

**EFEK ANTIMIKROBA EKSTRAK PROPOLIS DARI LEBAH MADU
(*Trigona spp.*) SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM
Staphylococcus aureus SECARA *IN VITRO***

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Fitri Ramadhiyanti

NIM. 155070107111043

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK ANTIMIKROBA EKSTRAK PROPOLIS DARI LEBAH MADU (*Trigona spp.*) SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO*

Oleh :
Fitri Ramadhiyanti
155070107111043

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 18 Desember 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

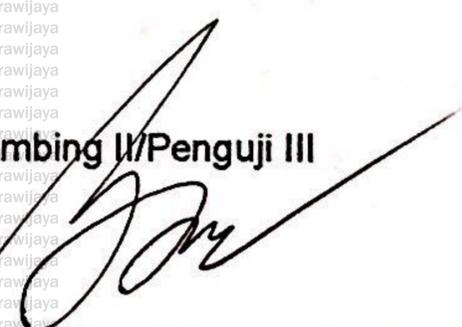
Penguji I


dr. Syifa Mustika, Sp. PD
NIP. 197804302012121001

Pembimbing I/Penguji II,

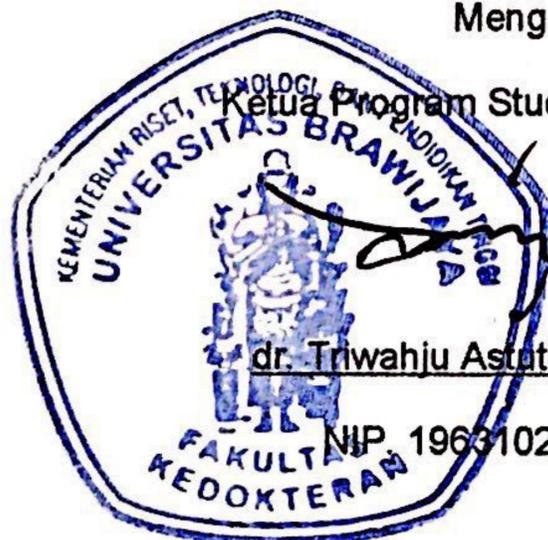
Pembimbing II/Penguji III


Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp. MK(K)
NIP. 195011101980021001


dr. Achmad Bayhaqi N.A., Sp. Rad
NIP. 2013098402041001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp. P(K)

NIP. 196310221996012001

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK ANTIMIKROBA EKSTRAK PROPOLIS DARI LEBAH MADU (*Trigona spp.*) SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO*

Oleh :
Fitri Ramadhiyanti
155070107111043

Telah diuji pada
Hari : **Selasa**

Tanggal : **18 Desember 2018**

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I


dr. Syifa Mustika, Sp. PD
NIP. 197804302012121001

Pembimbing I/Penguji II,

Pembimbing II/Penguji III


Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp. MK(K)
NIP. 195011101980021001


dr. Achmad Bayhaqi N.A., Sp. Rad
NIP. 2013098402041001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Tiwahju Asuti, M.Kes., Sp. P(K)

NIP. 196310221996012001

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK ANTIMIKROBA EKSTRAK PROPOLIS DARI LEBAH MADU (*Trigona spp.*) SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Staphylococcus aureus* SECARA IN VITRO

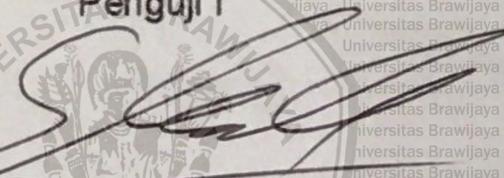
Oleh :
Fitri Ramadhiyanti
155070107111043

Telah diuji pada
Hari, Selasa

Tanggal : 18 Desember 2018

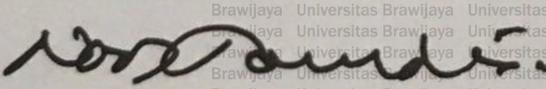
Dan dinyatakan lulus oleh:

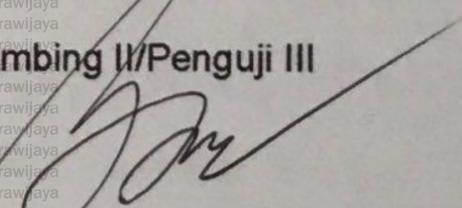
Penguji I


dr. Syifa Mustika, Sp. PD
NIP. 197804302012121001

Pembimbing I/Penguji II,

Pembimbing II/Penguji III


Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS DMM, Sp. MK(K)
NIP. 195011101980021001


dr. Achmad Bayhaqi N.A., Sp. Rad
NIP. 2013098402041001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter




dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp. P(K)

NIP. 196310221996012001

DAFTAR ISI

Halaman

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vii
Abstract.....	viii
Daftar Isi.....	ix
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Gambar.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv
Daftar Lampiran.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.1.1 Morfologi dan Identifikasi.....	6
2.1.2 Taksonomi.....	9
2.1.3 Patogenesis.....	9
2.2 Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.2.1 Komposisi dan Struktur Biofilm.....	11
2.2.2 Pembentukan Biofilm.....	12
2.2.2.1 Perlekatan.....	14
2.2.2.2 Pembentukan Mikrokoloni.....	15
2.2.2.3 Pembentukan Struktur Tiga Dimensi dan Pematangan.....	15
2.2.2.4 Pelepasan.....	15
2.2.3 Uji Pembentukan Biofilm.....	16
2.2.3.1 Metode <i>Tissue Culture Plate</i>	16
2.2.3.2 Metode Tabung.....	17
2.2.3.3 Metode <i>Congo Red Agar</i>	18

2.3	Propolis	19
2.4	Taksonomi <i>Trigona spp.</i>	20
2.5	Senyawa Penghambat Biofilm	20
2.5.1	Flavonoid	20
2.5.2	Terpenoid	21
2.5.3	Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)	21
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		22
3.1	Kerangka Konsep	22
3.2	Hipotesis Penelitian	23
BAB IV METODE PENELITIAN		24
4.1	Rancangan Penelitian	24
4.2	Waktu dan Tempat Penelitian	24
4.3	Sampel Penelitian	24
4.4	Pengulangan	25
4.5	Variabel Penelitian	25
4.5.1	Variabel Bebas	25
4.5.2	Variabel Tergantung	25
4.6	Definisi Operasional	26
4.7	Alat dan Bahan Penelitian	27
4.7.1	Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Propolis	27
4.7.2	Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri	28
4.7.3	Alat dan Bahan Deteksi Biofilm	28
4.8	Prosedur Penelitian	29
4.8.1	Persiapan Propolis Lebah Madu (<i>Trigona spp.</i>)	29
4.8.1.1	Ekstraksi dan Evaporasi	29
4.8.2	Identifikasi Bakteri	30
4.8.2.1	Pewarnaan Gram	30
4.8.2.2	Uji Katalase	31
4.8.2.3	Uji Koagulase	31
4.8.2.4	Perbenihan Pada Nutrient Agar Plate (NAP)	32
4.8.2.5	Pembiakan Bakteri Pada Medium NAP	32
4.8.2.6	Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri	32
4.8.2.7	Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Metode <i>Tube-test</i>)	33
4.8.3	Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada <i>Staphylococcus aureus</i>	34
4.9	Pengukuran Kuantitatif	35
4.9.1	Pengambilan Foto	36
4.9.2	Pengukuran <i>Mean Gray Value</i>	36
4.9.3	Pengukuran Kadar Hambat Biofilm Minimal	37
4.10	Analisis Data	37
4.11	Rencana Operasional Penelitian	38

BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	39
5.1 Hasil Identifikasi Ulang Bakteri Uji	39
5.1.1 Hasil Uji Deteksi Pembentukan Biofilm	41
5.1.2 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm	42
5.2 Analisis Data	43
5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas	44
5.2.2 Uji <i>Oneway ANOVA</i>	44
5.2.3 Uji <i>Post Hoc</i>	44
5.2.4 Uji Korelasi <i>Pearson</i>	45
BAB VI PEMBAHASAN	46
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian	46
6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran	50
6.3 Keterbatasan Penelitian	50
BAB VII KESIMPULAN	52
7.1 Kesimpulan	52
7.2 Saran	52
Daftar Pustaka	54
Lampiran	59



ABSTRAK

Ramadhiyanti, Fitri. 2018. **Efek Antimikroba Ekstrak Propolis Lebah Madu (*Trigona spp.*) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* secara *In Vitro*.** Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp. MK(K) (2) dr. Achmad Bayhaqi Nasir Aslam

Staphylococcus aureus adalah yang paling patogen di antara genusnya; bakteri ini khas menyebabkan infeksi kulit dan terkadang pneumonia, endokarditis, dan osteomyelitis. Bakteri ini dapat mempertahankan dirinya dengan membentuk biofilm. Kini sudah populer pemanfaatan produk-produk alami dari hewan sebagai antimikroba, salah satunya adalah propolis. Aktivitas biologis propolis terutama disebabkan oleh beberapa zat, seperti flavonoid, terpenoid, asam caffeic, ferulic dan *cumaric acid*, serta ester. Sedangkan kandungan dari propolis yang dapat menghambat biofilm antara lain adalah flavonoid. Flavonoid telah terbukti mempunyai pengaruh sebagai penghambat *quorum sensing* (QS) dengan mengganggu suatu sistem yang disebut *accessory gene regulator* (agr). Salah satu spesies lebah penghasil propolis terbesar adalah *Trigona spp.* Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan efek ekstrak propolis lebah madu *Trigona spp.* sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*, dengan menggunakan metode dilusi tabung. Foto hasil pengamatan dikuantifikasi menjadi nilai *mean gray value* dengan menggunakan aplikasi *Adobe Photoshop CC 2017*. Pada penelitian ini dibuktikan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak berkorelasi positif dengan peningkatan *mean gray value*, dengan korelasi kuat (korelasi Pearson, $p = 0,957$). Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak propolis lebah madu *Trigona spp.* dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* secara signifikan.

Kata Kunci: Ekstrak propolis, lebah madu *Trigona spp.*, antibiofilm, *Staphylococcus aureus*, biofilm, *Mean Gray Value*

ABSTRACT

Ramadhiyanti, Fitri. 2018. **Effect of Honey Bee (*Trigona spp.*) Propolis Extract as Inhibitor of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation in vitro.** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Preceptor: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp. MK(K) (2) dr. Achmad Bayhaqi Nasir Aslam

Staphylococcus aureus is the most pathogenic among its genus; these bacteria typically cause skin infections and sometimes pneumonia, endocarditis, and osteomyelitis. These bacteria can defend themselves by forming biofilms. Now it is popular to use natural products from animals as antimicrobials, one of which is propolis. The biological activity of propolis is mainly caused by several substances, such as flavonoids, terpenoids, caffeic acids, ferulic and cumaric acids, and esters. The content of propolis that can be used to inhibit biofilm is flavonoid. Flavonoid has been shown to have an effect as quorum sensing (QS) inhibitors that interferes a system called accessory gene regulator (*agr*). One of the biggest propolis-producing bee species is *Trigona spp.* The aim of this study is to identify the effect of *Trigona spp.* propolis extract as an inhibitor of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* bacteria *in vitro*, using the tube dilution method. Observed photos are quantified to mean gray values with Adobe Photoshop CC 2017. In this study it was proved that the increase in the concentration of extracts correlated positively with an increase in the mean gray value, with a strong correlation (Pearson correlation, $p = 0,957$). The conclusion of this study is *Trigona spp.* propolis extract can significantly inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation in vitro.

Keywords: Propolis extract, honey bee (*Trigona spp.*), antibiofilm, *Staphylococcus aureus*, biofilm, Mean Gray Value

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu permasalahan kesehatan di Indonesia. Penyakit infeksi merupakan penyebab paling utama tingginya angka kesakitan (*morbidity*) dan angka kematian (*mortality*) terutama pada negara-negara berkembang seperti halnya Indonesia (Mariati, 2013). Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri (Radji, 2011). Bakteri dapat mempertahankan dirinya dengan membentuk biofilm. Biofilm merupakan kumpulan dari sel-sel mikrobial yang melekat secara ireversibel pada suatu permukaan dan terbungkus dalam matriks *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang dihasilkannya sendiri serta memperlihatkan adanya perubahan fenotip seperti perubahan tingkat pertumbuhan dan perubahan transkripsi gen dari sel planktonik atau sel bebasnya (Donlan *et al.*, 2002). Salah satu bakteri yang membentuk biofilm adalah *Staphylococcus aureus*.

Staphylococci adalah bakteri gram positif berbentuk sferis dan sering bergerombol menyerupai gumpalan anggur. Transmisi mikroskop elektron dari sel menunjukkan dindingnya tebal, membran sitoplasma yang khas, dan sitoplasma amorf. *Staphylococcus aureus* merupakan organisme anaerob dan fakultatif anaerob yang membentuk koloni berwarna kuning atau putih pada medium nutrisi agar (Gnanamani *et al.*, 2017). *Staphylococcus aureus* adalah yang paling patogen; bakteri ini khas menyebabkan infeksi kulit dan terkadang pneumonia, endokarditis, dan osteomyelitis (Bush *et al.*, 2017). Virulensi dari *Staphylococcus aureus* didefinisikan oleh faktor-faktor virulensi, yang berperan

paling dominan adalah toksin-toksin yang disekresikan oleh bakteri. Sebagian besar toksin *Staphylococcus aureus* merusak membran biologis, lalu menyebabkan kematian sel (Otto, 2013).

