

# Konsentrasi Hambat Minimal dan Konsentrasi Bunuh Minimal Madu terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *In Vitro*

Ulfah<sup>1</sup>, Rita Endriani<sup>2</sup>, M.Yulis Hamidy<sup>3</sup>

## ABSTRACT

The advantage of honey in the treatment of pharyngitis has shown that honey has antibacterial activity against *Streptococcus pyogenes*, as the most common bacteria causes pharyngitis. Several researches had shown that honey had antibacterial effect against *Streptococcus pyogenes*. The aim of this study was to know the effective concentration of honey against *Streptococcus pyogenes* in vitro. This study was a laboratory experimental design. The antibacterial activity of honey has been tested by the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) using the tube dilution method. The result of this study indicated that honey had an antibacterial activity against *Streptococcus pyogenes*, inhibiting and killing the bacteria in vitro. The conclusion was obvious that MIC and MBC of honey against *Streptococcus pyogenes* were 12,5% and 25% respectively.

**Keywords:** MIC, MBC, honey, *Streptococcus pyogenes*.

Obat tradisional sudah dikenal sejak dahulu kala, salah satunya adalah madu lebah. Madu adalah cairan manis alami yang berasal dari nektar tumbuhan yang diproduksi oleh lebah madu. Madu terus digunakan secara empiris untuk mengobati infeksi sejak ditemukan. Hippocrates (460-337 SM) dikenal menggunakan resep madu dari peninggalan zaman Mesir Kuno, yakni untuk menyembuhkan radang tenggorokan dan sariawan di bibir.<sup>1,2</sup>

Madu mengandung zat yang berguna untuk membunuh bakteri patogen penyebab penyakit infeksi. Efek antibakteri ini disebabkan oleh beberapa faktor yaitu tingkat keasaman yang tinggi (berkisar 3,2 sampai 4,5), adanya senyawa radikal hidrogen peroksida, tekanan osmotik yang tinggi dan adanya senyawa organik yang bersifat antibakteri (seperti asam-asam organik, minyak atsiri, polifenol dan lisozim).<sup>2,3</sup>

Daya antibakteri madu dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang dapat menyebabkan penyakit infeksi pada saluran nafas dan saluran

pencernaan. Bakteri yang paling sering mengakibatkan penyakit-penyakit tersebut adalah *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholera*. *Streptococcus pyogenes* adalah bakteri yang menyebabkan faringitis. Bakteri ini ditransmisikan dari orang ke orang melalui *droplet* dari saluran pernapasan.<sup>4,5</sup>

*Streptococcus pyogenes* menyebabkan 5-10% kasus faringitis yang ada, penyakit ini dikenal sebagai faringitis streptokokus. Penyakit ini tidak menyebabkan kematian tetapi mempunyai gejala sisa yang cukup serius seperti glomerulonefritis akut dan demam rematik akut. Komplikasi lainnya antara lain otitis media, sinusitis, mastoiditis, bakteremia, eritema nodosum, adenitis servikal supuratif, abses peritonsilar, abses retrofaring dan *streptococcal toxic shock-like syndrome*.<sup>6-9</sup>

Madu Manuka yang berasal dari Selandia Baru memiliki efektivitas antibakteri *Streptococcus pyogenes*. Willix dkk. yang dikutip Puspitasari<sup>3</sup> melaporkan bahwa madu juga efektif dalam menghambat *Streptococcus pyogenes*. Penelitian yang dilakukan oleh Siahaan pada tahun 2006 dengan menggunakan madu hutan yang berasal dari Baserah Kuantan Singingi Riau dengan metode cakram, telah dibuktikan bahwa *Streptococcus*

<sup>1</sup> Fakultas Kedokteran Universitas Riau

<sup>2</sup> Penulis untuk Koresponden: Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Riau Jalan: Diponegoro no 1 Pekanbaru Telp. (0761) 839264/ Fax (0761) 839265 e-mail: [rita\\_endriani\\_fkunri@yahoo.com](mailto:rita_endriani_fkunri@yahoo.com)

