

Uji Efek Anti Bakteri Madu Hutan dan Madu Hitam Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*

Clayton J. Kaligis,¹ Edward Nangoy,² Christi D. Mambo²

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado

²Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado

Email: johanesais@gmail.com

Abstract: Honey contains plenty of antibacterial components, among them are high osmolarity, acidic pH, hydrogen peroxide, and antimicrobial proteins. The aim of this study is to determine *in vitro* antibacterial activity of forest honey and black honey against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The method used is experimental laboratory with dilution method at University of Sam Ratulangi Faculty of Mathematics and Natural Sciences Microbiology Laboratory. Concentrations of honey used are 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56% dan 0,78% (v/v) respectively. Ciprofloxacin as positive control and aquadest as negative control. The results obtained in this study is that both forest honey and black honey exhibited antibacterial activity. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of forest honey towards *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* is 12,5%, 12,5%, and 25%. The MIC of black honey towards *S. aureus*, *E. coli*, and *P. aeruginosa* is 25%, 12,5%, and 25%. No Minimum Bactericidal Concentration (MBC) is found on both forest honey and black honey. In conclusion, forest honey and black honey exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. The antibacterial effect of forest honey superior to black honey by a small margin.

Keywords: antibacterial, forest honey, black honey, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstrak: Madu memiliki banyak komponen antibakteri, diantaranya osmolaritas yang tinggi, pH asam, hidrogen peroksida, dan protein antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antibakteri *in vitro* madu hutan dan madu hitam terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Metode yang digunakan yaitu eksperimen laboratorium dengan metode dilusi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Sam Ratulangi. Konsentrasi madu yang digunakan ialah 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56% dan 0,78% (v/v) secara berurutan. Ciprofloxacin sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif. Hasil yang didapatkan pada penelitian ini yaitu kedua madu hutan dan madu hitam menunjukkan sifat antibakteri. *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)* pada madu hutan terhadap *S. aureus*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa* adalah 12,5%, 12,5%, dan 25% (v/v). *MIC* pada madu hitam terhadap *S. aureus*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa* adalah 25%, 12,5%, dan 25% (v/v). Tidak ditemukan *Minimum Bactericidal Concentration (MBC)* pada kedua madu hutan dan madu hitam. Efek antibakteri madu hutan lebih kuat daripada madu hitam. Simpulan penelitian ini ialah madu hutan dan madu hitam memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Efek antibakteri madu hutan sedikit lebih besar daripada madu hitam.

Kata Kunci: antibakteri, madu hutan, madu hitam, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

PENDAHULUAN

Resistensi antibiotik merupakan topik yang marak dibicarakan dalam dekade terakhir di dunia, termasuk Indonesia. Setidaknya 700.000 orang di dunia meninggal setiap tahunnya karena resistensi antibiotik, dan pada tahun 2050 dapat menyebabkan 10 juta kematian per tahun.¹ Tingkat resistensi antibiotik di Indonesia dianggap tinggi dan terus meningkat.²

Semua usaha untuk menurunkan resistensi dan tingkat produksi antimikroba tidak secepat dengan meningkatnya rerata resistensi antibiotik,³ untuk itu dibutuhkan strategi baru untuk mengobati infeksi. Strategi untuk menurunkan tingkat resistensi adalah dengan penggunaan madu sebagai pengobatan komplementer.

Beberapa studi *in vitro* menganjurkan bahwa madu dapat memutarbalikkan resistensi antibiotik, sehingga madu dapat digunakan sebagai bagian dari pengobatan kombinasi terhadap infeksi bakteri yang resisten. Jenkins dkk. (2012) melaporkan adanya sinergi antara oxacillin dan madu manuka, dimana madu menyebabkan kepekaan kembali dari *Methycillin-Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA) terhadap oxacillin.⁴ Müller dkk. (2013) menemukan bahwa kombinasi madu manuka dengan rifampicin dapat menghambat pertumbuhan MRSA. Terjadinya sentisisasi bakteri terhadap rifampicin diketahui karena madu menurunkan regulasi *mecRI*, yang merupakan gen resistensi pada MRSA.⁵