Staphylococcus aureus dapat menghasilkan biofilm berlapis-lapis yang tertanam dalam lapisan glikokaliks atau lendir dengan ekspresi protein heterogen. Komponen padat dari glikokaliks terutama terdiri dari asam teikoaat (80%) serta protein stafilokokus dan hospes. Dalam studi selanjutnya, antigen polisakarida spesifik yang disebut *polysaccharide intercellular antigen* (PIA) telah terisolasi. PIA terdiri dari residu *b-1,6-linked N-acetylglucosamine* (80-85%) dan fraksi anionik dengan kandungan residu *non-N-acetylated D-glucosaminyl* yang lebih rendah yang mengandung fosfat dan *ester-linked succinate* (15-20%) (Archer *et al.*, 2011). Dalam sistem kekebalan tubuh bawaan (*innate immune system*), PMNs (*Polymorphonuclear Leucocytes*) dan makrofag merupakan yang pertama menanggapi infeksi *Staphylococci*. PMN dapat menyerang biofilm *Staphylococci* melalui fagositosis, pelepasan komponen *toxic granule*, dan produksi NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*). *Staphylococcus aureus capsular polysaccharide* menghambat opsonofagositosis bakteri planktonik oleh PMN. PIA dan kapsul dalam biofilm *Staphylococcus aureus* dapat melindungi bakteri dari sistem imun hospes. Selain itu, *agr system* juga memungkinkan biofilm *Staphylococcus aureus* untuk melawan pembunuhan oleh PMN (Paharik *et al.*, 2016).

Salah satu upaya dalam mengatasi permasalahan yang terjadi saat ini adalah menghambat pembentukan lapisan biofilm *Staphylococcus aureus*. Dalam mewujudkan hal tersebut, dapat dilakukan pemanfaatan produk-produk alami dari hewan, salah satunya adalah propolis. Propolis merupakan produk

sarang lebah yang diproduksi lebah dari resin *balsamic* yang secara aktif disekresikan oleh tanaman pada kuncup daun dan kulit kayu. Propolis pada dasarnya mengandung resin, balsam, minyak esensial, flavonoid, vitamin, mineral dan serbuk sari, walaupun pada konsentrasi yang berbeda. Aktivitas biologis terutama disebabkan oleh beberapa zat, seperti flavonoid, terpenoid, asam caffeic, ferulic dan *cumaric acid* dan ester (De Vecchi *et al.*, 2007).

Mekanisme aktivitas antimikroba dari propolis sangat kompleks dan dapat dikaitkan dengan aktivitas sinergis antara senyawa *phenolic* dan senyawa lainnya, terutama flavonoid pinocembrin, galangin, dan pinobanksin (Wagh, 2013). Salah satu spesies lebah penghasil propolis terbesar adalah *Trigona spp.*

Trigona spp. yang merupakan golongan *stingless bee*, mengumpulkan lebih banyak propolis dan lebih sedikit madu (Fatoni *et al.*, 2008). *Trigona spp.* banyak ditemukan di daerah tropis seperti Asia Tenggara. Kandungan antioksidan *phenol* propolis *Trigona spp.* lebih tinggi jika dibandingkan dengan spesies lebah lain. Selain itu, pH propolis *Trigona spp.* lebih asam sehingga menguntungkan bagi pencegahan dan penyembuhan (Usman *et al.*, 2016).

Berdasarkan penjelasan di atas dan mengetahui sulitnya terapi terhadap biofilm yang terbentuk dari infeksi *Staphylococcus aureus*, maka perlu dilakukan penelitian mengenai efek antimikroba ekstrak propolis dari lebah madu (*Trigona spp.*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini ditujukan untuk menjawab rumusan masalah sebagai berikut:

Apakah pemberian ekstrak propolis dari lebah madu (*Trigona spp.*) memiliki efek antimikroba sebagai penghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak propolis dari lebah madu (*Trigona spp.*) memiliki efek antimikroba sebagai penghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis hubungan antara konsentrasi ekstrak propolis lebah madu (*Trigona spp.*) dengan pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.
2. Mengukur Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dari ekstrak propolis lebah madu (*Trigona spp.*) yang dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

1. Dapat dijadikan referensi untuk menambah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan mengenai kegunaan ekstrak propolis lebah madu

(*Trigona spp.*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*.

2. Dapat dijadikan dasar teori dalam mengembangkan penelitian mengenai manfaat ekstrak propolis lebah madu (*Trigona spp.*).

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Dapat menghasilkan terapi alternatif terhadap biofilm yang dihasilkan akibat infeksi *Staphylococcus aureus*.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

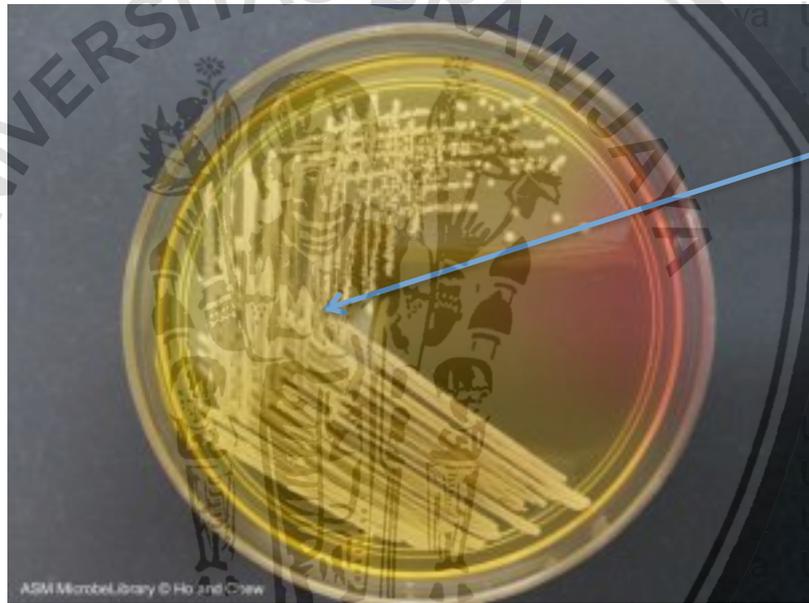
2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Morfologi dan Identifikasi

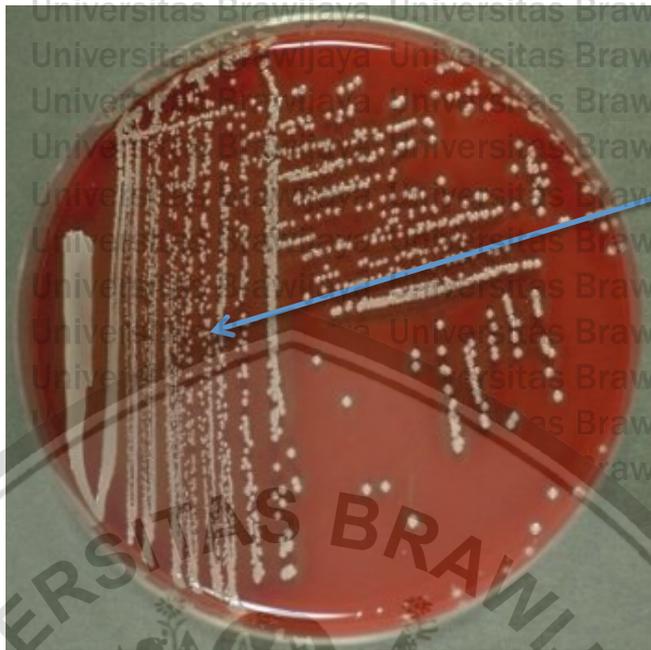
Staphylococci adalah bakteri gram positif, dengan diameter 0,5 – 1,5 μm dan dicirikan sebagai cocci individu, yang terbagi dalam lebih dari satu bidang untuk membentuk kelompok seperti anggur. *Staphylococci* merupakan anaerob fakultatif non-motil, dan tidak membentuk spora. Bakteri ini tumbuh dengan respirasi aerobik atau dengan fermentasi (Harris *et al.*, 2002). Diagnosis infeksi *Staphylococcus aureus* umumnya dilakukan dengan kultur swab ke media nonspesifik dan konfirmasi koloni secara biokimia dan/atau tes serologis. Hal ini melibatkan uji koloni *Staphylococci* untuk koagulasi plasma, fermentasi manitol (*mannitol salt agar* [MSA]), produksi *thermostable nuclease*, *lipase hydrolysis* dari kuning telur (*lipovitellin-salt-mannitol agar* [LSM]), dan produksi pigmen alami. Isolasi *Staphylococcus aureus* biasanya menggunakan media konvensional seperti *blood agar*, ditandai dengan terbentuknya koloni hemolitik berwarna kuning keemasan (Bakr dan Selim, 2007). Kerentanan antimikroba dari *Staphylococcus aureus* dapat ditentukan secara akurat dengan menggunakan isolasi dari *mannitol salt agar* (MSA), isolat berwarna kuning pada MSA dengan jumlah $>1+$ dapat dikatakan sebagai *Staphylococcus aureus* dengan kepercayaan 98% (Sharp dan Searcy, 2006). Selain itu, MSA merupakan satu dari media selektif yang paling banyak digunakan untuk isolasi *Staphylococcus aureus*. MSA mengandung manitol untuk mengindikasikan keberadaan *Staphylococcus aureus* dan sebuah variabel konsentrasi natrium klorida (*sodium*

chloride) untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya. Penemuan yang lebih baru yaitu penggunaan CHROMagar *Staphylococcus aureus* dengan memakai *chromogenic enzyme substrates* pada medium agar selektif yang memberikan tingkat sensitivitas dan spesifisitas tinggi (Bakr dan Selim, 2007).

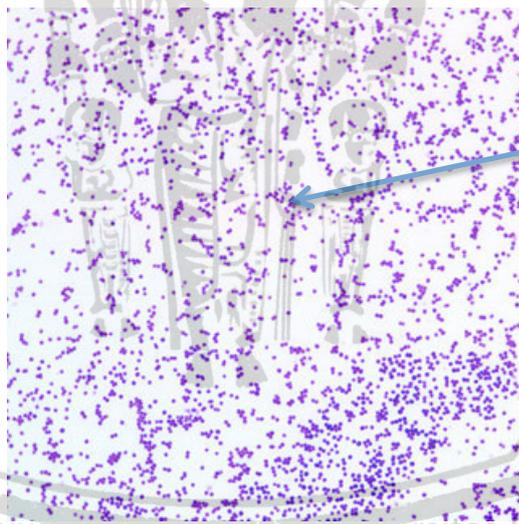
Visualisasi yang lebih cepat dari terbentuknya pigmentasi ungu muda spesifik pada koloni *Staphylococcus aureus* memungkinkan kultur yang lebih singkat (Bakr dan Selim, 2007).



Gambar 2.1 Tanda panah menunjukkan koloni *Staphylococcus aureus* pada medium Mannitol Salt Agar (Acharya, 2013).



Gambar 2.2 Tanda panah menunjukkan koloni *Staphylococcus aureus* pada medium Blood Agar (Department of Veterinary Disease Biology, 2011).



Gambar 2.3 Tanda panah menunjukkan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada pewarnaan gram (Jumaah et al., 2014).

2.1.2 Taksonomi

Taksonomi dari *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut (Todar, 2008):

Domain : Bacteria

Kingdom : Eubacteria

Phylum : Firmicutes

Kelas : Baccilli

Ordo : Baccillales

Family : Staphylococcaceae

Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus aureus*

2.1.3 Patogenesis

Staphylococcus aureus menyebabkan banyak jenis infeksi dan sindroma pada manusia, terutama infeksi kulit dan infeksi pada jaringan lunak. Abses merupakan manifestasi yang sering terjadi pada infeksi *Staphylococcus aureus* kulit dan jaringan lunak dan terbentuk, pada dasarnya, mengandung lokus infeksi. Leukosit polimorfonuklear (neutrofil) adalah pertahanan seluler utama terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* dan komponen utama abses *Staphylococcus aureus*. Neutrofil memproduksi banyak agen antimikroba yang efektif membunuh bakteri, tetapi juga dapat menyebabkan kerusakan non-spesifik pada jaringan dan berkontribusi pada pembentukan abses.

Staphylococcus aureus juga menghasilkan beberapa molekul yang berkontribusi pada pembentukan abses. Molekul tersebut menyebabkan lisis sel, dan terlibat dalam pembentukan kapsul fibrin yang mengelilingi abses (Kobayashi *et al.*, 2015). Terdapat banyak faktor virulensi yang disekresikan oleh *Staphylococcus*

aureus, termasuk *membrane damaging toxins* yang mampu membentuk pori-pori pada membran sitoplasma sel hospes yang akan menyebabkan sel-sel menjadi lisis. Selain itu, *Staphylococcus aureus* mengekspresikan susunan *cell wall-anchored* (CWA) yang terikat secara kovalen terhadap dinding sel peptidoglikan.

Semua protein CWA menempel ke dinding sel oleh transpeptidase yang dikenal sebagai sortase. *Clumping factor A* (ClfA) adalah protein pengikat fibrinogen utama *Staphylococcus aureus* dan berikatan dengan *C-terminal region* dari *fibrinogen γ -chain*, hal ini dapat menyebabkan agregasi trombosit atau penggumpalan bakteri dalam plasma. Keterikatan *Staphylococcus aureus* terhadap nares anterior selama kolonisasi difasilitasi oleh *staphylococcal surface adhesin, clumping factor B* (ClfB), melalui interaksi afinitas tinggi dengan selubung (*envelope*). Fibronectin-binding proteins (FnBPs) A dan B memungkinkan *Staphylococcus aureus* untuk menempel dan menyerang berbagai jenis sel, termasuk sel epitel, sel endotel, fibroblas, dan osteoblas.

Terdapat pula Protein A (SpA) yang merupakan protein permukaan multifungsi yang stabil dari *Staphylococcus aureus*. Protein ini penting untuk mengikat IgG dan ligan lainnya, seperti *TNF Receptor 1* (TNFR1) dan *von Willebrand factor* (VWF). Selain itu, *Iron Regulated Surface (Isd) Protein* yang terikat dengan membran mengandung *near iron transporter* (NEAT) yang dapat mengikat hemoglobin (Lacey *et al.*, 2016).

2.2 Biofilm *Staphylococcus aureus*

Sel bakteri menunjukkan dua jenis mode pertumbuhan, yaitu *planktonic cell* dan *sessile aggregate* yang dikenal dengan biofilm (Jamal *et al.*, 2015).