<sup>3</sup> Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Riau

*pyogenes* merupakan bakteri yang dapat dihambat pertumbuhannya oleh madu. Madanisti tahun 2009 juga membuktikan bahwa madu memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. Namun, pada penelitian ini belum diketahui berapa konsentrasi hambat minimal dan konsentrasi bunuh minimal madu terhadap *Streptococcus pyogenes*.<sup>10-12</sup>

Efektifitas antibakteri dapat ditentukan dengan mengetahui konsentrasi hambat minimal (KHM), konsentrasi bunuh minimal (KBM), dan lama pemaparannya.<sup>9</sup> Uji KHM dan KBM bersifat kuantitatif sehingga dapat mengukur konsentrasi antibakteri yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan suatu inokulum terstandarisasi di bawah kondisi yang ditentukan dengan tepat sehingga dapat membantu penentuan dosis efektif yang diperlukan pasien.<sup>13,15</sup>

Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti tertarik melakukan penelitian untuk mengetahui KHM dan KBM madu terhadap *Streptococcus pyogenes* dengan menggunakan metode dilusi tabung. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi efektif yaitu KHM dan KBM madu untuk menghambat pertumbuhan dan membunuh *Streptococcus pyogenes*.

## METODE

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain: madu, biakan murni *Streptococcus pyogenes*, cakram penisilin, agar darah, agar *Sabouraud's dextrose*, Mueller Hinton *broth*, agar Mueller Hinton + 5% darah domba, larutan Brown III. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain: botol kaca, jarum ose, lampu spiritus, korek api, kertas perkamen, spuit steril 1ml dan 5ml, lidi kapas steril, mistar, pinset, spidol, tabung reaksi, inkubator, pipet takar, otoklaf, kamera sinar gamma dan *laminar flow*.

## Sterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari kaca terlebih dulu dicuci dan dikeringkan serta dibungkus dengan kertas perkamen. Sterilisasi dilakukan dengan otoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit, sedangkan jarum ose dan pinset disterilkan

dengan pemijaran lampu spiritus yang dinyalakan dengan korek api.

## Sterilisasi Bahan Uji

Bahan uji berupa madu disimpan dalam botol kaca yang gelap berukuran 250 ml. Kemudian disterilkan dengan radiasi sinar gamma yang bersumber dari kobalt-60 menggunakan kamera sinar gamma. Dosis radiasi yang digunakan adalah sebesar 10 kgy dalam waktu 4 jam 21 menit. Sterilisasi madu dilakukan di Instalasi Bank Jaringan RSUP Dr. M Djamil Padang.<sup>1,27</sup>

## Pemeriksaan Sterilitas Bahan Uji

Bahan uji berupa madu diinokulasikan pada agar darah dan agar *Sabouraud's dextrose*, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Bahan uji dinyatakan steril jika tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada agar darah dan jamur pada agar *Sabouraud's dextrose*.

## Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri dibuat dari biakan murni yang telah disubkultur sehingga terbentuk koloni bakteri. Koloni bakteri tersebut diambil dengan ose berdiameter 5 mm dan dimasukkan ke dalam 1 ml larutan Mueller Hinton *broth* sampai kekeruhannya sama dengan larutan Brown III. Larutan Brown III adalah kombinasi larutan BaSO<sub>4</sub> dan NaSO<sub>4</sub> dengan perbandingan 1:7.<sup>9,17</sup>

## Penentuan KHM dan KBM

KHM madu terhadap *Streptococcus pyogenes* ditentukan dengan menggunakan metode dilusi tabung (*Tube dilution method*).<sup>4,14,16</sup>

- Tabung steril disediakan untuk seri pengenceran dengan 3 kali pengulangan.
- Setiap seri pengenceran dalam satu ulangan menggunakan 10 tabung. Tabung II sampai tabung X dimasukkan 1 ml Mueller Hinton *broth* steril.
- 2 ml madu selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung I, lalu dipindahkan 1 ml madu ke tabung

