pengurangan plak dan penurunan daya tumbuh plak oleh virus. Madu juga dipercaya sebagai antijamur pada berbagai infeksi *candida* dan *rhodotorula sp.* Madu juga dipercaya dapat berfungsi sebagai antikanker dan antidiabetes yang dikaitkan dengan kandungan antioksidan yang dimiliki oleh madu dan dikaitkan lagi dengan dosis yang digunakan. Selain itu madu memiliki efek perlindungan terhadap sistem

kardiovaskular (trombosit darah, oksidasi LDL, dan peningkatan vasodilatasi koroner), sistem saraf (antihipnotik, ansiolitik, antikonvulsan dan antinosiseptif), sistem pernafasan (inflamasi saluran nafas bawah), dan sistem pencernaan (inflamasi dan ulkus pada saluran pencernaan terutama oleh bakteri *H.pylori*).¹³



Gambar 2.1. Manfaat Madu.¹³

2.1.3. Jenis-Jenis Madu

Komposisi madu sangat ditentukan oleh asal nektar dan jenis lebah yang menghasilkan sekresi madu. Atas dasar tersebut maka madu dikelompokkan atas monofloral dan multifloral bergantung dari asal nektarnya. Madu monofloral adalah madu yang berasal dari satu jenis tanaman dengan karakteristik organoleptik yang unik dan dianggap premium sehingga harganya lebih tinggi dibandingkan multifloral. Madu monofloral ini sendiri dikelompokkan kembali menjadi tiga kelompok berdasarkan sekresi madu (*asal entomologi*) yaitu lebah *apis dorsata* (MMAD), madu ternak monofloral oleh lebah *apis mellifera* (MMAM), dan madu ternak oleh *apis cerana* (MMAC/madu Asia). Selanjutnya ada madu multifloral yaitu madu yang berasal dari beberapa jenis tanaman, contohnya adalah madu hutan yang berasal dari lebah liar.¹⁵

Berdasarkan pengelolaannya madu dibagi atas madu peras dan madu ekstraksi. Madu peras yaitu madu yang didapatkan langsung dari

perasan sarang lebah. Sedangkan madu ekstraksi adalah madu yang berasal dari proses ekstraksi sarang lebah.¹⁶

2.1.4. Kandungan Madu

Madu adalah produk alami yang sudah digunakan beribu tahun yang lalu. Madu juga mengandung komposisi rasa dan warna madu yang berbeda-beda, hal ini dipengaruhi oleh sumber madu, wilayah geografis, iklim, spesies yang terlibat dan proses serta pengolahan madu. Madu dengan berat 1 kg mengandung 3.280 kalori atau setara dengan 50 butir telur atau 5,575 liter susu atau 1,680 kg daging.¹⁷ Madu adalah zat yang tidak perlu disimpan pada suhu dingin tetapi dapat disimpan pada keadaan terbuka pada suhu kamar. Aktivitas air di dalam madu berkisar antara 0,56-0,62 dengan pH madu berkisar sampai 3,9.^{18,19}

Madu mengandung sekitar 180 berbagai jenis senyawa yang berbeda-beda yang terdiri dari air (16,9-18 gram/100 gram madu), fruktosa (35,6–41,8 g/100 gram madu), glukosa (25,4–28,1 g/ 100 gram madu), maltosa (1,8-2,7 g/100 gram madu), sukrosa (0,23-1,21 g/100 gram madu), asam amino (0,50- 1 g/100 gram madu), protein (0,50- 1 g/100 gram madu), mineral (0,50- 1 g/100 gram madu), dan vitamin (0,50- 1 g/100 gram madu). Kandungan terbesar madu juga adalah karbohidrat yang berkisar 95-97% berat kering madu (64,9–73,1 g/ 100 gram madu).^{13,18} Sejumlah kecil kandungan protein yang ada dalam madu hadir dalam bentuk enzim dan asam amino bebas, kecuali asparagin dan glutamin. Kandungan utama asam amino dalam madu adalah prolin dan kandungan lain seperti alanin, fenilalanin, tirosin, asam glutamat, isoleusin, dan leusin. Selanjutnya kandungan mineral di dalam madu terdapat kalium, kalsium, tembaga, besi, magnesium, mangan, fosfor, natrium dan seng. Kandungan vitamin juga terdapat pada madu yang terdiri dari asam askorbat (vitamin C), tiamin (B1), riboflavin (B2), niasin (B3), asam pantotenat (B5), dan piridoksin (B6).^{13,19}

Madu juga mengandung beberapa asam-asam utama antara lain asetat, butirat, format, glukonat, laktat, maleat, oksalat, piroglutamat,

sitrat, suksinat, glikolat, α -ketoglutarat, piruvat, 2,3-fosfoglisarat, α,β -gliserofosfat, dan glukosa-6-fosfat. Asam yang utama dalam madu adalah asam glukonat yang dihasilkan oleh dekstroza melalui enzim di dalam madu (glukosa oksidase).¹⁷ Secara umum madu juga memiliki enzim yang berasal dari serbuk sari, enzim tersebut terdiri dari distase, glukosa oksidase, dan intervase. Distase adalah enzim amilolitik yang merupakan faktor dalam menjaga kualitas madu. Senyawa bioaktif yaitu fenolik juga terdapat dalam madu, yaitu senyawa organik dengan cincin aromatik yang saling terikat satu atau tambahan yang terhidrogenasi dengan adanya turunan fungsional. Senyawa ini juga berperan dalam antioksidan, antibakteri, antijamur, antivirus, antijamur, dan antiinflamasi.¹³