Bakteri sering menempel satu sama lain dan ke permukaan lalu membentuk biofilm (Oliveira *et al.*, 2015). Biofilm adalah asosiasi mikroorganisme dimana sel

menempel satu sama lain pada permukaan yang terbungkus dalam matriks dari substansi polimer ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri itu sendiri (Jamal *et al.*, 2015). *Staphylococcus aureus* cenderung membentuk biofilm pada implan medis atau jaringan yang rusak, daripada hidup sebagai sel planktonik bebas di dalam hospes. Dalam membentuk biofilm, bakteri gram positif menggunakan oligopeptida sebagai molekul sinyal, bahasa universal untuk komunikasi intraspesifik. Biofilm yang dibentuk oleh *Staphylococcus aureus* secara signifikan meningkatkan resistensi antibiotik dengan menghambat penetrasi antibiotik, yang mengakibatkan situasi semakin serius. Pembentukan biofilm membutuhkan adhesi sel ke substrat padat, yang menciptakan banyak lapisan sel. Adhesi antar sel membutuhkan PIA (*Polysaccharide Intercellular Antigen*), yang dapat disintesis oleh produk dari lokus adhesi antar sel (*ica*). Menghapus lokus *ica* dapat mengganggu produksi PIA dan pembentukan biofilm, menjadikannya target terapi potensial (Chen *et al.*, 2016).

2.2.1 Komposisi dan Struktur Biofilm

Biofilm adalah kelompok mikroorganisme dimana bakteri menghasilkan extracellular polymeric substances (EPS) seperti protein (<1-2% termasuk enzim), DNA (<1%), polisakarida (1-2%) dan RNA (<1%), dan sebagai tambahan pada komponen ini, air (sampai 97%) merupakan bagian utama biofilm yang bertanggung jawab atas aliran nutrisi di dalam matriks biofilm. Biofilm terdiri dari dua komponen utama, yaitu saluran air untuk transportasi nutrisi dan daerah sel padat yang tidak memiliki pori-pori yang menonjol di dalamnya (Jamal *et al.*, 2015). Dalam biofilm bakteri, berat molekul tinggi, *exopolysaccharides* yang disekresikan dapat berfungsi sebagai rangka dimana tambahan karbohidrat,

protein, lipid, dan asam nukleat melekat, membentuk matriks dari perkembangan biofilm. *Exopolysaccharides* ini dapat membentuk bagian penting dari *Extracellular polymeric substances* (EPS) yang terkait dengan pengembangan biofilm yang berfungsi untuk menyatukan populasi bakteri keseluruhan ke permukaan. EPS melindungi bakteri biofilm dari tekanan lingkungan (Bales *et al.*, 2013). *Extracellular polymeric substances* (EPS) menentukan kondisi langsung dari kehidupan sel biofilm yang tinggal di *microenvironment* dengan mempengaruhi porositas, kepadatan, kadar air, muatan, sifat penyerapan, hidrofobisitas, dan stabilitas mekanis. EPS sangat terhidrasi dan membentuk matriks, yang membuat sel biofilm tetap menyatu dan menahan air. Matriks ini berinteraksi dengan lingkungan, misalnya dengan menempelkan biofilm ke permukaan dan melalui sifat penyerapannya memungkinkan penyerapan zat terlarut dan partikel dari lingkungan serta menyediakan nutrisi untuk organisme biofilm. (Flemming *et al.*, 2007).

2.2.2 Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm merupakan proses yang sangat kompleks, di mana sel bakteri berubah dari mode pertumbuhan planktonik menjadi *sessile*. Proses pembentukan biofilm terjadi melalui serangkaian peristiwa yang menyebabkan adaptasi di bawah kondisi nutrisi dan lingkungan yang beragam. Ini merupakan proses multi-tahapan dimana bakteri mengalami perubahan-perubahan tertentu setelah melekat ke permukaan. Selama pembentukan biofilm, banyak spesies bakteri mampu berkomunikasi satu sama lain melalui mekanisme yang disebut *quorum sensing*. Ini merupakan sistem rangsangan untuk mengkoordinasikan ekspresi gen dengan sel lain dan respon yang terkait dengan kepadatan populasi mereka (Jamal *et al.*, 2015). Pada *staphylococci*, kemampuan untuk merasakan

kepadatan sel bakteri, atau kuorum, dan untuk merespon dengan adaptasi genetik adalah karena satu sistem utama, yang disebut *accessory gene regulator*

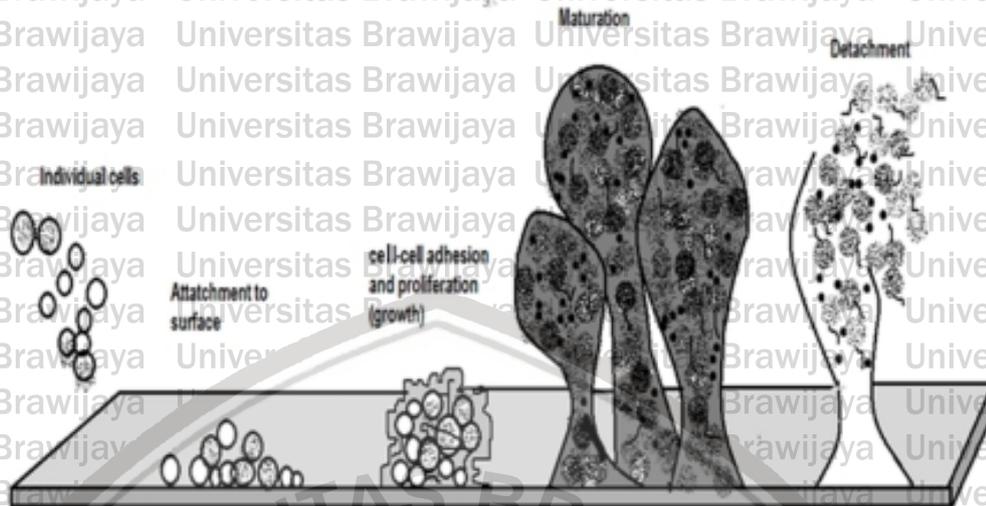
(Agr). Sinyal ekstraseluler Agr adalah peptida yang dimodifikasi setelah penerjemahan serta mengandung struktur tiolaktone. Dalam kondisi kepadatan sel yang tinggi, Agr bertanggung jawab atas peningkatan ekspresi toksin dan eksoenzim degradatif, dan penurunan ekspresi beberapa faktor kolonisasi.

Regulasi ini penting untuk menentukan waktu ekspresi faktor virulensi selama infeksi dan perkembangan penyakit akut, sementara aktivitas Agr yang rendah dikaitkan dengan infeksi *Staphylococcus* kronis yang melibatkan pembentukan biofilm (Le dan Otto, 2015). Transkrip *agrD* mengkodekan prekursor peptida dari

sinyal kuorum ekstraseluler dari Agr, yang disebut *autoinducing peptide* (AIP) (Ji et al., 1995). Sistem quorum-sensing dari *Staphylococcus aureus* memodulasi ekspresi faktor virulensi sebagai respons terhadap *autoinducing peptide* (AIP).

Sistem *quorum sensing* *Staphylococcus aureus* dikodekan oleh lokus *accessory gene regulator* (*agr*) dan molekul komunikasi lalu menghasilkan kuorum yang disebut *autoinducing peptide* (AIP), yang merupakan cincin tiolaktone siklik.

Selama pertumbuhan, AIP disintesis dan disekresikan melalui mekanisme yang membutuhkan banyak peptidase. Setelah AIP mencapai konsentrasi kritis, AIP berikatan dengan reseptor histidin kinase permukaan, memulai *regulatory cascade* yang mengontrol ekspresi berbagai faktor virulensi, seperti protease, hemolisin, dan toksin (Boles dan Horswill, 2008).



Gambar 2.4 Proses pembentukan biofilm (Jamal *et al.*, 2015).

Pembentukan biofilm terdiri dari tahapan-tahapan penting, yaitu:

1. Perlekatan
2. Pembentukan mikrokoloni
3. Pembentukan struktur tiga dimensi dan pematangan
4. Pelepasan

2.2.2.1 Perlekatan

Ketika sel bakteri mencapai ke dekat permukaan, begitu dekat sehingga gerakannya semakin melambat, bakteri membuat koneksi reversibel dengan permukaan dan/atau sudah menempel bakteri lain ke permukaan. Dalam pembentukan biofilm, sistem antarmuka padat-cair dapat menyediakan lingkungan yang ideal untuk bakteri untuk melekat dan tumbuh (misalnya darah, air) (Costerton, 1999). Permukaan yang kasar, hidrofilik, dan terlapisi akan memberikan lingkungan yang lebih baik dalam perlekatan dan pembentukan

biofilm. Bertambahnya perlekatan juga dapat terjadi karena peningkatan yang tidak melewati batas kritis dari kecepatan aliran, suhu air, atau konsentrasi nutrisi. Kehadiran struktur lokomotor pada permukaan sel seperti flagela, pili, *fimbriae*, protein atau polisakarida juga penting dan dapat memberikan keuntungan dalam pembentukan biofilm saat ada komunitas campuran (Donlan, 2002).

2.2.2.2 Pembentukan Mikrokoloni

Pembentukan mikrokoloni terjadi setelah bakteri menempel pada permukaan fisik/ jaringan biologis dan ikatan ini kemudian menjadi stabil yang berakibat pada pembentukan mikrokoloni. Multiplikasi bakteri dalam biofilm dimulai sebagai hasil dari sinyal-sinyal kimiawi. Mekanisme genetik dari produksi *exopolysaccharides* diaktifkan saat intensitas sinyal melewati ambang batas tertentu (Jamal et al., 2015). Jadi dengan menggunakan sinyal-sinyal kimiawi tersebut, pembelahan sel bakteri terjadi di dalam matriks *exopolysaccharides* yang tertanam, dan akhirnya menghasilkan mikrokoloni (Mckenney, 1998).

2.2.2.3 Pembentukan Struktur Tiga Dimensi dan Pematangan

Setelah tahap pembentukan mikrokoloni dari biofilm, ekspresi gen tertentu yang terkait biofilm terjadi. Produk gen ini diperlukan untuk EPS yang merupakan struktur utama biofilm. Pembentukan matriks diikuti oleh pembentukan saluran berisi air untuk transpor nutrisi dalam biofilm. Saluran air ini seperti peredaran darah, mendistribusikan nutrisi-nutrisi berbeda dan membuang material sisa dari mikrokoloni biofilm (Parsek dan Singh, 2003).

2.2.2.4 Pelepasan

Setelah pembentukan biofilm, bakteri akan meninggalkan biofilm itu sendiri secara teratur. Dengan melakukan ini, bakteri dapat mengalami

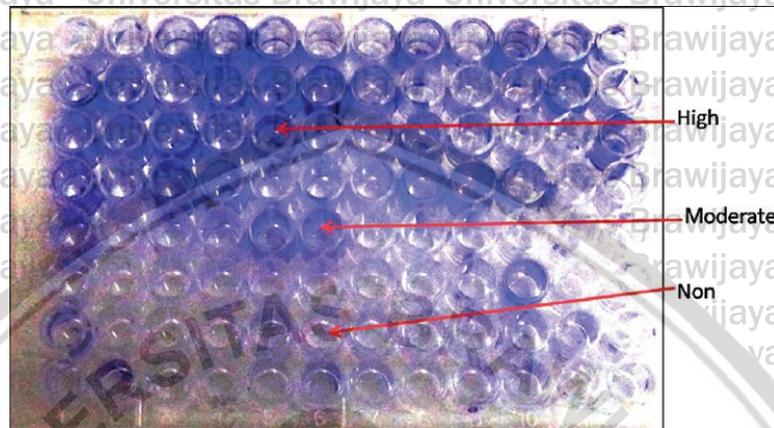
multiplikasi secara cepat lalu menyebar. Pelepasan sel planktonik bakteri merupakan pelepasan yang telah terprogram, yang memiliki pola alamiah (Jamal *et al.*, 2015). Terkadang dikarenakan beberapa stres mekanis bakteri terlepas dari koloni ke sekitarnya. Tetapi dalam kebanyakan kasus bakteri menghentikan produksi EPS dan terlepas ke lingkungan. Penyebaran sel-sel biofilm terjadi baik karena pelepasan dari sel-sel yang baru terbentuk dari sel yang sedang tumbuh maupun karena penyebaran dari agregat biofilm dikarenakan *quorum sensing* (Baselga, 1994).

2.2.3 Uji Pembentukan Biofilm

2.2.3.1 Metode *Tissue Culture Plate*

Uji kuantitatif *Tissue Culture Plate* merupakan metode *gold-standard* untuk deteksi biofilm (Mathur *et al.*, 2006). Bakteri yang diisolasi dari *agar plate* diinokulasi dalam 10 mL kaldu kedelai *trypticase* dengan glukosa 1%. Kaldu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur kemudian diencerkan 1:100 dengan media segar. *Well* individu dari *plate* steril kultur jaringan polystyrene diisi dengan 200 μ L kultur yang telah diencerkan. Bakteri kontrol juga diinkubasi, diencerkan, dan ditambahkan ke *plate* kultur jaringan. *Well* kontrol negatif mengandung kaldu steril yang terinokulasi. *Plate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, isi dari masing-masing *well* dihilangkan dengan mengetuk secara lembut. *Well* dicuci menggunakan 0.2 mL *phosphate buffer saline* (pH 7.2) sebanyak empat kali. Ini akan menghilangkan bakteri-bakteri yang mengambang bebas. Biofilm yang terbentuk oleh bakteri yang menempel pada *well* ditetapkan menggunakan 2% *sodium acetate* dan diwarnai menggunakan *crystal violet* (0.1%). Kelebihan pewarnaan dihapus menggunakan

air terdeionisasi dan *plate* disimpan untuk pengeringan. *Optical density* (OD) dari biofilm yang melekat diperoleh menggunakan *micro ELISA autoreader* pada panjang gelombang 570 nm (Stepanovic *et al.*, 2007).