- II. Tabung II dicampur sampai homogen diambil 1 ml kemudian dipindahkan ke tabung III. Pengenceran secara seri dari tabung III dilanjutkan sampai tabung X, dengan cara memindahkan 1 ml larutan madu seperti tersebut di atas, demikian seterusnya sampai tabung X diambil 1 ml kemudian dibuang sisanya sehingga volume menjadi sama.
- d. Tabung I sampai tabung X selanjutnya diisi masing-masing 1 ml suspensi bakteri. Volume akhir dari tabung I sampai tabung X sebesar 2 ml. Konsentrasi akhir dari madu pada tiap tabung adalah I 50%, II 25%, III 12,5%, IV 6,25%, V 3,12%, VI 1,56%, VII 0,78%, VIII 0,39%, IX 0,195% dan tabung X 0,097%.
- e. Seluruh tabung selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C, selama 24-48 jam. Sebagai kontrol sterilitas bahan dan kontrol pertumbuhan bakteri, juga ikut diinkubasikan tabung kontrol negatif (K-) yang berisi madu sebanyak 2 ml tanpa suspensi bakteri dan tabung kontrol positif (K+) yang berisi suspensi bakteri sebanyak 2 ml tanpa madu.
- f. Ada tidaknya pertumbuhan bakteri diamati dengan cara membandingkan seluruh tabung yang diinkubasi.
- g. Konsentrasi hambat minimal diperoleh dengan mengamati tabung yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi terendah. Tabung yang keruh menandakan adanya pertumbuhan bakteri dan pada tabung yang bening menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri.
- h. Tabung-tabung yang tidak memperlihatkan pertumbuhan bakteri selanjutnya dikultur dengan menggunakan ose pada medium Mueller Hinton + 5% darah domba, kemudian diinkubasikan pada 37°C selama 24-48 jam.
- i. Konsentrasi bunuh minimal akan ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada medium Mueller Hinton + 5% darah domba dengan konsentrasi terendah.
- Semua aktivitas mulai dari pembuatan suspensi bakteri sampai penentuan KHM dan KBM madu dilakukan di *laminar flow*.

## HASIL

Penentuan KHM dan KBM dengan menggunakan metode dilusi tabung didapatkan hasil yang dapat dilihat pada Tabel 1.1.

Tabel 1.1 Hasil pengamatan KHM madu dengan metode dilusi tabung terhadap *Streptococcus pyogenes*

Pengenceran Madu (%)	<i>Streptococcus pyogenes</i>			Kontrol negatif	Kontrol positif
	1	2	3		
50	-	-	-	-	+
25	-	-	-	-	+
12,5	-	-	-	-	+
6,25	+	+	+	-	+
3,12	+	+	+	-	+
1,56	+	+	+	-	+
0,78	+	+	+	-	+
0,39	+	+	+	-	+
0,195	+	+	+	-	+
0,097	+	+	+	-	+

Keterangan 1, 2, 3: pengulangan KHM madu terhadap *Streptococcus pyogenes*  
 (+) : ada pertumbuhan  
 (-) : tidak ada pertumbuhan  
 Kontrol negatif : madu  
 Kontrol positif : suspensi bakteri

Hasil pengamatan secara visual pada metode pengenceran suspensi madu terhadap *Streptococcus pyogenes* menunjukkan kejernihan media dimulai pada konsentrasi 12,5% sampai konsentrasi 50% dan menunjukkan kekeruhan dimulai pada konsentrasi 0,097% sampai pada konsentrasi 6,25%. Hal ini menunjukkan KHM madu terhadap *Streptococcus pyogenes* terdapat pada konsentrasi 12,5% dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali namun tetap mendapatkan hasil yang sama.

Penentuan KBM dilakukan dengan kultur pada medium agar Mueller Hinton yang mengandung 5% darah domba untuk melihat pertumbuhan koloni bakteri. Hasil kultur ini didapatkan pada konsentrasi 12,5% untuk *Streptococcus pyogenes* terdapat pertumbuhan bakteri, sedangkan konsentrasi 25% sampai konsentrasi 50% tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri. Hal ini menunjukkan pada konsentrasi 25% sampai konsentrasi 50% madu dapat membunuh koloni bakteri, berarti KBM pengenceran madu terhadap *Streptococcus pyogenes* terdapat pada konsentrasi 25%.

## PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Riau Pekanbaru dan Instalasi Bank Jaringan RSUP Dr. M Djamil Padang menunjukkan bahwa madu dapat menghambat pertumbuhan dan membunuh *Streptococcus pyogenes*, berarti madu telah dibuktikan memiliki daya antibakteri yang diamati secara visual menunjukkan kejernihan media tabung. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Siahaan tahun 2006 dan Madanisti tahun 2009 bahwa madu dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.<sup>11,12</sup>

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 12,5% dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* sehingga masih terlihat adanya pertumbuhan bakteri setelah dilakukan kultur pada medium agar Mueller Hinton yang mengandung 5% darah domba. Konsentrasi 12,5% merupakan nilai KHM, sedangkan mulai konsentrasi 25% dapat membunuh *Streptococcus pyogenes* setelah inkubasi 24 jam, berarti bahwa konsentrasi 25% merupakan nilai KBM. Madu bersifat bakteriostatik pada nilai KHM dan bersifat bakterisid pada nilai KBM.<sup>5</sup>

Penelitian yang dilakukan oleh Cooper R tahun 2002, melaporkan madu Manuka dari bunga *Leptosporum scoparium* terhadap *Streptococcus pyogenes* mempunyai konsentrasi hambat minimal pada konsentrasi 8,3%, tetapi pada penelitian ini madu yang digunakan adalah madu hutan yang berasal dari Baserah Kuantan Singingi Riau terhadap *Streptococcus pyogenes* sehingga didapatkan konsentrasi hambat minimal 12,5%. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh jenis madu atau kondisi madu yang digunakan berbeda. Sumber-sumber madu berbeda di seluruh dunia dan tidak semua jenis-jenis madu tersebut memiliki sifat bakteriostatik dan bakterisid yang sama.<sup>4,28,29</sup>

Cappucino dan Sherman tahun 2001 menyatakan bahwa tidak semua mikroba mati dalam konsentrasi dan waktu pemaparan yang sama. Jenis yang lebih sensitif lebih cepat dan lebih mudah rusak dibandingkan yang resisten. *Streptococcus pyogenes* yang digunakan pada penelitian ini merupakan strain yang telah diuji sensitif terhadap penisilin. Strain isolat *Streptococcus pyogenes* yang digunakan pada penelitian ini mungkin berbeda dengan *Streptococcus pyogenes* yang digunakan pada penelitian Cooper R. Perbedaan strain *Streptococcus pyogenes* yang digunakan menyebabkan madu pada kedua penelitian menghasilkan efek yang berbeda.<sup>12,13,17,30</sup>

Daya antibakteri madu dalam menghambat dan membunuh *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro* disebabkan oleh beberapa faktor antibakteri yang terdapat di dalam madu. Faktor-faktor antibakteri yang mungkin ada pada madu dalam penelitian ini diantaranya adalah faktor-faktor yang bersifat non-peroksida dan peroksida. Tidak semua madu sama aktivitas antibakteri dalam hal faktor tingkat produksi hidrogen peroksida dan faktor non-peroksidanya, tergantung pada sumber komponen madu dan pemrosesan madu tersebut.<sup>21</sup>

Enzim glukosa oksidase (glukosidase) dalam madu telah dipertahankan dengan melakukan prosedur sterilisasi madu menggunakan sinar gamma sehingga efek hidrogen peroksida dapat bekerja dengan baik sebagai antibakteri. Konsentrasi hidrogen peroksida pada madu sekitar 1 mmol/liter, 1000 lebih kecil jumlahnya daripada larutan hidrogen peroksida 3% yang biasa dipakai sebagai antiseptik. Efektivitasnya tetap baik sebagai