2.1.5. Efek Antibakteri Madu

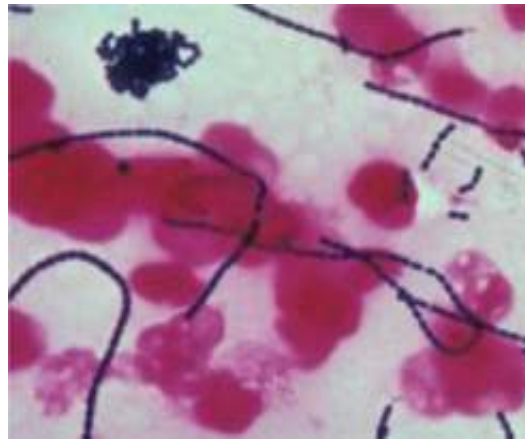
Madu memiliki aktivitas antibakteri yang faktor utamanya dipengaruhi oleh adanya reaksi oksidasi glukosa enzimatis dan beberapa faktor fisik madu. Faktor tekanan osmotik yang tinggi, aktivitas air yang rendah (A_w), pH rendah/lingkungan yang asam, protein rendah, rasio karbohidrat dan nitrogen yang tinggi, tingkat gula pereduksi yang tinggi, viskositas madu, senyawa fenolik dan hidrogen peroksida juga mempengaruhi efek antibakteri pada madu yaitu membuat pertumbuhan bakteri terhambat dan merusak struktur bakteri. Namun pada beberapa penelitian madu dengan kandungan non-peroksida juga memiliki efek bakteri yang digantikan oleh peran dari metilglioksal.^{13,18}

2.2. Bakteri *Streptococcus pyogenes*

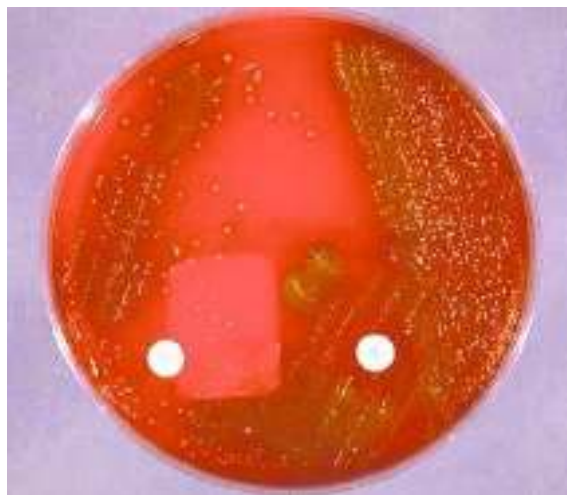
Streptococcus pyogenes adalah bakteri sferis gram positif yang berpasangan dan membentuk rantai selama pertumbuhannya. Bakteri ini terdiri dari kokus dengan diameter 1-2 mm. *Streptococcus pyogenes* mempunyai antigen group A, yaitu substansi spesifik yang ditentukan oleh suatu gula amino, dimana bakteri jenis ini gula aminonya adalah rhamnose-*N*-acetylglucosamin.²⁰ Rhamnose-*N*-acetylglucosamine adalah turunan dari monosakarida glukosa yang berfungsi sebagai komponen

polisakarida homogen, komponen dasar hialuronat dan keratin sulfat pada permukaan sel.²¹

Bakteri *Streptococcus pyogenes* juga merupakan bakteri hemolisis β yaitu bakteri yang dapat melisis secara sempurna eritrosit yang dapat dinilai dari bersihnya daerah sekitar pertumbuhan bakteri. Hemolisis β yang dihasilkan oleh bakteri ini cukup luas, dengan zona-zona berdiameter 1 cm di setiap koloni berukuran lebih dari 0,05 mm. Bakteri ini juga bersifat PYR-positif yang dapat menghidrolisis 1-pyrrolidonyl-2-naphtylamide dan biasanya sensitif terhadap basitrasin.²⁰ *Streptococcus pyogenes* adalah bakteri prototipe patogen pada manusia dan tidak ada alat tubuh atau jaringan dalam tubuh yang kebal terhadap bakteri ini.²²



Gambar 2.2. Bakteri *Streptococcus pyogenes*.²⁰



Gambbar 2.3. Hemolisis *Streptococcus pyogenes*.²³

2.2.1. Taksonomi *Streptococcus pyogenes*

Divisi	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacili
Ordo	: Lactobacillales
Famili	: Streptococcaceae
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Spesies	: <i>Streptococcus pyogenes</i> ²⁴

2.2.2. Morfologi *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes terdiri dari kokus dengan diameter 1- 2 mm yang berbentuk bulat atau ovoid yang tersusun memanjang menyerupai rantai. Kokus pada bakteri ini akan membelah diri pada bidang yang tegak lurus terhadap sumbu panjang rantai. Panjang bakteri ini bisa bervariasi yang terdiri dari delapan buah kokus atau lebih. Variasi tersebut dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Bakteri ini bersifat gram positif, namun seiring bertambahnya usia kultur dan kematian bakteri, bakteri ini bisa menjadi bakteri gram negatif. Pada sebagian bakteri hal ini juga dapat terjadi setelah inkubasi selama satu malam. *Streptococcus pyogenes* memiliki kapsul yang tersusun oleh asam hialuronat yang dapat menghambat fagositosis. Dinding sel nya mengandung protein (antigen M, T, dan R), karbohidrat (spesifik-group), peptidoglikan, dan terdapat pili (seperti rambut) yang menonjol keluar kapsul yang tersusun oleh protein M dan diselubungi oleh *lipoteichoic acid* yang penting untuk perlekatan bakteri pada sel epitel.^{20,22}

2.2.3. Karakteristik Pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*

Bakteri *Streptococcus pyogenes* bersifat anaerob fakultatif dan biasanya akan hidup pada daerah dengan tekanan O₂ yang harus dikurangi, kecuali pada enterokokus. Oleh karena itu untuk meningkatkan pertumbuhan dan hemolisis diperlukan CO₂ 10% dalam masa inkubasi bakteri. Bakteri dapat tumbuh baik pada Ph 7,4-7,6 dan suhu optimum pertumbuhannya adalah 37°C sedangkan pada suhu 40°C bakteri akan

tumbuh lebih lambat. Pertumbuhan bakteri ini juga akan lebih subur bila diberi glukosa berlebih dan bahan yang dapat menetralkan asam laktat berlebih.^{20,22}