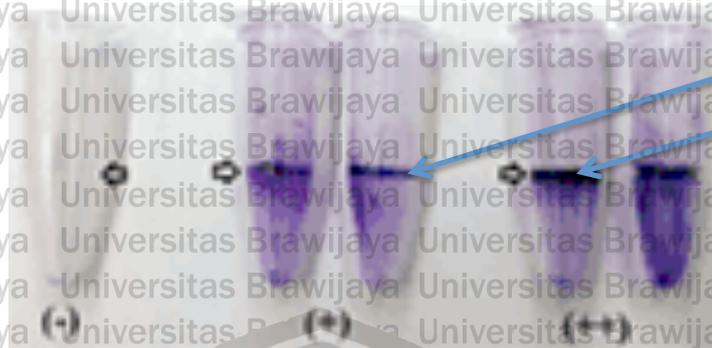


Gambar 2.5 Perbedaan warna bakteri pembentukan biofilm dan bakteri tidak ada pembentukan biofilm dengan metode *Tissue Culture Plate* (Ansari *et al.*, 2015).

2.2.3.2 Metode Tabung

Metode tabung merupakan metode kualitatif untuk deteksi biofilm (Christensen *et al.*, 1982). Bakteri uji diinokulasi dalam 10 mL kaldu kedelai *trypticase* dengan glukosa 1% pada tabung reaksi. Tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, tabung dituang dan dicuci menggunakan *phosphate buffer saline* (pH 7.3) dan dikeringkan. Tabung kemudian diwarnai dengan *crystal violet* (0.1%). Kelebihan pewarnaan dicuci menggunakan air terdeionisasi. Tabung dikeringkan dalam posisi terbalik. Pembentukan biofilm dianggap positif bila terlihat lapisan film pada dinding dan bagian bawah tabung.

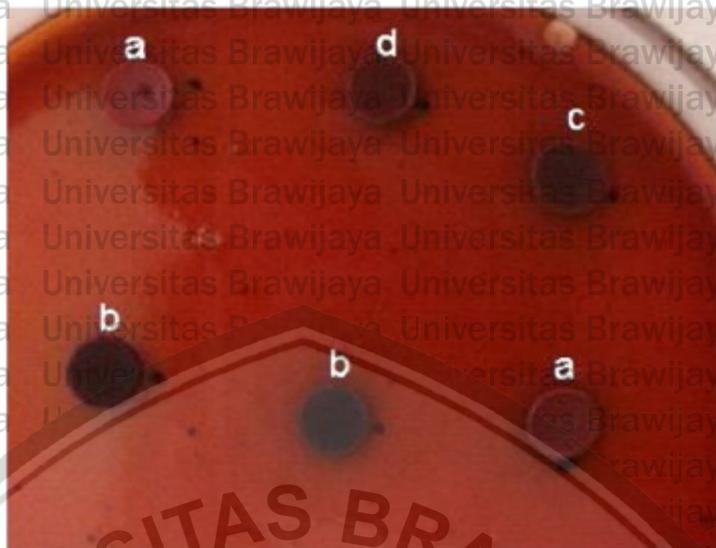
Jumlah biofilm yang terbentuk dinilai sebagai 1-lemah/tidak ada, 2-sedang, dan 3-tinggi/kuat (Hassan *et al.*, 2011).



Gambar 2.6 Perbedaan warna bakteri pembentukan biofilm dan bakteri tidak ada pembentukan biofilm dengan metode tabung (Latorre et al., 2016). Tanda panah menunjukkan cincin biofilm.

2.2.3.3 Metode Congo Red Agar

Congo Red Agar merupakan metode kualitatif sederhana untuk melihat adanya produksi biofilm (Freeman et al., 1989). Media CRA disiapkan dengan infusi kaldu otak dan jantung 37 g/L, sukrosa 50 g/L, agar No. 1 10 g/L, dan indikator Congo Red 8 g/L. Pertama pewarna *Congo Red* disiapkan sebagai larutan encer terkonsentrasi dan diotoklaf (suhu 121°C selama 15 menit) secara terpisah dari komponen media lainnya. Lalu ditambahkan agar infusi kaldu otak dan jantung yang telah diotoklaf dengan sukrosa pada suhu 55°C. *Plate* CRA diinokulasi dengan bakteri uji dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam secara aerobik. Koloni berwarna hitam dengan konsistensi kristal kering menunjukkan adanya produksi biofilm (Reid, 1999).



Gambar 2.7 Perbedaan warna koloni bakteri pembentuk biofilm (b, c, dan d) dan yang tidak membentuk biofilm (a) pada media Congo Red Agar (Kaiser et al., 2013).

2.3 Propolis

Propolis diproses dengan cara dihancurkan dalam penggiling dan kemudian disaring, untuk mendapatkan granulometri yang adekuat (sekitar 0,250 mm) untuk meningkatkan luas permukaan dan menyeragamkan bahan awal dalam proses ekstraksi (Machado et al., 2016). Ekstraksi menggunakan *ethanol* (*ethyl alcohol* C₂H₆O) sebagai pelarut. Konsentrasi antara propolis dengan *ethanol* ditentukan dengan cara menimbang berat propolis dan mengukur volume *ethanol* sesuai persen konsentrasi. Setelah itu propolis dan *ethanol* dimasukkan ke dalam wadah, disegel, lalu dikocok. Propolis direndam di dalam *ethanol* selama 2-3 minggu kemudian disaring sampai didapatkan cairan bening, bebas partikel dan berwarna coklat tua atau sedikit kemerahan (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017).

2.4 Taksonomi *Trigona spp.*

Taksonomi dari lebah madu (*Trigona spp.*) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Phylum : Arthropoda

Kelas : Insecta

Ordo : Hymenoptera

Super Family : Apoidea

Family : Apidae

Sub Family : Apinae

Genus : *Trigona*

Spesies : *Trigona spp.*

2.5 Senyawa Penghambat Biofilm

Komposisi kimia dari propolis terdiri dari resin 50%, wax 30%, minyak atsiri 10%, serbuk sari 5%, dan 5% zat lain yang meliputi mineral dan senyawa organik seperti *phenolic acids* (*cinnamic* dan *caffeic acid*) atau ester-ester, flavonoid (flavon, flavanon, flavonol, dan dihydroflavonol chalcones), terpen, aldehida aromatik dan alkohol, asam lemak, stilben, dan β -steroid (Barlak *et al.*, 2011).

2.5.1 Flavonoid

Sebagai unsur utama propolis, flavonoid berkontribusi besar pada aktivitas farmakologis dari propolis (Zhang *et al.*, 2014). Flavonoid memiliki spektrum yang luas dari sifat biologis, seperti antibakteri, antiviral, dan efek antiinflamasi (Bueno-Silva *et al.*, 2013). Flavonoid termasuk pinocembrin,

galangin, *pinobanksin*, dan *pinobanksin-3-acetate* mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan menghancurkan dinding sel, membran sitoplasma, dan sitoplasma, menyebabkan bakteriolisis parsial dan penghambatan sintesis protein seluler (Takaisi-Kikuni dan Schilcher, 1994). *Flavanone* menunjukkan aktivitas antimikroba yang kuat, karena *lipophilic prenyl group* dapat dengan cepat merusak fungsi membran dan dinding sel (Raghukumar *et al.*, 2010).

2.5.2 Terpenoid

Meskipun volatil hanya mewakili 10% unsur propolis, substansi ini menyebabkan karakteristik bau resin dan berkontribusi terhadap efek farmakologis propolis. Sebagai senyawa utama dari substansi volatil, terpenoid menunjukkan aktivitas antioksidan, antimikroba, dan aktivitas biologis lainnya (Huang *et al.*, 2014). Volatil mampu merangsang sistem kekebalan tubuh pasien lansia dengan meningkatkan aktivitas natural killer cell (Bankova *et al.*, 2014).

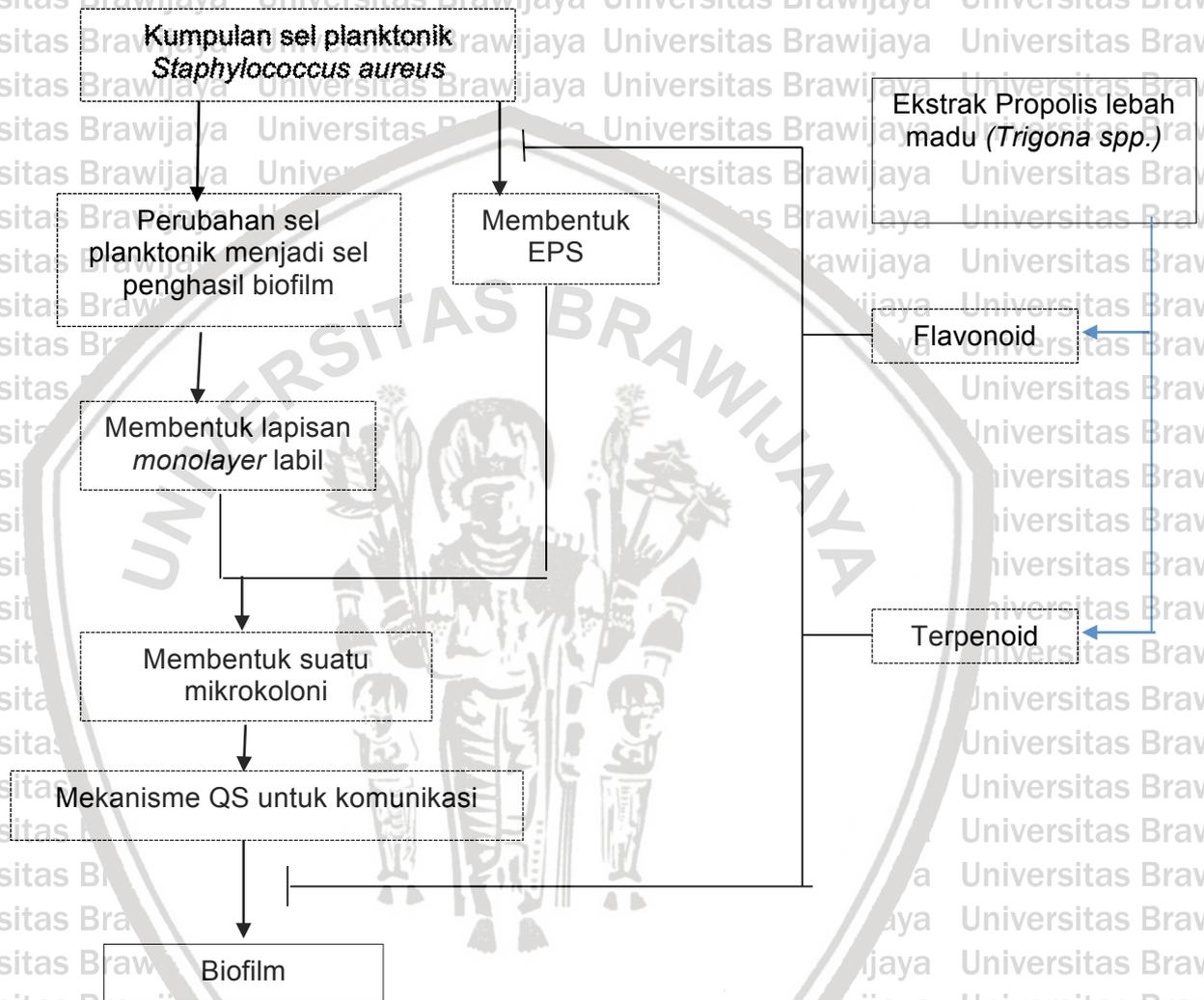
2.5.3 Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)

Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) memiliki aktivitas biologis yang luas, termasuk penghambatan nuclear factor κ -B, penghambatan proliferasi sel, serta induksi *cell cycle arrest* dan apoptosis (Huang *et al.*, 2014). CAPE meningkatkan regulasi dari ekspresi *reporter gene* untuk *retinoic acid receptor* (RARs) yang berhubungan dengan transkripsi dan diferensiasi sel, termasuk sel imun (misalnya leukosit) (Suzuki *et al.*, 2006).

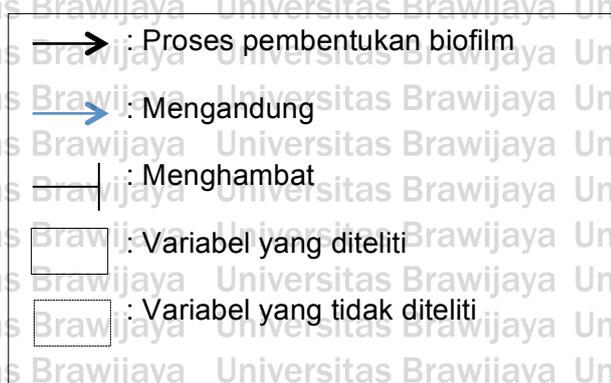
BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Bagan 3.1 Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian



Penelitian ini mengamati pengaruh ekstrak ethanol propolis lebah madu (*Trigona spp.*) terhadap pembentukan biofilm dari *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian ini menggunakan ekstrak ethanol propolis yang mengandung bahan aktif seperti flavonoid dan terpenoid. Flavonoid memiliki kemampuan untuk menghambat *intercellular adhesion genes* *icaA* dan *icaD* yang dapat mensintesis *Polysaccharide Intercellular Adhesion* (PIA). Hal ini menyebabkan terhambatnya proses *quorum sensing* dengan tidak terjadinya agregasi bakteri. Flavonoid dan Terpenoid bersinergi dalam menghambat mekanisme QS dengan menghambat sinyal pada *quorum sensing*.

Dengan adanya berbagai kandungan senyawa pada ekstrak propolis yang bersifat sebagai antibiofilm dan antibakteri, diharapkan dapat terjadi hambatan pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak propolis dari lebah madu (*Trigona spp.*) memiliki efek antimikroba sebagai penghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental-post test only control group design*) dan metode uji Tabung.

Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%.

Sedangkan kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Ekstraksi bahan penelitian dilakukan di Peternakan Lebah Madu Rimba Raya Malang pada bulan Februari 2018. Surat pernyataan keaslian ekstrak dapat dilihat di **Lampiran 1**. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada rentang waktu Februari 2018 – April 2018.