pembunuh bakteri meski konsentrasinya lebih kecil.<sup>1,24,27</sup>

Madu memiliki faktor-faktor antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Faktor pertama madu yang mungkin terdapat pada penelitian ini adalah kandungan utama glukosa dan fruktosa yang tinggi dan kandungan air yang sedikit sehingga membuat madu bersifat hipertonis bila dibandingkan dengan lingkungan di dalam tubuh *Streptococcus pyogenes*. Akibatnya akan terjadi efek osmotik terhadap *Streptococcus pyogenes* yang ditandai dengan keluarnya cairan dari dalam tubuh bakteri ke lingkungan luar. Madu yang diencerkan hingga kadar gulanya menurun akan mengurangi efek antibakteri. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan bahwa setelah inkubasi 24 jam, kejernihan media tabung semakin berkurang pada madu yang semakin encer. Tabung yang jernih menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri dan tabung yang keruh menandakan adanya pertumbuhan bakteri. Hasil kultur di agar Mueller Hinton+ 5% darah domba menunjukkan bahwa ketiadaan pertumbuhan koloni bakteri semakin berkurang pada madu yang semakin encer setelah inkubasi selama 24 jam.<sup>1,19,25,26,31,32</sup>

Faktor yang kedua adalah keasaman alami madu yang akan menghambat mikroorganisme patogen, salah satunya *Streptococcus pyogenes*. Tingkat pH madu yang berkisar 3,2-4,5 menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* yang memiliki pH optimum berkisar antara 7,4-7,6. Pengenceran madu akan meningkatkan pH dan mengurangi efektivitas antibakteri.<sup>21,23,26,31</sup>

Faktor ketiga adalah kandungan senyawa-senyawa lain yang mempunyai kemampuan antibakteri seperti unsur kalium, lisozim, flavonoid dan asam organik. Sumber kalium yang terdapat pada madu dapat menarik keluar sitoplasma inti pada bakteri sehingga bakteri tersebut tidak dapat bertahan hidup. Lisozim dapat mengkatalisis penghancuran dinding sel bakteri. Minyak atsiri, polifenol dan asam organik mempunyai efek sebagai antibakteri.<sup>18,19,20</sup>

Selain faktor-faktor di atas, madu juga mengandung komponen-komponen yang bergizi tinggi sehingga mampu meningkatkan sistem imunitas apabila digunakan secara *in vivo*, seperti vitamin B-kompleks, vitamin C, dan asam folat.<sup>21,22</sup>

## KESIMPULAN

Penelitian tentang KHM dan KBM madu terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro* dapat disimpulkan bahwa KHM madu terhadap *Streptococcus pyogenes* adalah 12,5% dengan masa inkubasi 24 jam dan suhu 37 °C dan KBM madu terhadap *Streptococcus pyogenes* adalah 25% dengan masa inkubasi 24 jam dan suhu 37 °C.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Fakultas Kedokteran Universitas Riau atas segala fasilitas dan kemudahan yang diberikan kepada penulis selama melaksanakan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Suranto A. Terapi Madu. Jakarta: Penebar Swadaya; 2007. p. 26.
2. Puspitasari I. Rahasia Sehat Madu. Yogyakarta : B-first; 2007. p. 21, 27-33.
3. Rostita. Berkat Madu: Sehat, Cantik dan Penuh Vitalitas. Bandung: Qanita; 2007. p. 37.
4. Suryani L, Meida NS. Daya Antibakteri Madu terhadap Beberapa Kuman Patogen secara *In Vitro*. Jurnal Kedokteran Yarsi. 2004;12(3):41-5.
5. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Streptokokus. Dalam Jawetz, Melnick, & Adelberg's Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta: EGC; 2008. p. 233-48.
6. Lee K, Wilmoth B. World of Microbiology and Immunology. New York: Gale; 2003. p. 532-5.
7. Mims C, Dockrell HM, Goering RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M. Medical Microbiology. Third Edition. Spain: Elveter Limited; 2004. p. 201-10.
8. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. Medical Microbiology. New York: Thieme Stuttgart; 2005. p. 234-40.
9. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Twelfth edition. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007. p. 265-77, 148-68.