Penggunaan madu di fasilitas kesehatan masih tergolong kurang, dan dengan potensi antibakteri madu yang besar sehingga perlu diteliti lebih lanjut. Penulis menganggap penting untuk mengevaluasi madu dengan kadar antibakterinya yang diproduksi secara lokal dan dapat terjangkau secara ekonomis.⁶

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan tiga bakteri patogen yang paling banyak ditemukan pada sepsis dan luka terinfeksi. Tes sensitivitas kultur bakteri pada suatu penelitian menunjukkan bahwa ditemukan banyak jenis mikroorganisme yang berperan dan menunjukkan sifat *multi*

drug resistance pada infeksi luka dan sepsis.⁷ Ketiga bakteri ini juga sudah mewakili gram-positif dan gram-negatif, sehingga menjadi bakteri yang akan diuji kepekaan dalam penelitian ini. Madu berpotensi lebih efektif terhadap bakteri resisten dibanding antibiotik topikal sehingga dapat mengurangi tingkat kematian akibat infeksi *Antimicrobial Resistance* (AMR).⁸

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan metode dilusi yang dilaksanakan di Laboratorium Analisa Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Sam Ratulangi bulan September 2019 sampai Desember 2019.

Alat yang digunakan antara lain alat pelindung diri, neraca analitik, pipet, kartu *Wickerham*, gelas ukur, labu Erlenmeyer, alat mixer, inkubator, autoklaf, api bunsen, kawat ose, *Laminar Air Flow* (LAF), tabung kaca dan spektrofotometer. Bahan yang digunakan antara lain madu, akuades, larutan asam sulfat, larutan barium klorida, *Nutrient agar*, *Nutrient broth*, *aluminium foil*, bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Jumlah perlakuan yaitu 1 kontrol positif, 1 kontrol negatif, dan 8 sampel masing-masing pada 3 jenis bakteri menghasilkan total 30 perlakuan dan percobaan diulang sebanyak 2 kali.

Pembuatan stok kultur bakteri menggunakan teknik *streak plate method* pada media NA. Kultur bakteri yang telah tumbuh pada media NA diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung reaksi berisi 10 ml NaCl 0,9% sampai suspensi bakteri memiliki kekeruhan sesuai dengan standard 0.5 *McFarland* (10^8 CFU/ml). Mengikuti standard CLSI⁹, kekeruhan untuk uji *broth dilution* adalah 10^6 CFU/ml sehingga 0,1 ml suspensi yang telah dibuat dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung steril kemudian ditambahkan 9,9 ml NaCl 0,9% dan dikocok homogen.

Buat kontrol positif dengan menimbang 0,1gr Ciprofloxacin dosis 500mg kemudian larutkan dalam 100ml akuades. Lakukan pengenceran 10x dengan mengambil 5ml larutan obat dan larutkan dalam 50ml akuades. Kontrol Negatif menggunakan 1 ml akuades dicampur dengan. 1 ml *Nutrient broth*, dimixer dan dibuang 1 ml.

Masukkan 1 ml media NB steril ke dalam 10 tabung reaksi. Masukkan 1 ml madu hutan pada tabung pertama untuk mendapatkan madu dengan konsentrasi 100%, mixer hingga homogen dan mulai teknik *two-fold dilution* dengan memindahkan 1 ml campuran madu pada tabung pertama dengan mikropipet ke tabung kedua untuk mendapat konsentrasi 50%. Pindahkan 1 ml campuran tabung kedua ke tabung ketiga. Lakukan hal yang sama hingga tabung kedelapan untuk mendapat konsentrasi 0,78%. Ambil 1 ml dari tabung delapan untuk dibuang. Pada tabung kesembilan ditambahkan 1 ml ciprofloxacin sebagai kontrol positif dan tabung kesepuluh ditambahkan 1 ml akuades sebagai kontrol negatif. Tambahkan 1 ml suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ke semua tabung.¹⁰ Ulangi percobaan yang sama sehingga didapatkan 20 tabung. Ulangi lagi percobaan yang sama menggunakan madu hitam sehingga didapat total 40 tabung. Lakukan hal yang sama untuk bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* hingga didapatkan total 120 tabung.