4.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan ekstrak propolis lebah madu *Trigona spp.* dan sampel bakteri uji yang digunakan pada penelitian adalah *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang diambil dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Bakteri diidentifikasi ulang sebelum penelitian.

4.4 Pengulangan

Pada penelitian ini jumlah pengulangan yang dilakukan menggunakan rumus $(p-1)(n-1) \geq 15$ dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan. Terdapat 6 perlakuan pada penelitian ini, sehingga estimasi besar sampel adalah:

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka besar sampel atau pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 4.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol propolis lebah madu (*Trigona spp.*) dengan konsentrasi tertentu (dalam %), yaitu 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%.

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah kadar hambat biofilm minimal ekstrak etanol propolis lebah madu (*Trigona spp.*) dalam menghambat biofilm yang dibentuk oleh *Staphylococcus aureus* dengan uji tabung.

4.6 Definisi Operasional

1. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang digunakan pada penelitian ini berasal dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Bakteri ini akan diidentifikasi ulang sebelum penelitian.
2. Biofilm adalah agregat multiseluler yang membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat atau medium. Pada penelitian ini biofilm dibentuk oleh *Staphylococcus aureus* pada medium cair dalam tabung.
3. Ekstrak etanol propolis lebah madu (*Trigona spp.*) adalah hasil ekstraksi cair propolis dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Propolis berasal dari propolis mentah yang diekstraksi di peternakan lebah madu di Lawang.
4. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) adalah konsentrasi ekstrak etanol propolis lebah madu (*Trigona spp.*) terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan tidak tampaknya bentukan cincin dan lapisan ungu kebiruan pada airfluid border (area antara medium cair dan udara) dalam tabung uji. KHBM dicapai apabila hasil rerata *Mean Gray Value* sebesar 10% dibawah *Mean Gray Value* tabung kosong (Macià et al, 2014).
5. Kontrol Bahan adalah ekstrak etanol propolis lebah madu (*Trigona spp.*) yang tidak dicampur bakteri *Staphylococcus aureus* dan digunakan untuk membuktikan bahwa bahan yang digunakan steril.
6. Kontrol Kuman adalah biakan bakteri yang tidak dicampur dengan ekstrak etanol propolis lebah madu (*Trigona spp.*) sebagai pembanding

pertumbuhan bakteri jika tidak diberikan ekstrak. Dan kontrol kuman berlaku sebagai kontrol positif.

7. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang diberikan ekstrak dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% pada tabung yang diisi dengan bakteri.

8. *Mean Gray Value* adalah skala intensitas warna pada program *Adobe*

Photoshop. Skala berkisar antara 0-255. Angka mendekati 0

menunjukkan kepekatan warna yang tinggi. Angka mendekati 255

menunjukkan kepekatan warna yang rendah (Andiyani, 2014). Nilai

KHBM ditentukan melalui penilaian *Mean Gray Value* pada tabung

kosong yang tidak terbentuk cincin dan tidak terdapat bekas pewarnaan.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Propolis

1. Propolis mentah lebah madu *Trigona spp.*
2. Etanol 96%
3. Timbangan analitik
4. Gelas kimia 250 ml
5. Sokhet
6. Cawan petri
7. Penjepit cawan petri
8. Desikator
9. Spatula
10. Pemanas aquades
11. Kertas saring

12. Thimble

13. Oven

4.7.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Isolat *Staphylococcus aureus*

2. Bahan pengecatan Gram: lugol, kristal violet, safranin, dan alkohol 96%

3. Minyak imersi, mikroskop, dan ose

4. Medium agar *Natrium Plate Agar* (NAP)

5. Lampu spiritus

6. Tabung reaksi

4.7.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. TSB + *glycerol* 10%

2. Biakan *Staphylococcus aureus*

3. Tabung reaksi

4. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,3

5. *Deionized water*

6. Kristal violet

7. Pipet

8. Ose

9. *Beaker glass*

10. Inkubator

Foto dari alat dan bahan penelitian dapat dilihat di **Lampiran 2**.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Persiapan Propolis Lebah Madu (*Trigona spp.*)

4.8.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi

Menurut Sudarmadji *et al* (2003) prosedur ekstraksi dan evaporasi sebagai berikut.

1. Propolis yang sudah dijadikan bubuk seberat 100 gram ditimbang dalam neraca analitik.
2. Propolis tersebut diletakkan dalam thimble atau selongsong tempat sampel dan dimasukkan dalam ekstraktor sokhlet.
3. Labu yang sudah berisi etanol 96% lalu dihubungkan dengan sokhlet.
4. Kondensor dihubungkan juga dengan sokhlet dan dipasang selang air.
5. Buka aliran air sehingga selang air akan terisi dan berfungsi sebagai pendingin. Nyalakan alat pemanas listrik yang ditempatkan di bawah labu. dan proses ekstraksi dimulai.
6. Uap dari hasil didihan pelarut atau etanol 96% akan berjalan melalui sokhlet menuju kondensor, dan di sana akan kembali menjadi fase cair karena terdapat proses pendinginan yang disebabkan oleh adanya aliran air. Fase cair ini nantinya akan menetes ke thimble dan melarutkan lemak sampel sehingga sari atau tetesan ekstrak akan mengalir menuju labu. Proses ini berlangsung selama kurang lebih ± 5 jam.
7. Pelarut atau etanol 96% dipisahkan dari ekstrak dengan cara melepas thimble dan dilanjutkan dengan proses destilasi dengan cara yang sama dengan ekstraksi sokhlet sehingga ekstrak yang diperoleh menjadi lebih pekat selanjutnya dengan memindahkan ekstrak ke dalam botol timbang.

8. Kemudian untuk memastikan bahwa hasil ekstrak sudah tidak terkandung pelarut atau etanol 96%, hasil ekstrak harus dioven dengan suhu 70°C - 80°C hingga aroma etanol tidak tercium dan diperoleh bobot konstan, sehingga didapatkan ekstrak kental (konsentrasi 100%).

4.8.2 Identifikasi Bakteri

4.8.2.1 Pewarnaan Gram

Menurut Forbes *et al* (2007) prosedur pewarnaan gram sebagai berikut:

1. *Object glass* dibersihkan dahulu dengan kapas, dilanjutkan fiksasi dengan dilewatkan di atas api dan biarkan dingin sehingga *object glass* menjadi steril dari bahan pencemar lain. Kemudian pembuatan sediaan yang tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis dengan cara:
 2. Teteskan satu ose aquades steril pada gelas objek. Ambil sedikit biakan kuman menggunakan ose, kemudian suspensikan dengan aquades pada gelas objek dan ratakan. Khusus sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
 3. Biarkan sediaan kering di udara, kemudian lakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api satu atau dua kali.
 4. Tuang sediaan pada gelas objek dengan kristal violet dengan durasi 1 menit. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.
 5. Tuang sediaan dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
 6. Tuang sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas lagi dengan air.
 7. Tuang sediaan dengan safranin selama ½ menit. Buang sisa safranin dan bilas lagi dengan air.

8. Keringkan sediaan dengan kertas penghisap dan tetesi minyak imersi.
9. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x
10. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang diamati di bawah mikroskop adalah bakteri coccus berwarna ungu (gram positif).

4.8.2.2 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus* (Hadietomo, 1990).

1. Tuangkan 0,2 H₂O₂ 3% ke dalam tabung reaksi.
2. Ambil sedikit biakan bakteri dengan ose.
3. Usapkan ose pada dinding tabung diatas permukaan cairan.
4. Tutup tabung reaksi, lalu goyangkan agar cairan H₂O₂ 3% dapat mengenai usapan biakan bakteri.
5. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung, menunjukkan bakteri *Staphylococcus*.
6. Hasil negative ditandai dengan tidak adanya gelembung, menunjukkan bakteri *Streptococcus*.

4.8.2.3 Uji Koagulase

Langkah – langkah pengujian sebagai berikut (Brückler *et al.*, 1994) :

1. Teteskan satu ose plasma darah dengan EDTA (*Edetate disodium*) pada gelas objek yang kering dan bersih (gelas objek A).
2. Teteskan air distilasi / air salin sebagai kontrol pada gelas objek B.
3. Ambil sedikit biakan kuman dengan ose. Buat suspensi dengan masing-masing gelas objek dan diratakan perlahan selama 5-10 detik.

4. Hasil positif ditandai dengan adanya penggumpalan dalam waktu 10 detik atau kurang pada gelas objek A dan tidak ada penggumpalan pada gelas objek B. Hasil positif menunjukkan *Staphylococcus aureus*.
5. Hasil negatif bila tidak ada penggumpalan pada kedua gelas objek. Hasil negatif menunjukkan *Staphylococcus* koagulase negatif.

4.8.2.4 Perbenihan Pada Nutrient Agar Plate (NAP)

Staphylococcus aureus yang ditanam pada medium *Nutrient Agar Plate* (NAP), koloninya akan berwarna kuning emas, berbentuk bulat, konveks dengan tepi rata, permukaan mengkilat, dan konsistensi lunak.

4.8.2.5 Pemiakan Bakteri Pada Medium NAP

Langkah – langkah pemiakan sebagai berikut (Kaito, 2006) :

1. Ambil 1 ose steril sampel dari biakan *nutrient broth*.
2. Goreskan pada medium NAP dengan metode *quadrant streak*.
3. Sediaan diinkubasi di inkubator 37°C selama 18-24 jam.
4. Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* menghasilkan gambaran bulat berwarna kuning emas.

4.8.2.6 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

Langkah – langkah perbenihan sebagai berikut (Ruchi *et al.*, 2015) :

1. Beberapa koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang sudah ditanam di Nutrient Agar Plate (NAP) dipindahkan ke Nutrient Broth (NB) selama 24 jam dalam inkubator 37°C, kemudian dilakukan *spektrofotometri* dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui nilai absorbansi dan suspensi.

2. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar 10^6 /mL yang setara dengan OD = 0,1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Keterangan:

V1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil *spektrofotometri*)

V2 = Volume suspensi bakteri uji (10 mL)

N2 = OD (0,1 = setara dengan 10^6 /mL)

3. Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^6 /ml sebanyak 10 mL.
4. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^6 /mL sebanyak 10 mL, dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan NaCl dan *nutrient broth*, sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^8 /mL. Kini bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.8.2.7 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Metode *Tube-test*)

Pengujian yang dilakukan sebagai berikut (Christensen *et al.*, 2000) :

Staphylococcus aureus yang sudah teridentifikasi disimpan dalam media

Tryptic Soy Broth (TSB) + *glycerol* 10% dan diinkubasi pada suhu 37°C

semalam. Mikroba kultur semalam selanjutnya dimasukkan ke tabung TSBglu

(10 ml) dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. Selanjutnya tabung dicuci

dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan

diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci

dengan *deionized water* hingga akhirnya tabung dikeringkan dan dilihat formasi

biofilmnya. Formasi biofilm ini ditandai dengan adanya cincin berwarna ungu kebiruan yang melekat pada dinding tabung.

4.8.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada *Staphylococcus aureus*

Sebelum menentukan konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian, dilakukan penelitian pendahuluan dengan konsentrasi ekstrak 1,675%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%. Hasil penelitian pendahuluan digunakan sebagai dasar pemilihan konsentrasi untuk penelitian. Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa pada konsentrasi 25% dan 50% sudah tidak ditemukan adanya pembentukan cincin biofilm pada area *airfluid border*. Hasil penelitian pendahuluan dapat diamati pada **Lampiran 3**. Berdasarkan hasil tersebut ditentukan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian sesungguhnya yaitu 0%; 10%; 20%; 30%; 40%; dan 50%. Konsentrasi 0% merupakan kelompok kontrol yang menggunakan NaCl tanpa pemberian ekstrak.

Langkah – langkah pengujian sebagai berikut (Praharaj *et al.*, 2013) :

1. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri 1×10^8 CFU/ml.
2. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSB + *glycerol* 10% berdasarkan perhitungan OD dari spektrofotometri.
3. Mengisi tabung reaksi 1-6 dengan suspensi bakteri dalam medium TSB + *glycerol* 10% 2ml, dan satu tabung lain (kontrol) diisi 4ml.
4. Kemudian 2 ml dalam larutan ekstrak dalam tiap tabung kecil dicampurkan dalam tabung reaksi 1-6 sehingga didapatkan larutan sebanyak 4 ml dengan konsentrasi ekstrak propolis pada masing-masing tabung sebagai berikut:

Tabung 1: 0% (kontrol)

Tabung 2: 10%

Tabung 3: 20%

Tabung 4: 30%

Tabung 5: 40%

Tabung 6: 50%

Seluruh tabung diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C

5. Setelah 24 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya.
6. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) 0,5 ml lalu kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*.
7. Tabung dikeringkan.
Segera amati dan catat biofilm yang terbentuk. Dapat terlihat sebuah film melapisi sisi dan dasar tabung. Hal ini diyakini sebagai indikasi pembentukan biofilm.

4.9 Pengukuran Kuantitatif

Pengukuran secara kuantitatif dilakukan untuk mendapatkan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM). Metode yang dilakukan merupakan modifikasi metode *Rapid Assay* oleh Larimer *et al* (2015). Metode ini terdiri dari tiga langkah sederhana; pewarnaan pada sampel, sampel difoto dengan kamera digital, dan foto dianalisis secara digital. Analisis digital oleh Larimer *et al* (2015) mengukur *Biofilm Growth Intensity* (BGI) pada setiap sampel dan memberikan nilai antara 0 – 100 yang mewakili skor absolut untuk intensitas biofilm pada sampel. Nilai 100 menunjukkan intensitas paling tebal, dan nilai 0 menunjukkan intensitas paling

tipis. *Matlab software* merupakan perangkat lunak yang digunakan untuk analisis BGI. Gambar sampel dipilih untuk diimpor, lalu dipilih area dari masing-masing sampel untuk dianalisis.

Pada penelitian ini pengukuran intensitas menggunakan nilai *Mean Gray Value* dan perangkat lunak yang digunakan adalah *Adobe Photoshop CC 2017*.