10. Molan P. Honey as an Antimicrobial Agent. The University of Waikato Department of Biological Sciences; 2003 [dikutip 23 Juni 2009]. Tersedia di: <http://www.biowaikato.ac.nz/>
11. Siahaan SS. Efek Antibakteri Madu Riau terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *In Vitro*. (Skripsi, tidak diterbitkan). Pekanbaru: Fakultas Kedokteran Universitas Riau; 2006.
12. Madanisti DP. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) dengan Madu Riau Bentuk Tunggal dan Campuran terhadap *Streptococcus pyogenes* *In Vitro*. (Skripsi, tidak diterbitkan). Pekanbaru: Fakultas Kedokteran Universitas Riau; 2009.
13. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2006. p. 966-1014.
14. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Prinsip-Prinsip Mikrobiologi Kedokteran Diagnostik. Dalam Jawetz, Melnick, & Adelberg's Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta: EGC; 2008. p. 717.
15. Hart T, Shears P. Atlas Berwarna Mikrobiologi. Jakarta: Hippokrates; 2002. p. 206-19.
16. Endriani R, Supardi I, Sudigdoadi S, Wartadewi. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM), Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) Dan Waktu Kontak Ekstrak Bawang Putih (*A. sativum*) Dibandingkan Dengan Eugenol Terhadap *S. mutans* Secara *In Vitro*. JIK. 2007;1:30-5.
17. Wikler MA, Cockerill FR, Craig WA, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hecht DW, et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. p. 66-68,130-2.
18. Dorland WAN. Kamus Kedokteran Dorland. Ed. 29. Jakarta: EGC; 2002. p.102
19. Purbaya JR. Khasiat Madu Alami. Bandung: Pionir Jaya; 2002. p. 35-196.
20. Sihombing DTH. Ilmu Ternak Lebah Madu. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 2005. p. 7-9,16,18-9,101-2,107,109-10.
21. Miraglio AM, Beuchat LR, Coulston AM, Keen CL, Nataro JP, Speckmann EW. Honey–Health and Therapeutic Qualities. Longmont: National Honey Board; 2002. p. 1-28.
22. Jarvis DC. Pengobatan Tradisional dengan Madu dan Apel. Bandung : Pionir Jaya; 2002.
23. Bansal V, Medhi B, Pandhi P. Honey A Remedy Rediscovered and Its Therapeutic Utility. Kathmandu University Medical Journal. 2005;3:305-9.
24. Hampton S. The Use of Honey in Modern Cost Effective Wound Management. J of Community Nursing. 2007 Jun. p. 1122.
25. Mwiapatayi BP, Angel D, Norrish J, Hamilton MJ, Scott A, Sieunarine K. The Use of Honey in Chronic Leg Ulcers: A Literature Review. Primary Intention 2004; 12(3): 107-8, 110-2.
26. Molan PC. Potential of Honey in the Treatment of Wounds and Burns. Am J Clin Dermatol. 2001; 2 (1): 13-19.
27. Baggio A, Gallina A, Dainese N, Manzinello C, Mutinelli F, Serra G, et al. Gamma Radiation: Sanitizing Treatment of AFB Contaminated Beekeeping Equipment, Gamma Radiation Sanitation in Beekeeping Management. Apimondia Journal. APIACTA 40. 2005. p. 22-7.
28. Cooper R. Activity of honey against wound-infecting bacteria (including ‘superbugs’). The University of Wales, Cardiff Wound Healing Research Unit; 2002 [dikutip 6 Agustus 2009]. Tersedia di: <http://bio.waikato.ac.nz/pdfs/honeyresearch/activity.pdf>
29. Harley C. Honey, An Old Remedy Creating A New “Buzz” In Wound Care. Wound Care Canada. 2005; 3(2):47-58.
30. Cappucino JG, Sherman N. Microbiology A Laboratory Manual. 6<sup>th</sup> ed. San Fransisco: Pearson Education Inc; 2002. p. 263-9.
31. Fakoor M, Pipeldazeh MH. A Study on the Healing Effect of Honey on Infected Open Fracture Wounds. Pak J Med Sci. 2007; 23(3): 327-9.
32. Agbaje EO, Ogunsanya T, Aiwerioba OIR. Conventional Use of Honey as Antibacterial Agent. Annals of African Medicine. 2006; 5(2): 78-81.