Ukur absorbansi semua tabung menggunakan spektrofotometer ($\lambda = 600\text{nm}$) kemudian inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Setelah diinkubasi ukur lagi absorbansi menggunakan spektrofotometer. MIC ditentukan dengan membandingkan absorbansi setelah inkubasi dikurangi absorbansi sebelum inkubasi. Konsentrasi terendah yang memiliki ciri fisik tidak keruh dan absorbansi tidak terdapat peningkatan signifikan ditentukan sebagai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Pengujian *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) dilakukan dengan mengambil 0,2 ml suspensi madu yang

ditentukan sebagai MIC lalu ditambahkan ke dalam tabung berisi 5ml NB steril tanpa berisi larutan antimikroba. Pengukuran dilakukan sebelum dan sesudah inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

HASIL PENELITIAN

Pengujian *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dilakukan dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer pada suspensi yang diberi madu atau obat dan inokulum bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Pengukuran dilakukan sebelum dan sesudah inkubasi. Tahap inkubasi dilakukan selama 18-24 jam pada suhu 37°C di inkubator. Pengukuran dilakukan pada hari Senin, 25 Oktober 2019 pukul 17:00 WITA, diinkubasi 19 jam, dan diukur kembali pada hari Selasa, 26 Oktober 2019 pukul 12:00 WITA. Pengujian MIC sebelum dan sesudah inkubasi dapat dilihat pada gambar. Dapat terlihat kekeruhan pada beberapa tabung yang mengalami pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi.



Gambar 1. Tabung uji MIC sebelum inkubasi



Gambar 2. Tabung uji MIC sesudah inkubasi

Pengujian *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) dilakukan dengan mengambil 0,2 ml suspensi yang tidak keruh dan tidak mengalami peningkatan absorbansi yang signifikan lalu ditambahkan ke dalam tabung berisi 5ml NB steril tanpa berisi larutan antimikroba. Pengukuran dilakukan sebelum dan sesudah inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pengukuran dilakukan pada hari Selasa, 26 Oktober 2019 pukul 18:00 WITA, diinkubasi 21 jam, dan diukur kembali pada hari Rabu, 27 Oktober 2019 pukul 15:00 WITA. Pengujian MBC sebelum dan sesudah inkubasi dapat dilihat pada gambar berikut. Semua tabung uji terlihat keruh sesudah inkubasi.



Gambar 3. Tabung uji MBC sebelum inkubasi



Gambar 4. Tabung uji MBC sesudah inkubasi

Berdasarkan hasil penelitian, MIC dan MBC dari hasil penelitian ini dapat dirangkum dalam tabel 1 dan 2.

BAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang paling rentan dari ketiga bakteri uji

pada konsentrasi 12,5% (v/v) terhadap kedua jenis madu diikuti oleh *Staphylococcus aureus* yang berada di tengah dengan MIC 12,5% (v/v) pada madu hutan dan 25% (v/v) pada madu hitam, dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan MIC pada konsentrasi 25% (v/v) terhadap kedua jenis madu. Hasil ini sama dengan yang ditemukan oleh Anand dkk. (2019), yang melakukan pengujian pada spesies bakteri yang sama tapi dengan beberapa jenis madu yang lain. Berbanding terbalik dengan penelitian ini, hasil penelitian dari Tan dkk. (2009) menunjukkan bahwa bakteri *S. aureus* merupakan bakteri yang paling rentan, dengan *E. coli* berada di tengah dan diikuti oleh *P. aeruginosa* saat diuji dengan madu manuka.^{11,12}

Tabel 1. MIC madu hutan dan madu hitam terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa* (*S.a* = *S. aureus*, *E.c*= *E. coli*, *P.a*= *P. aeruginosa*)