4.9.1 Pengambilan Foto

Setiap tabung ditempatkan di atas alas kertas bersih di bawah kamera digital (Fujifilm XT-10 16 MP). Pencahayaan untuk foto dikontrol agar konsisten untuk setiap tabung. Pencahayaan yang tersebar terang dipilih untuk menghindari bayangan, silau, dan pantulan pada sampel. Kamera yang digunakan dioperasikan dalam mode manual dengan pencahayaan $f / 2$, $1/60$ s, ISO 51200, panjang fokus 5 mm dan tanpa *blitz*.

4.9.2 Pengukuran Mean Gray Value

Pengukuran *Mean Gray Value* untuk mengetahui intensitas pembentukan biofilm pada masing-masing kelompok menggunakan perangkat lunak komputer *Adobe Photoshop CC 2017*. Tidak didapatkan adanya perubahan nilai *Mean Gray Value* dengan adanya perubahan perbesaran pada gambar. Nilai *Mean Gray Value* dinyatakan dalam skala 0 – 255. Semakin rendah nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tebal, sementara semakin tinggi nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tipis.

Langkah-langkah dimulai dengan membuka aplikasi *Adobe Photoshop CC 2017*, pilih *File* dan masukkan hasil fotonya. Selanjutnya pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, blok area yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*, lalu klik *Record Measurements* maka akan didapatkan nilai *Mean Gray Value*. Pengukuran *Mean Gray Value*

menggunakan aplikasi *Adobe Photoshop* selengkapnya dapat dilihat di

Lampiran 4.

4.9.3 Pengukuran Kadar Hambat Biofilm Minimal

Kadar Hambar Biofilm Minimal (KHBM) dicapai apabila hasil rerata *Mean*

Gray Value sebesar 10% dibawah *Mean Gray Value* tabung kosong (Macia *et al.*,

2014). Penentuan KHBM merupakan modifikasi penelitian Macia *et al* (2014)

yang menggunakan program COMSTAT berbasis *Matlab*.

4.10 Analisis Data

Pada penelitian ini menggunakan variabel numerik dengan faktor yang

ingin diketahui yaitu perbedaan pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak

etanol propolis terhadap intensitas warna yang ditimbulkan oleh biofilm pada

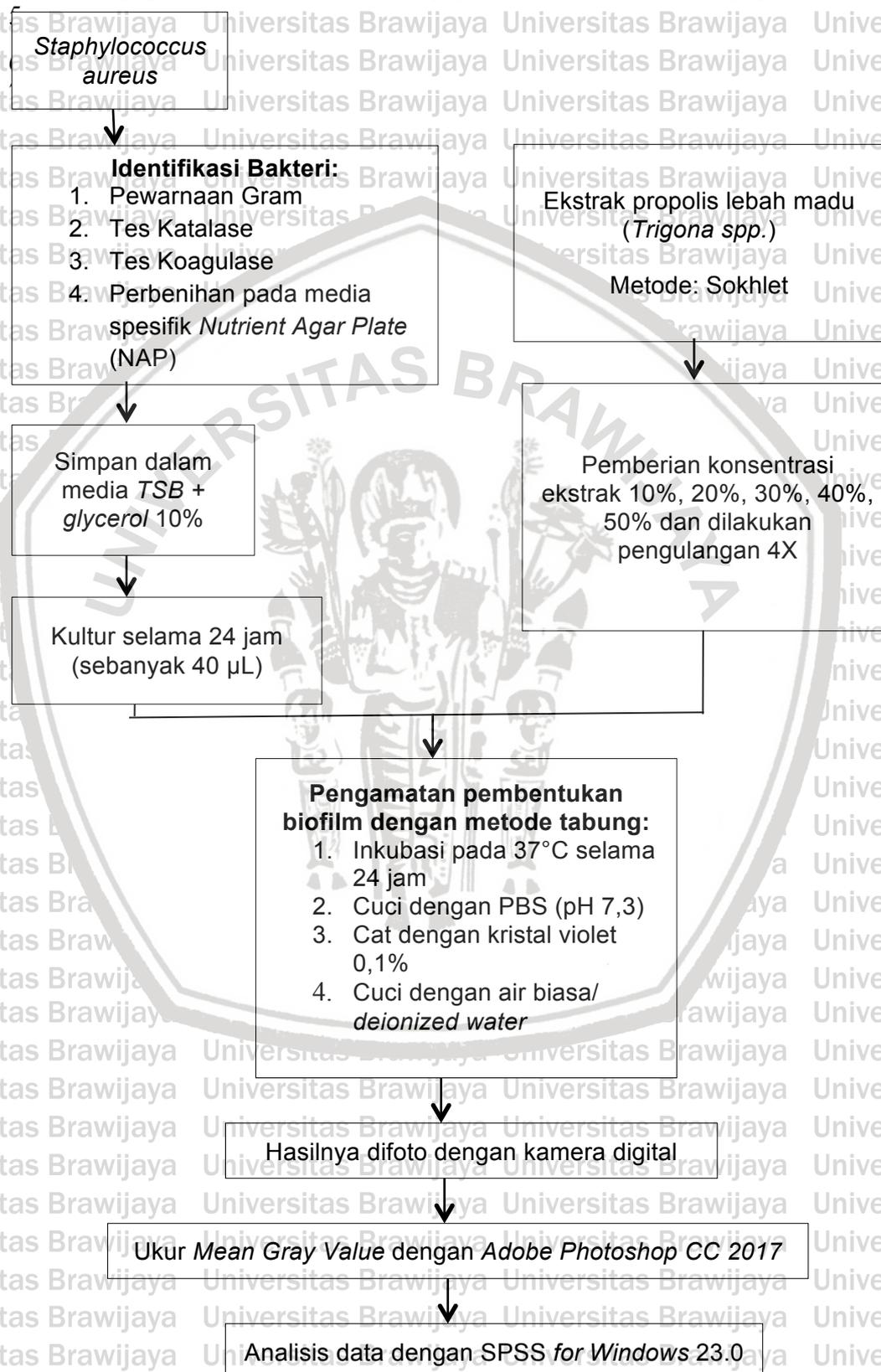
tabung (*Mean Gray Value*). Analisis hasil penelitian ini menggunakan analisis

statistik SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 23.0 untuk *Windows*.

Langkah-langkah pengujian sebagai berikut (Dahlan, 2009) :

1. Uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk menguji normalitas suatu distribusi data apakah data tersebar normal atau tidak tersebar normal. Uji Homogenitas menggunakan uji *Levene* untuk menguji data homogen atau tidak homogen.
2. Uji *Oneway ANOVA* dengan syarat distribusi data harus normal dan varian data harus homogen. Jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka menggunakan metode *Kruskal Wallis*.
3. Uji korelasi *Pearson* dengan syarat distribusi data harus normal dan homogen. Jika distribusi data tidak normal dan tidak homogen, maka dilakukan dengan metode *Spearman*

4.11 Rencana Operasional Penelitian



Bagan 4.1 Rancangan Operasional Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Identifikasi Ulang Bakteri Uji

Semua isolat bakteri diidentifikasi pada medium *Nutrient Agar Plate* (NAP), pewarnaan gram, tes katalase, tes koagulase, dan uji kepekaan antibiotik untuk membuktikan bahwa isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian merupakan bakteri *Staphylococcus aureus*. Pada medium NAP semua isolat menunjukkan koloni berwarna kuning keemasan. Pada pewarnaan gram yang diamati pada perbesaran 1000 kali, didapatkan bakteri kokus berbentuk bulat berwarna ungu yang menandakan bakteri tersebut merupakan bakteri berbentuk kokus gram positif. Pada tes katalase didapatkan hasil positif dengan terbentuknya gelembung berbusa, sedangkan pada tes koagulase terbentuk gumpalan seperti pasir. Pada uji kepekaan antibiotik (cefotaxime) didapatkan zona inhibisi sebesar 30 mm yang berarti bakteri sensitif terhadap antibiotik.



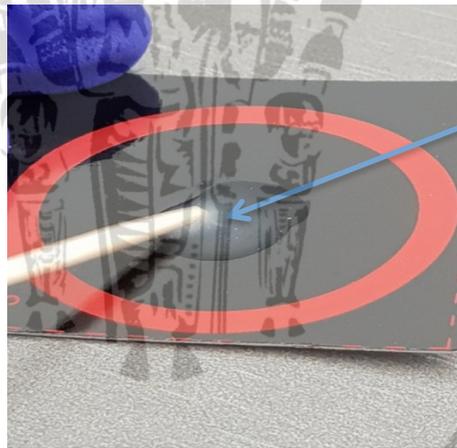
Gambar 5.1 Hasil pewarnaan gram *Staphylococcus Aureus*

Keterangan: Tanda panah menunjukan bakteri gram positif berbentuk coccus berwarna ungu bergerombol seperti anggur.



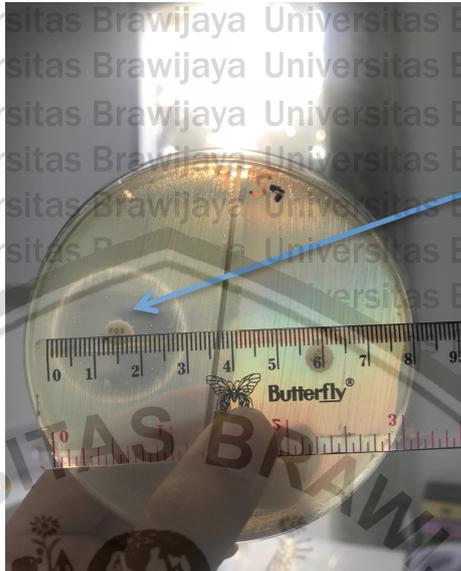
Gambar 5.2 Hasil tes katalase

Keterangan: Tanda panah menunjukkan terbentuknya gelembung pada kertas *stephaurex* yang menandakan bahwa tes katalase positif.



Gambar 5.3 Hasil tes koagulase

Keterangan: Tanda panah menunjukkan terbentuknya gumpalan seperti pasir pada kertas *stephaurex* positif yang menandakan bahwa tes koagulase positif.

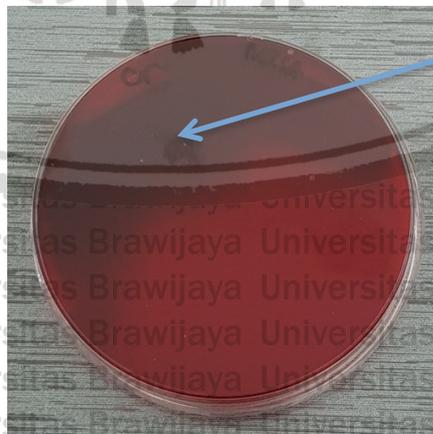


Gambar 5.4. Hasil uji sensitivitas antibiotik (cefoxitine)

Keterangan: Tanda panah menunjukkan zona inhibisi sebesar 30 mm yang menandakan bahwa bakteri sensitif antibiotik.

5.1.1 Hasil Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

Semua isolat bakteri ditanam pada medium *Congo Red Agar* (CRA) lalu diinkubasi selama 24 jam untuk mendeteksi pembentukan biofilm. Hasil positif pembentukan biofilm jika didapatkan koloni bakteri yang berwarna hitam, bulat, dan berkilau.

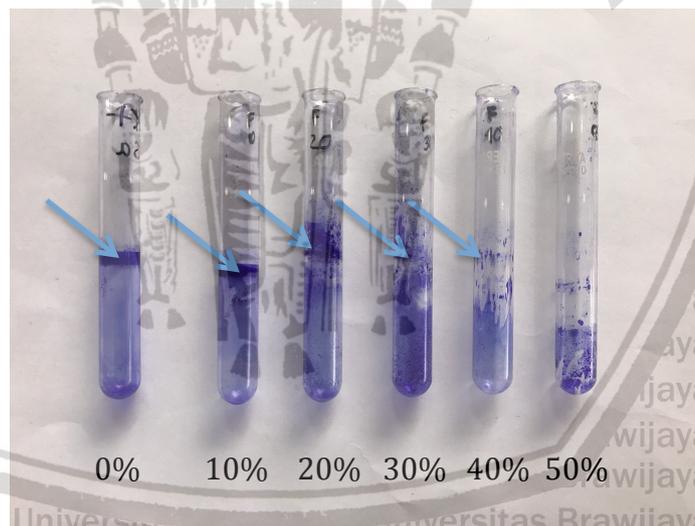


Gambar 5.5 *Staphylococcus Aureus* biofilm pada Congo Red Agar (CRA)

Keterangan: Tanda panah menunjukkan koloni bakteri berwarna hitam, bulat, dan berkilau yang menandakan bakteri membentuk biofilm.

5.1.2 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Pengamatan dilakukan terhadap intensitas cincin yang terbentuk pada *airfluid border* yang menandakan terbentuknya biofilm. Pada penelitian, ditemukan tabung dengan pemberian konsentrasi 50% cincin biofilm sudah tidak tampak. Pengukuran *Mean Gray Value* juga dilakukan pada tabung yang masih baru untuk melihat nilai awal *Mean Gray Value* tabung kosong untuk tabung yang digunakan. Apabila *Mean Gray Value* pada kelompok perlakuan $\leq 10\%$ dibawah dari *Mean Gray Value* tabung kosong, maka konsentrasi pada kelompok tersebut merupakan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) (Macia *et al.*, 2014). Pada penelitian ini, tabung kosong yang digunakan menunjukkan nilai *Mean Gray Value* sebesar 133,29. Nilai ini kemudian dibandingkan dengan nilai *Mean Gray Value* kelompok perlakuan.



Gambar 5.6 Hasil Penelitian Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Keterangan: Gambar menunjukkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak, maka ketebalan cincin semakin tipis. Biofilm ditandai cincin berwarna biru pada tabung. Keterangan gambar: (1) Konsentrasi 0%, (2) Konsentrasi 10%, (3) Konsentrasi 20%, (4) Konsentrasi 30%, (5) Konsentrasi 40%, (6) Konsentrasi 50%. Pada penelitian, ditemukan tabung dengan pemberian konsentrasi 50% cincin biofilm sudah tidak tampak.