Streptococcus pyogenes dapat tumbuh dengan mudah dalam semua *enriched media*, namun pada isolasi primer digunakan media yang mengandung darah lengkap, serum atau transudat misalnya asites atau pleura. Penambahan glukosa 0,5% dan asam laktat dapat menjadi sumber energi untuk bakteri ini meningkatkan pertumbuhannya, namun dapat menyebabkan penurunan pada daya lisisnya terhadap sel darah merah. Bakteri jenis ini juga sensitif terhadap cakram basitrasin 0,2 µg, sifat ini digunakan untuk membedakan bakteri ini dengan bakteri lainnya yang resisten terhadap basitrasin. Koloni yang dibentuk oleh bakteri ini adalah mengkilap ataupun buram. Koloni berbentuk buram biasanya menghasilkan organisme yang mengandung protein M dan biasanya bersifat virulen. Sedangkan pada koloni yang mengkilap biasanya menghasilkan protein M yang lebih sedikit dengan sifat yang kurang virulen.^{20,22}

2.2.4. Daya Tahan Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Bakteri *Streptococcus pyogenes* dapat bertahan hidup dalam beberapa minggu pada sputum, eksudat, dan ekskreta pada binatang. Dengan media biasa pada suhu kamar bakteri ini juga dapat bertahan hidup, dan pada hari ke-10 sampai ke-14 bakteri akan mati. Beberapa varietas juga akan mati pada suhu 55°C dalam waktu 10 menit dan semua varietas akan mati pada suhu 60°C selama 30-60 menit. Bakteri ini juga akan mati dalam 15 menit pada zat kimia dengan konsentrasi zat berikut, yaitu iodium tinctura (1/50), fenol (1/200), kresol (1/175), HgCl₂ (1/200-1/500), merkurokrom (1/50), heksilresorsinol (1/1000).²²

2.2.5. Struktur Antigen Bakteri *Streptococcus pyogenes*

a) Protein M

Struktur antigen ini berbentuk spiral mirip batang yang memisahkan unit fungsional serta bersifat tahan panas, resisten terhadap

fagositosis dan sensitif terhadap tripsin. Bentuk spiral yang dimiliki oleh bakteri ini menyebabkan adanya kemungkinan terjadi perubahan pada sejumlah besar rangkaian, namun fungsinya tetap dapat dipertahankan. Substansi ini adalah faktor virulensi mayor pada bakteri *Streptococcus pyogenes*. Keberadaan protein ini menandakan bahwa bakteri bersifat virulen dan menyebabkan bakteri dapat bertahan terhadap fagositosis oleh leukosit polimorfonukleus. Sebaliknya, bakteri tanpa substansi protein M tidak akan bersifat virulen. Tipe protein M sendiri berjumlah kurang lebih 150 serotipe, sehingga memungkinkan individu mengalami infeksi berulang oleh bakteri ini.^{20,25}

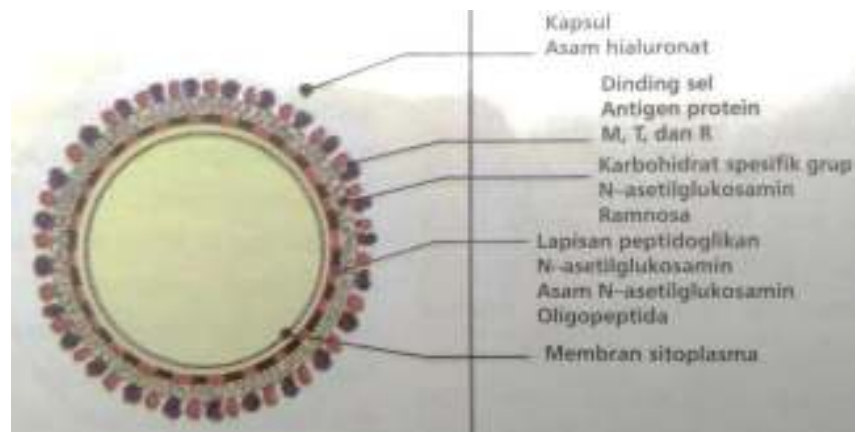
Protein M dibagi atas dua kelas berdasarkan reaktivitas antibodi terhadap fraksi C, yaitu kelas I, yang mengandung epitop yang terekspose dengan permukaan yang akan bereaksi dengan antibodi faktor opasitas negatif dan kelas II, yang tidak mengandung epitop serta tidak bereaksi pada fraksi anti-C, serta merupakan faktor opasitas positif. Umumnya protein M penyebab pioderma dan faringitis adalah protein M kelas II.²⁵

b) Substansi T

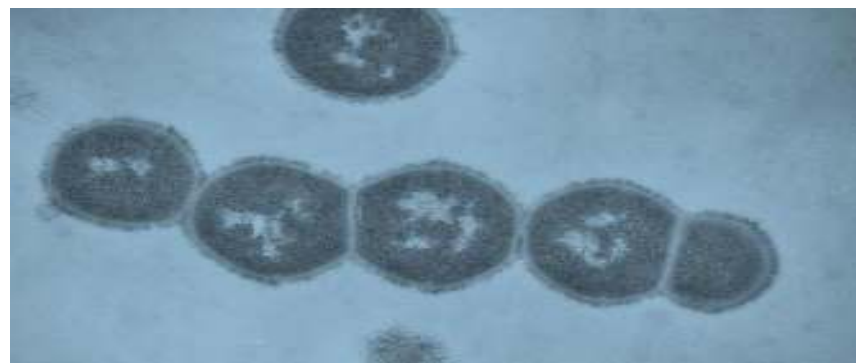
Antigen ini tidak memiliki hubungan dengan faktor virulen yang terdapat pada bakteri *Streptococcus pyogenes*. Substansi T ini sendiri akan mengalami kerusakan pada keadaan asam dan tindakan pemanasan. Substansi T dihasilkan dari hasil enzim proteolitik. Substansi ini juga memungkinkan bakteri mengalami diferensiasi melalui aglutinasi dengan antiserum spesifik.^{20,22}

c) Protein R

Protein R adalah antigen yang tahan terhadap tripsin dan tidak tahan terhadap pepsin. Sama dengan substansi T, antigen ini akan rusak pada kondisi asam dan perlakuan pemanasan serta oleh enzim proteolitik.²²