		Konsentrasi										
		MIC	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,125%	1,56%	0,78%	Kontrol +	Kontrol -
Madu Hutan	<i>S.a</i>		+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	<i>E. c</i>		+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	<i>P. a</i>		+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Madu Hitam	<i>Sa</i>		+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	<i>E. c</i>		+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	<i>P. a</i>		+	+	+	-	-	-	-	-	+	-

Pengaruh gram terhadap kerentanan

Jika hasil dari ketiga penelitian ini dibandingkan, dapat dilihat bahwa bakteri *S. aureus* (gram positif) lebih rentan dibanding *P. aeruginosa* dan *E. coli* (gram negatif). Perbedaan utama dari bakteri gram positif dan gram negatif adalah bakteri gram positif memiliki dinding peptidoglikan yang tebal, sehingga lebih toleran terhadap tekanan osmotik yang tinggi, sedangkan bakteri gram negatif

memiliki 3 lapisan pembungkus sel, yang terdiri dari lapisan peptidoglikan yang tipis diantara membran luar dan membran dalam. Membran luar merupakan lapisan yang kaya akan lipopolisakarida, sehingga dapat memberikan perlindungan dan meningkatkan resistensi dari bakteri gram negatif terhadap lisosim dan agen antibakteri lain. Mekanisme resistensi lainnya yang juga ditunjukkan oleh bakteri gram negatif yaitu terbentuknya biofilm ekstraseluler, yang menjadi pelindung fisik terhadap antibiotik. Berbagai jenis pertahanan dari membran luar bakteri gram negatif mungkin lebih memberikan pengaruh terhadap pertahanan bakteri dibanding dinding peptidoglikan yang tebal dari bakteri gram positif, namun bakteri gram negatif dapat menjadi lebih rentan jika osmolaritas dari madu tidak mengalami dilusi oleh *Nutrient Broth* (NB). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri gram positif lebih rentan terhadap madu dibanding bakteri gram negatif.¹³

Tabel 2. MBC madu hutan dan madu hitam terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa* (*S.a*= *S. aureus*, *E.c*= *E. coli*, *P.a*= *P. aeruginosa*)

	MBC	Konsentrasi				Kontrol
		100%	50%	25%	12,50%	
Madu Hutan	<i>S. a</i>	-	-	-	-	-
	<i>E. c</i>	-	-	-	-	-
	<i>P. a</i>	-	-	-	-	-
Madu Hitam	<i>S. a</i>	-	-	-	-	-
	<i>E. c</i>	-	-	-	-	-
	<i>P. a</i>	-	-	-	-	-

Madu hutan memiliki efek antibakteri yang sedikit lebih kuat dibanding madu hitam dalam uji ini. Selain kandungan yang

berbeda, proses pengolahan madu yang berbeda dapat berpengaruh pada hasil ini, karena madu hutan dipanen langsung dari hutan dengan cara tradisional dan madu hitam melalui proses pengolahan pabrik.

Kandungan madu

Berdasarkan hasil pemeriksaan kandungan madu hutan dan madu hitam, madu hutan terlihat memiliki kadar air yang lebih tinggi, kadar pH yang lebih asam, kadar protein yang lebih tinggi, kadar hidrogen peroksida yang lebih rendah, kadar flavonoid yang lebih tinggi, dan kadar gula yang lebih rendah dibandingkan madu hitam. Dilihat dari kandungan madu terhadap efek antibakteri, madu hutan unggul dalam hal pH, protein dan flavonoid sedangkan madu hitam unggul dalam kadar air, hidrogen peroksida, dan kadar gula.