Gambar hasil pengulangan dapat dilihat di **Lampiran 5**.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Mean Gray Value dengan Aplikasi Adobe Photoshop CC 2017

Konsentrasi	Pengulangan				Mean \pm SD
	I	II	III	IV	
0%	26,14	26,14	26,20	26,18	26,17 \pm 0,03
10%	35,32	31,58	33,97	33,16	33,51 \pm 1,56
20%	44,54	49,42	47,61	44,32	46,47 \pm 2,47
30%	61,67	68,10	59,25	56,40	61,36 \pm 4,98
40%	86,72	88,36	88,23	87,19	87,63 \pm 0,79
50%	133,14	102,59	116,38	127,83	119,99 \pm 13,74
Mean Gray Value					133,29

Tabung Kosong

Keterangan: Semakin kecil nilai *Mean Gray Value* mencerminkan biofilm yang terbentuk masih tebal. Sebaliknya, nilai *Mean Gray Value* yang tinggi berarti cincin biofilm sudah menipis. Kadar Hambat Biofilm Minimal dicapai bila hasil rerata *Mean Gray Value* 10% di bawah *Mean Gray Value* tabung kosong, yaitu 119,96 (10% dibawah 133,29). Dapat dilihat KHBM pada penelitian ini adalah pada konsentrasi 50%, di mana rerata *Mean Gray Value* 119,99.

5.2 Analisis Data

Analisis hasil penelitian menggunakan analistik statistik SPSS versi 23.

Pertama, hasil MGV seperti yang terdapat pada tabel 5.1 dilakukan Uji

Normalitas dan Uji Homogenitas untuk menentukan uji apa yang akan digunakan. Setelah didapatkan bahwa data normal dan homogen, dilanjutkan

dengan melakukan analisis menggunakan Uji *Oneway Anova*. Uji tersebut

berguna untuk memastikan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok

data. Selanjutnya dilakukan analisis dengan Uji *Post Hoc* dengan metode *Tukey*

HSD untuk melihat signifikansi suatu kelompok data dengan kelompok lainnya.

Kemudian, dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan antara variable dependen dan variable independen, yaitu berupa hubungan tebal biofilm

bakteri dengan perubahan kadar ekstrak propolis dan juga bentuk hubungannya (lurus atau terbalik).

5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Uji Normalitas dilakukan dengan metode *Shapiro-Wilk* dikarenakan jumlah data kurang dari 50. Dari Uji Normalitas yang dilakukan didapatkan $p = 0,200$ yang dapat disimpulkan bahwa persebaran data normal (syarat persebaran normal $p > 0,05$). Kemudian dilakukan Uji homogenitas *Levene* untuk melihat apakah data homogen, dan didapatkan hasil $p = 0,226$. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa data homogen (syarat homogen $p > 0,05$).

Hasil lebih rinci terdapat pada **Lampiran 6 dan 7**.

5.2.2 Uji *Oneway ANOVA*

Sebelum menganalisa data MGV dengan *Oneway ANOVA* dilakukan syarat *ANOVA* untuk > 2 kelompok data tidak berpasangan, yaitu pengujian terhadap sebaran data (harus normal) dan varians data harus homogen. Setelah semua syarat terpenuhi maka dilakukan Uji *Oneway ANOVA*. Dari hasil Uji *ANOVA* diperoleh nilai $p = 0,000$. Hasil ini dapat disimpulkan bahwa terdapat sedikitnya 2 kelompok data yang memiliki perbedaan MGV secara signifikan (syarat $p < 0,05$). Hasil lebih rinci terdapat pada **Lampiran 8**.

5.2.3 Uji *Post Hoc*

Uji *Post-Hoc* dengan metode *Tukey* dilakukan untuk mengetahui signifikansi antara masing-masing kelompok data. Perbedaan dianggap signifikan apabila nilai $p < 0,05$ pada masing-masing kelompok data. Hasil lebih rinci terdapat pada **Lampiran 9**.

5.2.4 Uji Korelasi *Pearson*

Uji Korelasi *Pearson* dilakukan untuk menilai kekuatan hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak propolis lebah madu *Trigona spp.* dan *Mean Gray Value*. Dari hasil uji Korelasi *Pearson*, didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Nilai Korelasi = 0,957, yang berarti korelasi antara konsentrasi ekstrak propolis lebah madu *Trigona spp.* dengan *Mean Gray Value* sangat kuat.
2. Arah korelasi positif, berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak propolis lebah madu *Trigona spp.*, semakin besar nilai *Mean Gray Value* yang berarti semakin tipis cincin biofilm yang terbentuk.
3. Nilai $p = 0,000$, berarti terdapat korelasi yang signifikan ($p < 0,05$) antara konsentrasi ekstrak propolis lebah madu *Trigona spp.* dengan *Mean Gray Value*.

Hasil lebih rinci terdapat pada **Lampiran 10**.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek ekstrak Propolis Lebah Madu (*Trigona spp.*) untuk menghambat pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Salah satu spesies lebah penghasil propolis terbesar adalah *Trigona spp.* Lebah jenis *Trigona spp.* menghasilkan lebih sedikit madu dan lebih banyak propolis. Propolis Lebah Madu (*Trigona spp.*) memiliki banyak manfaat yang telah diteliti pada penelitian sebelumnya. Kandungan dalam propolis Lebah Madu (*Trigona spp.*) yang diduga dapat menghambat pembentukan biofilm adalah flavonoid dan terpenoid. Propolis Lebah Madu (*Trigona spp.*) didapatkan dalam bentuk pasta dan diekstraksi di Peternakan Lebah Rimba Raya Lawang. Teknik ekstraksi yang digunakan adalah teknik sokhlet. Uji hambat pembentukan biofilm pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode dilusi tabung (*tube test*). Pengamatan pembentukan biofilm diketahui dengan melihat adanya pembentukan cincin pada dinding tabung yang berwarna ungu. Sedangkan pengamatan biofilm secara kuantitatif untuk mendapatkan Kadar Hambat Biofilm Minimal dilakukan dengan mengukur intensitas warna yang dinyatakan dalam *Mean Gray Value* (MGV) dengan menggunakan *Adobe Photoshop CC 2017*. Nilai MGV berada dalam skala 0-255. Cara pengukuran ini dipilih karena MGV dapat merepresentasikan ketebalan biofilm secara kuantitatif, yaitu dengan cara mengukur transmitansi cahaya terhadap tabung.

Sebelum dilakukan penelitian ini, dilakukan penelitian pendahuluan dengan konsentrasi ekstrak 1,675%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%.

Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa cincin biofilm bakteri MRSA tidak terbentuk pada konsentrasi ekstrak 25%. Berdasarkan hasil tersebut, dilakukan

penelitian menggunakan konsentrasi 10%; 20%; 30%; 40%; 50%, dan 0% untuk mencari Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dan konsentrasi efektif untuk

menghambat biofilm dengan analisa statistik. Hasil penelitian kemudian didokumentasikan dan dilakukan pengukuran MGTV dengan *Adobe Photoshop*

CC 2017. Hasil pengukuran MGTV menunjukkan bahwa rata-rata MGTV naik seiring dengan peningkatan ekstrak etanol propolis Lebah Madu (*Trigona spp.*).

Hal tersebut membuktikan bahwa biofilm yang terbentuk semakin tipis yang menandakan pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* terhambat. Rata-rata

MGTV setiap konsentrasi akan dibandingkan dengan rata-rata MGTV tabung kosong. Kadar Hambat Biofilm Minimal dicapai apabila hasil MGTV 10% dibawah

MGTV tabung kosong. Dalam penelitian ini didapatkan KHBM adalah 119,96. Nilai tersebut tercapai pada konsentrasi ekstrak 50%.

Penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Takaisi-Kinuni dan Schilcher (1994) yang menyebutkan bahwa Flavonoid mampu menghambat pertumbuhan

bakteri dengan menghancurkan dinding sel, membran sitoplasma, dan sitoplasma, sehingga menyebabkan bakteriolisis parsial dan penghambatan

sintesis protein seluler. Penelitian lain yang dilakukan oleh Raghukumar (2010) juga menunjukkan bahwa *Flavanone* yang merupakan salah satu tipe dari

Flavonoid memiliki aktivitas antimikroba yang kuat, karena *lipophilic prenyl group* dapat dengan cepat merusak fungsi membran dan dinding sel. Flavonoid juga

mampu menghambat pertumbuhan bakteri genus *Streptococcus*. Sabir (2005)

menunjukkan bahwa Flavonoid propolis *Trigona spp.* mampu menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Propolis tersebut berasal dari Kabupaten Bulukumba, provinsi Sulawesi Selatan. Hasil penelitian Sabir (2005) menunjukkan bahwa setelah masa inkubasi 24 jam, flavonoid 0,1% merupakan konsentrasi yang paling efektif dan flavonoid 0,5% merupakan konsentrasi yang paling efektif setelah masa inkubasi 48 jam. Pertumbuhan bakteri gram negatif juga dapat dihambat oleh Flavonoid propolis *Trigona spp.* Fatoni (2008) dalam penelitiannya menggunakan propolis *Trigona spp.* yang diambil dari Bukittinggi Sumatera Barat selama musim kemarau. Hasil penelitian tersebut mengungkapkan bahwa Flavonoid dari EEP (*Ethanol Extract Propolis*) *Trigona spp.* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Campylobacter spp.* Di antara konsentrasi seri EEP yang diuji, konsentrasi terendah yang masih menunjukkan efek penghambatan adalah 2,08% (dua ulangan), dan 1,04 (satu sampel), sehingga rata-rata *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) adalah 1,73%. Selain itu, penelitian lainnya yang sesuai adalah penelitian Huang (2014) yang menunjukkan terpenoid memiliki aktivitas antioksidan, antimikroba, dan aktivitas biologis lainnya. Hal ini didukung oleh penelitian Bankova (2014) terhadap pasien lansia bahwa Terpenoid juga mampu merangsang sistem kekebalan tubuh dengan meningkatkan aktivitas natural killer cell.

Produk lain yaitu madu yang dihasilkan oleh *Trigona spp.* juga memiliki efek antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*. Madu *Trigona spp.* memiliki tingkat kandungan fenolik moderat dan aktivitas radikal bebas yang menunjukkan efek penghambatan kuat (75-90%) pada pembentukan biofilm, terutama pada 20% madu. Selain itu, efek dari fitokimia dan keasaman fungsional (pH 2,31) dalam madu 20% berkontribusi hingga 70% pengurangan pada biofilm (Ng et al.,

2016).

Spesies lebah lain yang menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus* adalah *Apis Mellifera* dan *Tetragonisca angustula*.

Penelitian Miorin (2003) menunjukkan bahwa propolis memiliki aktivitas antimikroba yang lebih tinggi dibandingkan madu terhadap *Staphylococcus aureus*. Kadar hambat minimum (KHM) dari madu *A. mellifera* berkisar antara 126,23 hingga 185,70 mg/ml, *T. angustula* dari 142,87 hingga 214,33 mg/ml.

Untuk propolis, KHM berkisar antara 0,36 hingga 3,65 mg/ml (*A. mellifera*) dan dari 0,44 hingga 2,01 mg/ml (*T. angustula*).

Dalam penelitian lain, propolis *Trigona spp.* mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri genus *Streptococcus* yang juga merupakan bakteri gram positif. Penelitian Linggriani (2018) menunjukkan bahwa Flavonoid dari propolis *Trigona spp.* menekan pembentukan biofilm secara in vitro oleh *Streptococcus mutans* yang diisolasi dari plak gigi anak-anak. Konsentrasi 0,05% sama efektifnya dengan konsentrasi 0,1% dalam menekan pembentukan biofilm oleh strain *Streptococcus mutans* yang diselidiki secara klinis. Propolis *Trigona spp.* yang digunakan pada penelitian tersebut didapat dari Luwu, Sulawesi Utara dan diekstraksi menggunakan metode maserasi.

Terkait aktivitas antifungal, penelitian Yusoff *et al* (2016) menunjukkan bahwa propolis *Trigona spp.* yang berasal dari Malaysia tidak memiliki aktivitas antifungal begitupun spesies lebah lain yaitu *Apis mellifera*. Berbeda dengan produk lain yaitu madu dari *Trigona spp.* menunjukkan aktivitas antifungal terhadap tiga jenis *Candida spp.* *Trigona spp.* adalah satu-satunya madu yang efektif terhadap *Candida spp.* berdasarkan variasi dari *stingless bee* dan senyawa flavonoid dalam madu.

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak etanol propolis Lebah Madu (*Trigona spp.*) mampu untuk menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Efek hambatan ini meningkat dengan kenaikan konsentrasi ekstrak yang digunakan. Manfaat klinis yang dapat dikembangkan dari hasil penelitian ini adalah potensi penggunaan propolis Lebah Madu (*Trigona spp.*) sebagai alternatif terapi pada infeksi *Staphylococcus aureus*. Pencegahan pembentukan biofilm diharapkan dapat mengurangi morbiditas dan mortalitas pada pasien dengan infeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Counfounding factor dalam penelitian ini diantaranya adalah *crude extract* yang menyebabkan zat warna akan melekat sehingga pembacaan dengan MGTV menjadi sulit. Selain itu, lama penyimpanan ekstrak dalam penelitian ini juga dapat mempengaruhi hasil penelitian. Belum jelas apakah semakin lama penyimpanan ekstrak akan mempengaruhi tingkat efektivitasnya.

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah pengamatan yang dilakukan secara visual dan menggunakan pengukuran MGTV masih belum dapat menilai secara langsung mekanisme hambatan pembentukan biofilm. Penelitian ini telah membuktikan adanya hambatan pembentukan biofilm yang sejalan dengan peningkatan konsentrasi ekstrak propolis yang diberikan. Berdasarkan keterbatasan tersebut, dapat dipertimbangkan eksplorasi uji hambat biofilm dengan menggunakan metode lain, misalnya dengan isolasi zat aktif dari propolis.