Gambar 2.4. Struktur antigen *Streptococcus pyogenes*.²²



Gambar 2.5. Struktur Protein M pada pembesaran 50.000x.²⁶

2.2.6. Toksik Eritogenik dan Enzim pada *Streptococcus pyogenes*

Toksik dalam bakteri ini dapat bertahan selama beberapa jam pada suhu 60°C, dan akan rusak pada air mendidih dalam waktu 1 (satu) jam. Hal ini juga yang memungkinkan terjadinya *rash* dan *febris scarlatina*. Reaksi Schultz-Charlton adalah reaksi yang dapat digunakan untuk membuktikan apakah *rash* disebabkan oleh toksik eritrogenik atau tidak. Pada *rash* akan disuntikan antitoksin spesifik, jika terjadi pemucatan dan menghilang, maka dapat disimpulkan bahwa *rash* terjadi karena toksin eritrogenik.²²

a) Streptokinase (fibrinolisin)

Streptokinase adalah enzim yang mengubah plasminogen dalam plasma menjadi plasmin, yaitu suatu enzim proteolitik aktif yang mencerna fibrin dan protein lainnya. Enzim ini diberikan secara intravena untuk

terapi embolus paru, penyakit arteri koroner, dan trombosit vena. Enzim ini dihasilkan oleh galur pada bakteri *Streptococcus pyogenes*.²⁰

b) Streptodornase (streptococcal deoxyribonuclease)

Streptodornase adalah enzim yang mendepolimerisasi DNA. Aktivitas enzim ini dapat dinilai dengan penurunan kekentalan DNA. Sebagian besar kekentalan disebabkan oleh adanya deoksiribonukleoprotein. Campuran antara streptodornase dan streptokinase dapat digunakan dalam *debridema enzimatis*, dimana campuran ini dimanfaatkan dalam mencairkan eksudat serta memfasilitasi pengeluaran pus dan pengangkatan jaringan nekrotik. Maka dari itu obat antimikroba akan mempunyai akses yang baik, dan permukaan yang sterinfeksi akan lebih cepat pulih.²⁰

c) Hialuronidase

Enzim ini adalah faktor penyebaran infeksi oleh *Streptococcus pyogenes*. Enzim hialuronidase ini akan memecah asam hialuronat. Enzim ini bersifat antigenik dan spesifik untuk setiap sumber bakteri dan jaringan. Setiap terinfeksi oleh organisme yang menghasilkan hialuronidase, pada pemeriksaan serum akan ditemukan antibodi spesifik.²⁰

d) Diphosphopyridine nukleotidase

Enzim ini diproduksi hanya pada beberapa streptokok, yang dimana memungkinkan adanya keterkaitan organisme untuk menghancurkan leukosit. Beberapa galur juga menghasilkan proteinase dan amilase.²⁰

e) Eksotoksin pirogenik (toksin eitrogenik)

Bakteri *Streptococcus pyogenes* memproduksi eksotoksin A. Eksotoksin ini memiliki fage lisogenik. Eksotoksin pada bakteri ini juga dikaitkan dengan sindrom syok toksik dan demam skarlatina. Eksotoksin pirogenik ini bekerja sebagai superantigen yang dapat memicu sel T dengan berikatan pada kompleks histokompatibilitas mayor kelas II di daerah V_{β} pada reseptor sel T. Selanjutnya sel T yang teraktivasi akan melepas sitokin yang menyebabkan syok dan cedera jaringan.²⁰

f) Hemolisin

Hemolisin pada *Streptococcus pyogenes* terbentuk dua jenis. Yang pertama ada streptolisin O, adalah protein dengan BM 60.000 yang bersifat aktif dalam bentuk tereduksi (ada gugus -SH), namun dapat dengan cepat inaktif dengan adanya oksigen. Streptolisin ini merupakan penyebab hemolisis yang tampak saat pertumbuhan di bagian dalam medium lempeng agar darah. Streptolisin ini juga berikatan secara kuantitatif dengan antistreptolisin O (ASO), yaitu suatu antibodi yang muncul pada manusia pascainfeksi streptokokus yang menghasilkan streptolisin O. Antibodi ini yang kemudian akan menghambat streptolisin O dan merupakan dasar pengujian kuantitatif antibodi. Apabila pada titer ASO terdapat 160-200 unit maka dinilai sebagai penanda infeksi bakteri *Streptococcus pyogenes*. Hemolisin yang kedua adalah streptolisin S yang merupakan agen penyebab hemolitik disekitar koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh dipermukaan lempeng agar darah. Streptolisin ini terbentuk jika ada serum dan bersifat antigenik, namun dapat dihambat oleh inhibitor nonspesifik yang ada pada serum manusia dan hewan serta tidak terkait dengan pajanan streptokok terdahulu.²⁰

2.2.7. Patofisiologi Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Kemampuan virulensi dari bakteri *Streptococcus pyogenes* berkaitan dengan kemampuan perlekatan bakteri pada permukaan sel, kemudian menginvasi ke dalam sel epitel lalu membentuk kolonisasi bakteri yang dapat meningkatkan beragam toksik dan enzim.^{20,22}

Invasi terjadi apabila terjadi pengikatan organisme ke membran mukosa melalui *asam lipotechoic* (LTA) pada dinding sel bakteri. Selanjutnya bakteri akan bertahan terhadap fagositosis, mulai memperbanyak diri dan mulai menginfeksi. Protein M adalah faktor virulensi utama, protein ini akan mengikat fibrinogen pejamu dan kemudian akan menghalangi terjadinya pengikatan komplemen ke peptidoglikan yang memungkinkan organisme bertahan dengan

menghambat fagositosis. Strain pada protein M berkembang dengan cepat pada manusia dan sangat mudah memulai perjalanan suatu penyakit. Selain adanya protein M sebagai faktor virulensi, ditemukan bahwa terdapat C5A peptidase yang menjadi faktor virulensi tambahan yang dapat menghancurkan sinyal kimia dengan memotong komponen C5A pada jalur komplemen.²⁷