Kadar hidrogen peroksida pada madu yang dilusi oleh Albaridi (2019) dan Bang dkk. (2003) didapatkan kadar tertinggi mencapai 3,65 mmol/L, atau 124 partikel per molekul (ppm). Kadar rerata hidrogen peroksida madu hutan yang digunakan pada penelitian ini mencapai 0,015%, atau 150 ppm dan kadar rerata hidrogen peroksida madu hitam mencapai 0,0295% atau 295 ppm. Kadar hidrogen peroksida yang tinggi pada kedua madu uji mungkin berkontribusi terhadap efek antibakteri yang dihasilkan.^{14,15}

Kadar flavonoid pada madu dari Combarros-Fuertes dkk. (2018) didapatkan kadar tertinggi mencapai 5,93 mg/100g, atau 0,593 partikel per molekul (ppm). Kadar rerata flavonoid madu hutan yang digunakan pada penelitian ini mencapai 1,190 ppm dan kadar rerata flavonoid madu hitam mencapai 0,727 ppm. Kadar flavonoid yang tinggi pada kedua madu uji mungkin memiliki peran lebih terhadap efek antibakteri yang dihasilkan, bahkan sedikit lebih kuat dibanding efek antibakteri dari hidrogen peroksida. Hal ini karena didapatkan efek antibakteri madu hutan sedikit lebih besar dibanding madu hitam, dengan perbedaan MIC hanya terdapat pada bakteri *S. aureus* yaitu 12,5% (v/v) pada madu hutan dan 25% (v/v) pada

madu hitam. Sesuai hasil yang didapatkan bahwa madu hutan dominan dengan kadar flavonoid dan madu hitam dominan dengan kadar hidrogen peroksida, dapat disimpulkan bahwa kadar flavonoid lebih berperan terhadap efek antibakteri dibanding kadar hidrogen peroksida. Hasil flavonoid yang ditemukan pada penelitian ini menarik, karena kadar flavonoid madu hutan lebih tinggi daripada madu hitam. Hal ini bertolak belakang dengan teori bahwa semakin gelap warna madu, semakin tinggi konsentrasi flavonoid yang ada dalam madu, dan terlihat bahwa madu hitam jauh lebih gelap daripada madu hutan. Mungkin komponen lain lebih berperan pada warna madu, seperti kadar polifenol secara keseluruhan, tidak hanya kadar flavonoid saja.¹⁶

Kadar protein yang didapatkan pada hasil analisis adalah 246 ppm untuk madu hutan dan 210 ppm untuk madu hitam. Jika hasil ini dibandingkan dengan yang ditemukan oleh Azeredo dkk. (2003), kadar kedua madu uji pada penelitian ini dikategorikan rendah. Dapat disimpulkan bahwa kadar protein kurang berpengaruh pada uji ini. Protein dalam madu juga memiliki komponen dengan sifat antibakteri, seperti royalisin (bee defensin-1 dan 2) dan apidaecin. Bee defensin membentuk pori ke mikroorganisme target, sedangkan apidaecin mengikatkan diri pada protein DnaK sehingga menghambat aktivitas ATPase dan kemampuan untuk melipat kembali protein yang tergulung.¹⁷

Aplikasi klinis pada manusia

Penelitian ini menunjukkan bahwa madu memiliki efek menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, *E. coli*, dan *P. aeruginosa*. Efektivitas penggunaan madu pada luka terbuka tidak hanya terbatas pada efek antibakteri saja tapi juga pada daya regenerasi sel yang muncul, misalnya hidrogen peroksida yang diproduksi saat madu mengalami kontak dengan exudat dari luka selain berfungsi sebagai antibakteri juga menjadi bagian dari reaksi inflamasi normal sehingga menstimulasi pertumbuhan fibroblast, sel epitel, kapiler

dan dapat mempercepat proses penyembuhan. Hasil penelitian ini juga kurang mempertimbangkan efek antibakteri dari osmolaritas dan pH madu, karena madu didilusi oleh *broth* sehingga mengurangi osmolaritas dan mengubah pH ke arah yang lebih netral. Kadar pH minimum untuk pertumbuhan bakteri patogen uji adalah *E. coli* pada 4,3 dan *P. aeruginosa* pada pH 4,4. Osmolaritas madu yg tinggi dan pH rendah dapat lebih berperan dalam uji dimana madu tidak didilusi. Dapat disimpulkan pada madu yang tidak didilusi, keasaman, osmolaritas, dan respon fisiologis manusia terhadap madu adalah faktor yang berperan penting. Untuk itu, setelah uji *in vitro* untuk menentukan kekuatan antibakteri dari madu, diperlukan penelitian yang lebih lanjut secara *in vivo* untuk menentukan madu mana yang sebenarnya lebih efektif untuk digunakan.^{14,18}