Penelitian ini tidak menggunakan zat aktif propolis secara langsung dikarenakan proses ekstraksi yang tidak secara spesifik menghasilkan satu jenis zat aktif. Berdasarkan keterbatasan tersebut, belum diketahui secara pasti zat aktif manakah yang paling berperan dalam menghambat proses pembentukan biofilm. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai masing-masing zat aktif yang terkandung dalam propolis dalam menghambat pembentukan biofilm.

Diharapkan penelitian ini dapat dilanjutkan mengenai efek ekstrak etanol propolis Lebah Madu (*Trigona spp.*) secara *in vivo* yang kelak akan berguna pada masyarakat luas.



BAB 7

KESIMPULAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak propolis lebah madu (*Trigona spp.*) dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dari ekstrak propolis lebah madu (*Trigona spp.*) terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* adalah pada konsentrasi 50%.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan saya menyarankan hal-hal sebagai berikut :

1. Penelitian lebih lanjut mengenai zat aktif yang terkandung dalam propolis lebah madu (*Trigona spp.*) yang dapat berperan sebagai penghambat pembentukan biofilm.
2. Penelitian lebih lanjut mengenai dosis efektif propolis lebah madu (*Trigona spp.*) dalam menghambat pembentukan biofilm tanpa menimbulkan efek toksik.
3. Penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas ekstrak propolis lebah madu (*Trigona spp.*).
4. Penelitian lebih lanjut mengenai efek lama simpan ekstrak terhadap efektivitas ekstrak etanol propolis lebah madu (*Trigona spp.*) sebagai antibiofilm bakteri *Staphylococcus aureus*.

5. Potensi untuk mengembangkan penelitian yang menggunakan ekstrak propolis lebah madu (*Trigona spp.*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vivo*.
6. Eksplorasi cara pembilasan dan teknik pewarnaan agar tidak mengganggu pembacaan MGVI.
7. Penelitian lebih lanjut mengenai efek dari produk lain dari lebah madu *Trigona spp.* terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*.



DAFTAR PUSTAKA

- Acharya T. 2013. Microbe Online. *Mannitol Salt Agar (MSA): Composition, uses and colony characteristics*, (Online), (<https://microbeonline.com>, diakses 13 Agustus 2018).
- Andiyani D. Z. P. 2014. *Efek Ekstrak rimpang Jahe Merah (Zingiber officinale var. Rubra) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm pada Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak dipublikasikan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Ansari M.A., Khan H.M., Khan A.A., Cameotra S.S., Alzohairy M.A. 2015. Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33 (1): 101-109.
- Archer N.K., Mazaitis M.J., Costerton J.W., Leid J.G., Powers M.E., Shirliff M.E. 2011. *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Virulence*, 2 (5): 445-459.
- Bakr W.M.K., Selim H.S. 2007. Chromagar Staph aureus Versus Blood Agar and Mannitol Salt Agar for Isolation and Identification of *Staphylococcus aureus* from Suppurative Skin Lesions. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 16 (1): 63-65.
- Bales P.M., Renke E.M., May S.L., Shen Y., Nelson D.C. 2013. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. *PLoS ONE*, 8 (6): e67950.
- Boles B.R., Horswill A.R. 2008. *agr*-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLOS Pathogens*, 4(4): e1000052.
- Bush L.M., Schmidt C.E., Perez M.T. 2017. Staphylococcal Infections. *MSD MANUAL*, 1: 1-12.
- Bankova V., Popova M., Trusheva B. 2014. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem Cent J*, 8: 28.
- Barlak Y., Değer O., Çolak M., Karataylı S. C., Bozdayı A. M., Yücesan F. 2011. Effect of Turkish Propolis Extracts on Proteome of Prostate Cancer Cell Line. *Proteome Science*, 9 (74) doi: 10.1186/1477-5956-9-74.
- Baselga R. 1994. *Staphylococcus aureus* Capsule and Slime as Virulence Factors in Ruminant Mastitis: A Review. *Vet Microbiol*, 39: 195-204.
- Brückler, J., Schwarz, S. and F. Untermann, F. 1994. Staphylokokken -infektionen und -enterotoxine, band. II/1, In: Blobel, H. und Schließer (Eds.), Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- Bueno-Silva B., Alencar S.M., Koo H., Ikegaki M., Silva G.V., Napimoga M.H., Rosalen P.L. 2013. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from brazilian red propolis. *J. Agric. Food Chem*, 61: 4546-4550.

Chen Y., Liu T., Wang K., Hou C., Cai S., Huang Y., Du Z., Huang H., Kong J. 2016. Baicalein Inhibits *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and the Quorum Sensing System *In Vitro*. *PLoS ONE*, 11 (4): e0153468.

Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. 1982. Adherence of Slime Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. *Infect Immun*, 37: 318-26.

Christensen, Gordon D., Simpson W., Anglen, Jeffrey O., Gainor, Barry J. 2000. Handbook of Bacterial Adhesion. New Jersey: Humana Press Inc.

Costerton J. 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Sci*, 284: 1318-1322.

Dahlan M.S. 2009. *Statistik untuk Kedokteran Kesehatan*. Jakarta: Salemba Medika.

Department of Veterinary Disease Biology. 2011. *Staphylococcus aureus*, Microatlas, Denmark, 2011. hal. 1.

De Vecchi E., Drago L. 2007. Propolis' Antimicrobial Activity: What's New?. *Infez Med*, 15 (1): 7-15.

Donlan R.M., Costerton J.W. 2002. Biofilm: Survival Mechanism of Clinically relevant Microorganism. *Clin Microbial Rev*, 15: 167-193.

Fatoni A., Artika I. M., Hasan A. E. Z., Kuswandi. 2008. Antibacterial Activity of Propolis Produced by *Trigona* spp. Against *Campylobacter* spp. *HAYATI Journal of Biosciences*, 15 (6): 161 – 164.

Flemming H.C., Neu T.R., Wozniak D.J. 2007. The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". *Journal of Bacteriology*, 189 (22): 7945-7947.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. *How to Process Raw Propolis Into Propolis Extracts*, TECA, Italia, 2016. hal. 1.

Forbes B.A, Sahm D.F, Weissfeld A.S. 2007. *Baley and Scott's Diagnostic Microbiology*, 12th ed. St. Louis: Mosby Company.

Freeman J., Falkiner F.R., Keane C.T. 1989. New Method for Detecting Slime Production by Coagulase Negative *Staphylococci*. *J Clin Pathol*, 42: 872-4.

Gnanamani A., Hariharan P., Paul-Satyaseela M. 2017. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. *Frontiers InTech*, 1: 3-4.

Hadietomo, R.S. 1990. Mikrobiologi dasar dalam praktek teknik dan prosedur dasar laboratorium. Penerbit PT Gramedia, Jakarta. Hal 103-104.

Harris L.G., Foster S.J., Richards R.G. 2002. An Introduction to *Staphylococcus aureus* and Techniques for Identifying and Quantifying *S. aureus* Adhesins in Relation to Adhesion to Biomaterials: Review. *European Cells and Materials*, 4: 39.

Hassan A., Usman J., Kaleem F. 2011. Evaluation of Different Detection Methods of Biofilm Formation in the Clinical Isolates. *Braz J Infect Dis*, 15 (4): 305-311.

Huang S., Zhang C.P., Wang K., Li G.Q., Hu F.L. 2014. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19: 19610-19632.

Jamal M., Tasneem U., Hussain T., Andleeb S. 2015. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4 (3): 1-9.

Ji G., Beavis R. C., Novick R. P. 1995. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci*, 92 (26): 12055-9.

Jumaah N., Joshi S.R., Sandai D. 2014. Prevalence of Bacterial Contamination when using a Diversion Pouch during Blood Collection: A Single Center Study in Malaysia. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 21 (3): 47-53.

Kaiser T.D.L., Pereira E.M., Santos K.R.N., Maciel E.L.N., Schuenck R.P., Nunes A.P.F. 2013. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *ScienceDirect*, 75 (3): 235-239.

Kaito, C., Sekimizu, K. 2006. Colony spreading in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 189(6), 2553-7.

Kobayashi S.D., Malachowa N., DeLeo F.R. 2015. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *American Journal of Pathology*, 185 (6): 1518-27.

Lacey K.A., Geoghegan J.A., McLoughlin R.M. 2016. The Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens. *Pathogens*, 5 (1): 22.

Larimer C., Winder E., Jeters R., Prowant M., Nettleship I., Addleman R.S., Bonheyo G.T. 2015. A method for rapid quantitative assessment of biofilms with biomolecular staining and image analysis. *Anal Bioanal Chem*, 408: 999-1008.

Latorre J. D., Hernandez-Velasco X., Wolfenden R.E., Vicente J.L., Wolfenden A.D., Menconi A., Bielke L.R., Hargis B.M., Tellez G. 2016. Evaluation and Selection of *Bacillus* Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. *Front Vet Sci*, 3: 95.

Le K.Y., Otto M. 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front Microbiol*, 6: 1174.

Linggriani A., Rizal M. F., Fauziah E., Suharsini M. 2018. Differences in the effects of 0.05% and 0.1% propolis flavonoids on in vitro biofilm formation by streptococcus mutans from children's dental plaque. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11 (2): 215.

Machado B.A., Silva R.P., Barreto G.A., Costa S.S., Silva D.F., Brandao H.N., Rocha J.L., Dellagostin O.A., Henriques J.A., Umsza-Guez M.A., Padilha FF. 2016. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red

- Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS One*, 11(1): e0145954.
- Macià M. D., Rojo-Molinero E., Oliver A. 2014. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. 20(10): p. 981–990.
- Mariati D., Ambarwati, Indrayudha P. 2013. Potensi Isolat *Actinomycetes* dari Rizosfer Padi (*Oryza sativa*L.) Sebagai Penghasil Antibiotik. *Naskah Publikasi Universitas Muhammadiyah Surakarta*, hal. 1-2.
- Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T., Rattan A. 2006. Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of *Staphylococci*: An Evaluation of Three Different Screening Methods. *Indian J Med Microbiol*, 24 (1): 25-9.
- Mckenny D. 1998. The Ica Locus of *Staphylococcus epidermidis* Encodes Production of The Capsular Polysaccharide/ Adhesin. *Infect Immunity*, 66: 4711-4720.
- Miorin P. L., Junior N. C. L., Custodio A. R., Bretz W. A., Marcucci M. C. 2003. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis Mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 913 – 920.
- Ng W., Chan Y. J., Lau Z. K., Lye P. Y. 2016. Antioxidant Properties and Inhibitory Effects of Trigona Honey against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm cultures. *International Journal of GEOMATE*, 12 (37): 28 - 33.
- Oliveira N.M., Garcia E.M., Xavier J., Durham W.M., Kolter R., Kim W., Foster K.R. 2015. Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. *PLOS Biology*, 13 (8): e1002232.
- Otto M. 2013. *Staphylococcus aureus* Toxins. *Curr Opin Microbiol*, 0: 32-37.
- Paharik A.E., Horswill A.R. 2016. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. *Microbiol Spectr*, 4 (2): 10.
- Parsek M.R., Singh P.K. 2003. Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 57: 677-701.
- Praharaj AK, Tandel K, Kumar S. 2013. Differences in Vancomycin MC among MRSA Isolates by Agar Dilution and E Test Method. *Indian Journal of Medical Microbiology* vol.30(4): 453-455.
- Radji M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*, 50, Jakarta, EGC.
- Raghukumar R., Vali L., Watson D., Fearnley J., Seidel V. 2010. Antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of 'pacific propolis' and isolated prenylflavanones. *Phytother*, 24: 1181–1187.
- Reid G. 1999. Biofilms In Infectious Disease and On Medical Devices. *Int. J. Antimic Ag*, 11: 223-6.

Ruchi T., Sujata B., Anuradha D. 2015. *Comparison of Phenotypic Methods for the Detection of Biofilm Production in Uro-Pathogens in a Tertiary Care Hospital in India*. 4(9): 840–849.

Sabir. 2005. Aktivitas antibakteri flavonoid propolis *Trigona* sp. terhadap bakteri *Streptococcus mutans* (in vitro). *Dent J*, 38: 135-141.

Sharp S.E., Searcy C. 2006. Comparison of Mannitol Salt Agar and Blood Agar Plates for Identification and Susceptibility Testing of *Staphylococcus aureus* in Specimens from Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol*, 44 (12): 4545.

Stepanovic S., Vukovi D., Hola V. 2007. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by *Staphylococci*. *APMIS*, 115: 891-9.

Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi. 2003. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.

Sugiyono. 2007. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.

Suzuki, T., Nishimaki-Mogami, T., Kawai, H., Kobayashi, T., Shinozaki, Y., Sato, Y., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Inoue, K., Ohno, Y., Hayakawa, T., and Kawamishi, T. 2006. Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives. *Phytomedicine*, 13 (6): 401-411.

Takaisi-Kikuni N. B. dan Schilcher H. 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med*, 60 (3): 222-227.

Todar K., 2008. *Todar's Online Textbook of Bacteriology. Staphylococcus aureus and Staphylococcal Disease*, (Online), (<http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>, diakses 3 Desember 2017).

Usman A.N., Syam Y., Natzir R., Rahardjo S.P., Hatta M., Raya I., Widaningsih Y., Abdullah A.Z., Ainurafiq. 2016. Nutrient Content and pH of Honey Propolis *Trigona* from Masamba, South Sulawesi Indonesia. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, 26 (3): 246-251.

Wagh V.D. 2013. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013: 1-11.

Yusoff N. Y. N., Mohamad S., Abdullah H. N., Rahman N. A. B. 2016. Antifungal activity of Malaysian honey and propolis extracts against pathogens implicated in denture stomatitis. *AIP Conference Proceedings*. 17 (91).

Zhang C., Huang S., Wei W., Ping S., Shen X., Li Y., Hu F. 2014. Development of High-Performance Liquid Chromatographic for Quality and Authenticity Control of Chinese Propolis. *J. Food Sci*, 79: C1315–C1322.