Bakteri *Streptococcus pyogenes* juga memiliki mekanisme pertahanan untuk menghindari opsonisasi dan fagositosis. Dengan adanya proses pengikatan protein M pada faktor H dari β -globulin serum dimana faktor ini merupakan protein regulator untuk jalur alternatif dari komplemen. Mediator pada proses fagositosis tidak stabilkan oleh faktor H. Saat komponen komplemen terikat pada permukaan sel di regio protein M, maka akan terjadi degradasi oleh faktor H dan fagositosis akan tercegah.²⁷

2.2.8. Manifestasi Klinis *Streptococcus pyogenes*

- a) Penyakit oleh invasi *Streptococcus pyogenes* (streptokok group A hemolitik β)

Port d'entree bakteri ini memberikan gambaran klinis utama, tetapi pada beberapa kasus terdapat infeksi difus yang dapat menyebar dengan cepat dan melibatkan jaringan serta meluas yang mengikuti aliran limfatik dan menimbulkan supurasi lokal minimal.²⁰

Penyakit yang sering terjadi seperti *erisipelas* dengan *port d'entrée* adalah kulit yang akan disertai dengan pembengkakan edema masif yang keras dan cepat meluas. Lalu ada *selulitis* yang menginfeksi kulit dan jaringan subkutan yang berhubungan dengan adanya luka bakar, insisi dan trauma yang disertai dengan adanya rasa nyeri, bengkak dan eritema dengan lesi yang tidak meninggi dan berbatas tegas. Infeksi juga dapat terjadi pada jaringan subkutan dan fasia yang dapat menimbulkan nekrosis yang luas sehingga disebut sebagai *fasiitis nekrotikans*. Demam nifas juga adalah penyakit infeksi yang terjadi apabila bakteri masuk ke uterus saat postpartum oleh luka pada kasus endometritis.^{20,22}

b) Penyakit oleh infeksi lokal *Streptococcus pyogenes* dan produk- antaranya

Penyakit infeksi lokal yang paling sering terjadi adalah nyeri tenggorokan dan *pioderma streptococcus*. Nyeri tenggorokan (*faringitis*) oleh bakteri ini akibat adanya perlekatan pada epitel faring dengan pili pada permukaan yang dilapisi *asam lipoteichoic* dan asam *hialuronat*. Penyakit ini bisa bertahan hingga berminggu-minggu dan biasanya terjadi pada anak-anak yang disertai dengan adanya demam, adanya pembesaran getah bening, kecenderungan menyebar ke telinga tengah dan mastoid, eritema dan edema pada membran mukosa serta adanya eksudat purulen. Kasus faringitis di dunia yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus pyogenes* dapat mencapai 616 juta kasus setiap tahunnya. Di Indonesia sendiri faringitis merupakan salah satu penyakit dengan prevalensi yang cukup tinggi. Faringitis di Indonesia paling sering ditemukan pada anak-anak dengan jumlah kasus 18% setiap tahunnya.²⁸ Sedangkan *pioderma streptococcus* adalah infeksi pada lapisan superfisial kulit dan biasa disebut impetigo. Infeksi *pioderma streptococcus* ditandai dengan pecahnya vesikel pada superfisial yang ditutupi pus kemudian menjadi krusta, dapat menyebar melalui kontak langsung pada iklim panas dan lembab serta lebih luas terjadi pada kulit dengan luka atau eksematosa.^{20,22}

c) Infeksi invasi *Streptococcus pyogenes*, sindrom syok toksis streptokokus, dan demam skalartina

Sindrom syok toksis streptococcus adalah infeksi dan invasi berat yang ditandai dengan adanya syok, bakteremia, gagal nafas, dan kegagalan organ multipel. Infeksi ini sering terjadi pada pascatrauma minor pada orang sehat dengan manifestasi infeksi jaringan lunak yang meliputi fasiitis nekrotikans, miositis, dan infeksi pada jaringan lunak. Sedangkan demam skalartina akibat adanya eksitoksin pirogenik yang berkaitan dengan penyakit faringitis. Gejala yang terlihat seperti adanya

ruam pada badan yang berlangsung selama 24 jam dan dapat menyebar hingga ekstremitas. Dua penyakit ini dinilai saling tumpang tindih secara klinis.²⁰

d) Penyakit pascainfeksi *Streptococcus pyogenes*

Setelah terjadinya infeksi akut akan ada periode laten yang terjadi selama 1-4 minggu. Periode laten menandakan penyakit pascainfeksi ini bukan efek langsung bakteri yang menyebar melainkan respon hipersensitivitas. Penyakit yang paling sering terjadi adalah *glomerulonefritis akut* dan *demam rematik*.^{20,22}

Glomerulonefritis akut di picu oleh kompleks antigen antibodi pada membran basal glomerulus, gejala yang ditimbulkan adanya darah dan protein di dalam urin, ditemukan kadar komplemen dan serum rendah. Sedangkan pada demam rematik gejalanya meliputi malaise, demam, poliartritis nonsupuratif yang tidak menetap dan ditemukan adanya peradangan pada semua bagian jantung dengan karditis memperlihatkan adanya penebalan dan deformitas yang menjadi jaringan parut.^{20,22}