SIMPULAN

Madu hutan dan madu hitam memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) madu hutan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 12,5% (v/v), 12,5% (v/v), dan 25% (v/v). *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) madu hitam terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 25% (v/v), 12,5% (v/v), dan 25% (v/v). Madu hutan dan madu hitam memiliki sifat bakteriostatik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*, namun tidak terdapat aktivitas bakterisidal dari madu hutan dan madu hitam terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam studi ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis [Internet]. Who.int. 2019 [cited 21 September 2019]. Available from: <https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>
2. Parathon H, Kuntaman K, Widiastoety T, Muliawan B, Karuniawati A, Qibtiyah M et al. Progress towards antimicrobial resistance containment and control in Indonesia. *BMJ*. 2017;j3808.
3. WHO: Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014.
4. Jenkins RE, Cooper R. Synergy between oxacillin and manuka honey sensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Mar 1;67(6):1405-7.
5. Müller P, Alber DG, Turnbull L, Schlothauer RC, Carter DA, Whitchurch CB, Harry EJ. Synergism between Medihoney and rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PloS one*. 2013 Feb 28;8(2):e57679.
6. Hussain M, Kamel Y, Ullah Z, Jiman-Fatani A, Ahmad A. In vitro evaluation of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* susceptibility to Saudi honeys. *BMC Complement and Alternat Med*. 2019;19(1):185
7. Ayub M, Rizwan H, Siddique S, Maryam U. Isolation of Pathogens Causing Sepsis, Pus and Infected Wounds from Critical Care Unit: A Retrospective Study. *Annals of Clinical and Laboratory Research*. 2015;3(4). Available from: <http://www.aclr.com.es/clinical-research/isolation-of-pathogens-causing-sepsis-pus-and-infected-wounds-from-critical-care-unit-a-retrospective-study.pdf>
8. Kwakman P, Zaat S. Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life*. 2011;64(1):48-55.
9. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
10. Mama M, Teshome T, Detamo J. Antibacterial Activity of Honey against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Laboratory-Based Experimental Study. *Int J Microbiol*. 2019;1-9.
11. Anand S, Deighton M, Livanos G, Morrison P, Pang E, Mantri N. Antibacterial Activity of Agastache Honey and Characterization of Its Bioactive Compounds in Comparison With Important Commercial Honeys. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10.
12. Tan H, Rahman R, Gan S, Halim A, Hassan S, Sulaiman S et al. The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complement and Alternat Med*. 2009;9(1):34
13. Johnston M, McBride M, Dahiya D, Owusu-Apenten R, Singh Nigam P. Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS Microbiol*. 2018;4(4):655-64.
14. Bang L, Bunting C, Molan P. The Effect of Dilution on the Rate of Hydrogen Peroxide Production in Honey and Its Implications for Wound Healing. *J Alternat and Complement Med*. 2003;9(2):267-73.
15. Albaridi N. Antibacterial Potency of Honey. *Int J Microbiol*. 2019;1-10.
16. Combarros-Fuertes P, Estevinho L, Dias L, Castro J, Tomás-Barberán F, Tornadijo M et al. Bioactive Components and Antioxidant and

- Antibacterial Activities of Different Varieties of Honey: A Screening Prior to Clinical Application. *J Agricultur and Food Chem.* 2018;67(2):688-98.
17. Azeredo L, Azeredo M, de Souza S, Dutra V. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chem.* 2003;80(2):249-54.
18. Minamino T, Imae Y, Oosawa F, Kobayashi Y, Oosawa K. Effect of Intracellular pH on Rotational Speed of Bacterial Flagellar Motors. *J Bacteriol.* 2003;185(4):1190-4.