2.2.9. Metode Pengujian Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Pada suatu metode penelitian eksperimental pada bakteri, diperlukan adanya tindakan uji bakteri. Manfaat dari uji antibakteri adalah menentukan sistem pengobatan yang efektif dan efisien terhadap suatu bakteri. Hal ini juga membantu untuk mengetahui batas-batas kepekaan suatu senyawa antibakteri terhadap bakteri tertentu. Beberapa cara pengujian antibakteri, yaitu difusi dan dilusi.²⁹

a) Metode Difusi

Metode ini didasarkan pada kemampuan difusi dari zat pada bakteri dalam lempeng agar yang diinokulasikan dengan mikroba uji. Dari uji ini akan terlihat zona hambat yang terbentuk disekeliling antimikroba pada saat inkubasi. Keuntungan metode ini adalah mudah dilakukan karena tidak memiliki alat khusus dan mencakup fleksibilitas yang lebih besar dalam memilih obat yang akan diperiksa, cara pengerjaannya lebih mudah dengan waktu pengerjaan yang tidak terlalu lama serta mudah dalam

melakukan pengukuran zona hambat. Kerugian metode ini tidak dapat diketahui secara pasti penghambat bakterisid ataupun bakteriostatik, dikarenakan banyak faktor yang mempengaruhi, diantaranya ketebalan media, jenis media, dan laju difusi antibakteri dan metode ini hanya mampu menilai kemampuan senyawa antibakteri secara kuantitatif.^{29,30} Ada tiga cara yang digunakan dalam metode ini, yaitu metode cakram, parit dan metode sumuran.³¹

1. Cara Cakram (*Disk*)

Cara ini adalah cara yang paling sering digunakan untuk uji kepekaan bakteri terhadap suatu zat atau obat-obatan. Pada cara ini digunakan suatu cakram kertas (*paper disc*) yang digunakan untuk tempat penampungan zat antimikroba. Selanjutnya kertas saring tersebut diletakan pada lempeng agar yang telah di inokulasi mikroba uji, kemudian akan di inkubasi ada suhu dan waktu tertentu. Umumnya masa inkubasi bakteri 18-24 jam pada suhu 37°C. Pada pengamatan ini dinilai dengan ada atau tidaknya daerah bening yang terdapat pada di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri.³¹

Cara ini memiliki kelebihan dan kekurangan. Kelebihannya adalah cara ini mudah dilakukan, tidak memiliki peralatan khusus dan harganya relatif murah. Sedangkan kelemahannya adalah zona hambat yang terbentuk tergantung pada kondisi inkubasi, inokulum, predifusi, preinkubasi serta kekebalan medium dan pada cara ini tidak dapat diaplikasikan pada mikroorganisme yang pertumbuhannya lambat dan mikroorganisme yang bersifat anaerob obligat.³¹

**Tabel 2.1. Diameter zona terang dan respon hambat pertumbuhan
(Greenwood,1995).³²**

Diameter Zona Terang	Respon Hambatan Pertumbuhan
>20 mm	Kuat
16-20 mm	Sedang
10-15 mm	Lemah
<10 mm	Tidak Ada

2. Cara Parit (*ditch*)

Pada cara ini lempeng agar telah diinokulasikan dengan bakteri uji yang dibuatkan sebidang parit. Parit yang disediakan berisi zat antimikroba, lalu akan di inkubasi pada waktu dan suhu optimum sesuai dengan mikroba uji. Hasil yang dinilai dari cara ini adalah ada tidaknya zona hambat di sekitar parit.³¹

3. Cara Sumuran (*Hole/cup*)

Cara ini menggunakan lempeng agar yang diinokulasikan dengan bakteri uji yang dibuatkan sebuah lubang lalu diisi dengan zat antimikroba uji, lalu di inkubasi pada waktu dan suhu tertentu. Hasilnya dinilai dengan ada tidaknya zona hambat bakteri di sekitar lubang.³¹

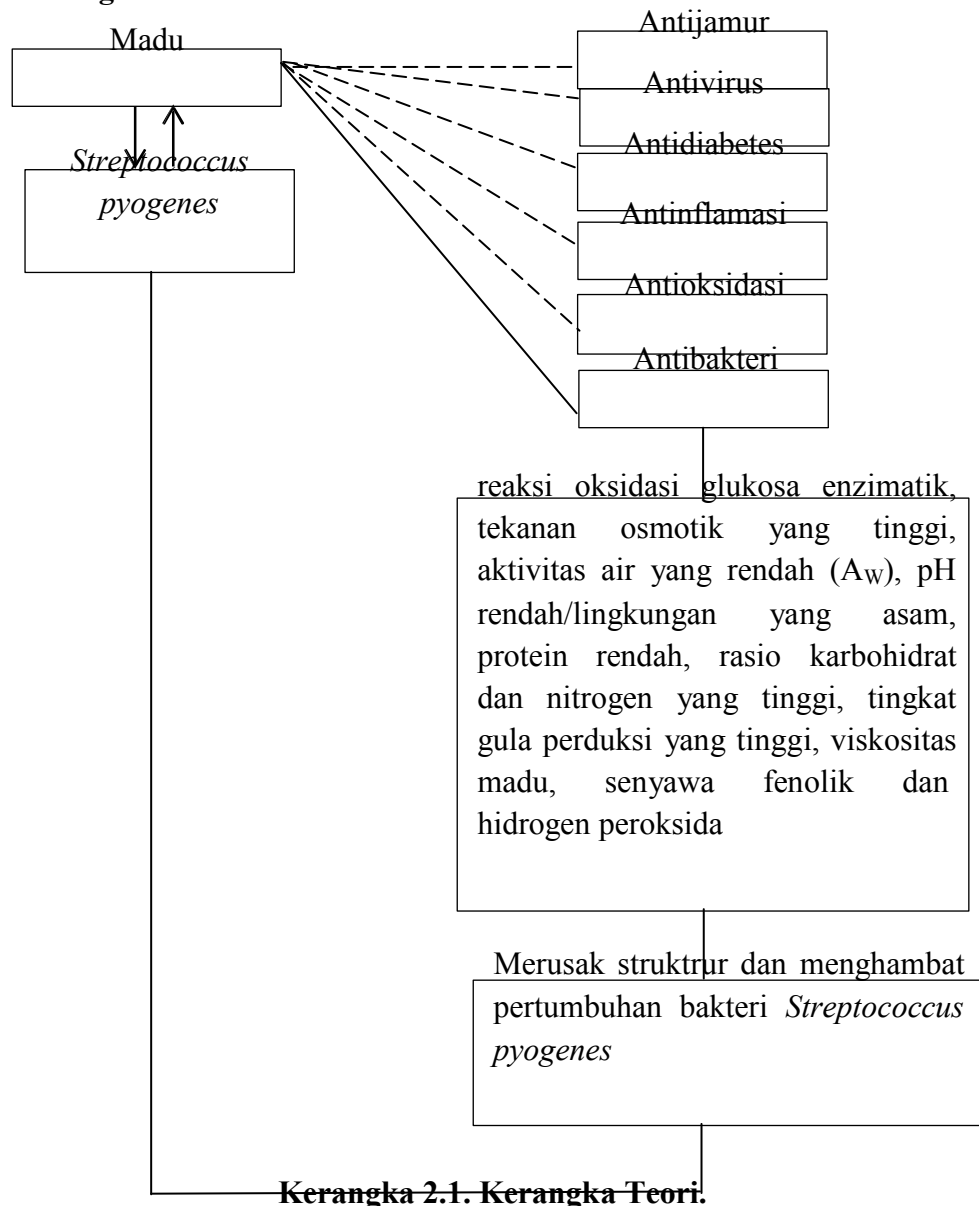
b) Metode Dilusi

Metode ini digunakan untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bakterisidal minimum (KBM) dari obat antimikroba. Prinsip dalam metode ini adalah dengan menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media uji. Ada dua cara yang digunakan pada metode ini yaitu metode dilusi cair dan metode dilusi padat. Metode dilusi cair digunakan untuk mengukur kadar hambat minimum (KHM), yang dilakukan dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang kemudian ditambahkan dengan mikroba uji, pada metode ini KHM obat ditunjukkan dengan hasil konsentrasi dalam tabung dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih. Metode dilusi padat adalah metode yang digunakan untuk menentukan kadar bakterisidal minimum

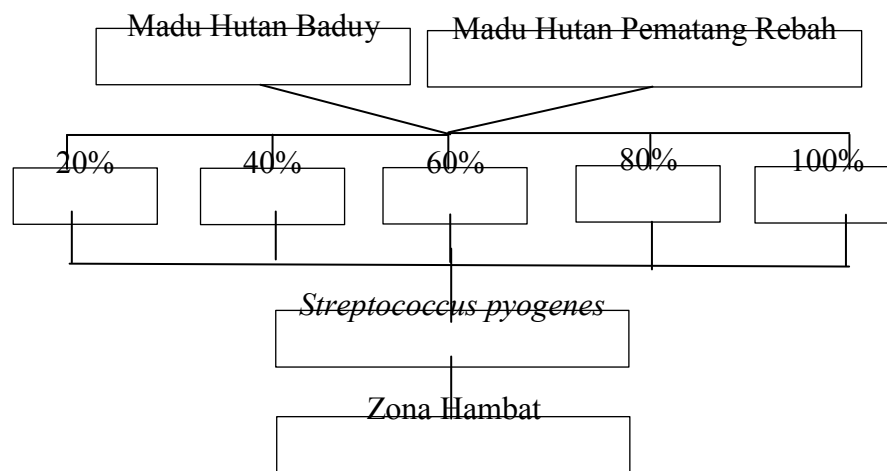
(KBM), yang dilakukan dengan menginokulasi mikroba uji pada media agar yang mengandung agen antimikroba, pada metode ini KBM obat ditunjukkan dengan konsentrasi terendah obat dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba.³⁰

Keuntungan metode dilusi adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa agen mikroba uji dan kemampuan senyawa antibakteri dapat dinilai secara kuantitatif dan kualitatif, namun proses pengerjaan metode ini lebih rumit dan biaya yang digunakan relatif lebih mahal.²⁹

2.3. Kerangka Teori



2.4 Kerangka Konsep Penelitian



Bagan 2.2. Kerangka Konsep Penelitian

BAB 3

METODOLOGI

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni laboratorium (*True Eksperimental*) secara *in vitro* dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Desain*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi cakram pada media *Muller Hinton Agar* (MHA).

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen.

3.2.2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2022 sampai dengan Oktober 2022.

3.3. Sampel Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus pyogenes* yang di kultur dalam media agar agar miring yang berasal dari Indilab di Kota Samarinda.

3.4. Sampel Uji

Sampel dalam penelitian ini adalah madu hutan Pematang Rebah yang berasal dari Provinsi Riau dan madu hutan Baduy yang berasal dari Provinsi Banten.

3.5. Estimasi Besar Sampel

Estimasi besar sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini ada 7 (tujuh) perlakuan sampel yang terdiri dari madu dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, amoxicilin sebagai kontrol positif dan aquades steril sebagai kontrol negatif. Pengulangan yang valid dihitung dengan rumus federer :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(7-1)(r-1) \geq 15$$

$$6(r-1) \geq 15$$

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 15+6$$

$$6r \geq 21$$

$r \geq 21/6 = 3,5$ (pengulangan yang dilakukan adalah 4 kali dalam pembulatan hasil).

Keterangan:

t: banyak perlakuan

r: banyak pengulangan

3.6. Prosedur Kerja

3.6.1. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah :

- a) ose steril
- b) cawan petri
- c) tabung reaksi
- d) inkubator
- e) labu erlenmeyer
- f) autoklaf
- g) tabung reaksi
- h) lampu bunsen
- i) kapas lidi steril
- j) neraca analitik
- k) skapel
- l) pinset
- m) pipet steril
- n) Kamera
- o) jangka sorong dan alat tulis

Bahan yang digunakan adalah:

- a) isolat klinis kuman *Streptococcus pyogenes*
- b) Madu hutan Pematang Rebah dan madu hutan Baduy
- c) paper disk amoxicilin dan paper disk kosong stersil

- d) media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dan media NA (*Nutrien Agar*),
- e) aquades
- f) larutan Mc Furland 0,5%
- g) NaCl 0,9%.

3.6.2. Sterilisasi Media

Seluruh alat yang digunakan dalam penelitian ini dicuci bersih terlebih dahulu, dan di tunggu kering, kemudian dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.⁶

3.6.3. Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Dalam pembuatan suspensi diperlukan adanya larutan standard McFarland 0,5 yang sudah disediakan. Kemudian larutan NaCl 0,9% dimasukkan kedalam tabung agar miring berisi isolate bakteri murni *Streptococcus pyogenes* dan dihomogenkan. Bandingkan kekeruhan suspensi bakteri dengan larutan McFarland 0,5 dan akan diperoleh kepadatan bakteri sesuai standar yang teruji yaitu 10^8 CFU/mL.⁶

3.6.4. Penanaman Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Timbang 19 gram serbuk McConkey Agar, masukkan kedalam labu Erlenmeyer lalu larutkan dalam 500 ml aquadest, kemudian aduk rata dan ditutup dengan aluminium foil lalu diikat dengan benang pulung. Dimasak hingga mendidih (suhu 100°C) dinginkan sampai suhu 45 °C, Tuangkan dalam cawan petri sebanyak \pm 10 ml, biarkan hingga media dingin dan padat.⁶

3.6.5. Pembuatan Sediaan Madu

Madu yang digunakan adalah 10 ml madu murni yang akan dibuatkan perlakuan pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% . Kemudian rendam cakram kosong (oxid) selama 15 menit dalam setiap sediaan madu sesuai konsentrasinya, lalu ditanam pada cawan petri berisi media agar yang sudah diolesi oleh bakteri *Streptococcus pyogenes*. Selanjutnya lakukan inkubasi pada sediaan pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pembuatan larutan madu dilakukan dengan rumus konsentrasi larutan yaitu :

$$V1.N1 = V2.N2$$

V1 (V2.N2/N1)	N1	V2	N2
2 ml	100%	10 ml	20%
4 ml	100%	10 ml	40%
6 ml	100%	10 ml	60%
8 ml	100%	10 ml	80%
10 ml	100%	10 ml	100%

Maka dari rumus konsentrasi larutan tersebut didapatkan:

- Pada konsentrasi 20% dilarutkan 2 ml madu pada 8 ml aquades.
- Pada konsentrasi 40% dilarutkan 4 ml madu pada 6 ml aquades.
- Pada konsentrasi 60% dilarutkan 6 ml madu pada 4 ml aquades.
- Pada konsentrasi 80% dilarutkan 8 ml madu pada 2 ml aquades.
- Pada konsentrasi 100% dilarutkan 10 ml madu pada 0 ml aquades.

3.6.6. Uji Efektivitas Antibakteri Madu Terhadap Pertumbuhan Bakteri

Streptococcus pyogenes

Cakram kosong (oxid) digunakan sebagai penguji efektivitas antibakteri dan masing-masing sudah berisi sediaan sesuai dengan konsentrasi yang sudah ditentukan. Kontrol negatif digunakan dengan merendam cakram disk ke dalam aquades steril dan kontrol positif berupa antibiotik amoxicilin pada cakram disk. Masing-masing cakram diletakan pada media MHA yang sudah ditanami bakteri *Streptococcus pyogenes*. Lalu lakukan masa inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Efektivitas antibakteri madu dapat dinilai dari panjang diameter yang terbentuk berupa zona bening disekitar cakram yang diukur menggunakan jangka sorong, lalu lakukan klasifikasi respon hambat menurut *Greenwood*. Masing-masing perlakuan diberikan 4 (empat) kali pengulangan untuk satu sampel madu.⁶

3.7. Identifikasi Variabel

3.7.1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah madu. Madu yang digunakan adalah madu hutan Pematang Rebah dan madu hutan Baduy.

3.7.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

3.8. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Konsentrasi Madu	Konsentrasi madu hutan murni (multifloral) yang berasal dari beberapa lebah liar yang berada di hutan	Gelas ukur, pipet ukur, neraca analitik.	Konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.	Rasio
Uji Efektivitas antibakteri madu terhadap bakteri <i>streptococcus pyogene</i>	Uji efektivitas antibakteri madu dinilai dengan mengamati zona hambat madu terhadap bakteri lalu dilakukan pengukuran diameter	Jangka Sorong	Zona hambat disekitar cakram (mm)	Rasio

pertumbuhan
streptococcus
pyogenes
disekitar
cakram yang
sudahdiberikan
perlakuan.

3.9. Analisis Data

Penelitian ini datanya diperoleh dari hasil analisis statistik yaitu uji *One Way Anova*. Pada Uji statistik madu hutan Pematang Rebah didapatkan bahwa data terdistribusi normal pada uji normalitas *Shapiro-Wilk*, dimana nilai signifikansinya $p > 0,05$. Pengujian kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas untuk melihat apakah varian datanya homogenya atau tidak, hasil yang didapat adalah $\text{sig } 0,114 > 0,05$ maka dapat disimpulkan data dalam kelompok tersebut adalah sama atau homogen sehingga asumsi uji homogenitas dalam *One Way Anova* terpenuhi. Pada uji *One Way Anova* diatas signifikansi $0,000 < 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa hasil rata-rata dari data diatas berbeda dan terdapat perbedaan yang signifikan. Selanjutnya dilakukan analisa LSD (*least significant different*) . Pada uji statistik madu hutan Baduy didapatkan bahwa data terdistribusi normal pada uji normalitas *Shapiro-Wilk*, dimana nilai signifikansinya $p > 0,05$. Pengujian kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas untuk melihat apakah varian datanya homogenya atau tidak, hasil yang didapat adalah $\text{sig } 0,045 < 0,05$ maka dapat disimpulkan data dalam kelompok tersebut adalah beda atau tidak homogen sehingga asumsi uji homogenitas dalam *one way anova* belum terpenuhi. Maka dilanjutkan terlebih dahulu ke Independent Uji T dan didapatkan hasil *equal variences assumed* $0,94 > 0,05$ sehingga asumsi uji homogenitas dalam *One Way Anova* terpenuhi. Pada uji *One Way Anova* didapatkan hasil signifikansi $0,000 < 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa

hasil rata-rata dari data diatas berbeda dan terdapat perbedaan yang signifikan. Selanjutnya dilakukan analisa LSD (*least significant different*).