

INHIBITION OF ETHANOL EXTRACT OF PROPOLIS *Apis trigona* BEE AGAINST THE GROWTH RATE OF *Enterococcus faecalis* BACTERIA (*in vitro*)

Shinto Kharuniavi Indiana¹, Arya Adiningrat²

¹ Dentistry Student, Faculty of Medicine and Health Science UMY

² Oral Science Department, Faculty of Medicine and Health Science UMY
shintoindiana@gmail.com

ABSTRACT

Background: *E. faecalis* are the most bacteria that cause the failure of endodontic treatment when the recurrent infection happens. Beside chemical drugs, the compound that can be used as the alternative treatment is herbal medicament that has an antibacterial effect. One of them is ethanol extract of propolis (EEP). **Purpose:** This study aims to assess the growth of the *Enterococcus faecalis* bacteria towards the addition EEP from *Apis trigona* bees. **Methods:** This research is conducted as an experimental laboratory *in vitro*. The method used is liquid dilution on medium Brain Heart Infusion (BHI) and the measurement of turbidity using Spectrophotometer UV-vis. Extracts ethanol of propolis from *Apis trigona* bees were tested on the bacteria *Enterococcus faecalis* into some concentrations: 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1%, and 0.05% based on the weight/volume (w/v). **Results:** All tested concentrations can inhibit the growth rate of *Enterococcus faecalis* bacteria. The most effective concentration in the course of bacterial growth rate was 0.08% ($p < 0.05$). **Conclusion:** The EEP from *Apis trigona* bees effectively inhibit the growth of *Enterococcus faecalis* bacteria.

Keywords: Bacterial growth, *E. faecalis*, ethanol extract of propolis (*Apis trigona*)

INTISARI

Latar belakang: *E. faecalis* adalah bakteri yang paling banyak menyebabkan kegagalan pengobatan endodontik bila terjadi infeksi rekuren. Selain obat kimia, senyawa yang bisa digunakan sebagai pengobatan alternatif adalah menggunakan obat herbal yang memiliki efek antibakteri. Salah satunya adalah propolis lebah *Apis trigona* yang mengandung flavonoid. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat ekstrak etanol propolis lebah *Apis Trigona* terhadap penghambatan laju pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. **Metode:** Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Metode yang digunakan adalah dilusi cair pada media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang dilanjutkan dengan pengukuran kekeruhan dengan *Spectrophotometer UV-vis*. Ekstrak etanol propolis lebah *Apis trigona* yang diujikan pada bakteri *E. faecalis* terdiri dari berbagai konsentrasi : 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78% 0,39 % dan 0,18 % berdasarkan berat/volume (w/v). **Hasil:** Semua konsentrasi yang diujikan dapat menghambat laju pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. Konsentrasi yang paling efektif dalam menghambat laju pertumbuhan bakteri adalah 0.08% ($p < 0.05$). **Kesimpulan:** Ekstrak etanol propolis lebah *Apis trigona* secara efektif dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*.

Kata kunci : Laju pertumbuhan bakteri, *E. faecalis*, ekstrak etanol propolis (*Apis trigona*)

Pendahuluan

Rongga mulut merupakan habitat bagi berbagai jenis mikroflora normal. Beberapa dari mikroflora normal tersebut dapat bersifat patogen dan menjadi penyebab penyakit dalam rongga mulut. Mikroflora yang bersifat patogen dapat menyebabkan karies pada jaringan keras gigi dan periodontitis pada jaringan lunak rongga mulut¹. Bakteri patogen penyebab karies tersebut dapat menginvasi dentin dan pulpa yang mengakibatkan peradangan pada pulpa. Peradangan atau inflamasi pada pulpa merupakan respon jaringan tubuh terhadap agen asing yang apabila terjadi secara terus-menerus akan menyebabkan inflamasi akut hingga kematian atau nekrosis pulpa⁷.

Perawatan Saluran Akar (PSA) merupakan salah satu upaya perawatan untuk mempertahankan gigi yang mengalami infeksi pulpa. Keberhasilan dalam PSA dipengaruhi oleh beberapa faktor yang saling berhubungan⁴. Tujuan dari PSA adalah untuk mengeliminasi bakteri beserta produk-produknya dan mencegah timbulnya infeksi berulang³.

Enterococcus faecalis adalah bakteri yang paling sering terlibat dalam infeksi endodontik persisten dengan prevalensi 24% sampai 77%. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri gram positif fakultatif anaerob yang terdiri dari rantai pendek atau tunggal berpasangan⁵. Bakteri ini dapat bertahan hidup dalam lingkungan yang memiliki kadar garam tinggi, suhu ekstrim, dan pH basa, serta mampu bersaing dengan bakteri lain⁸. Beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa *Enterococcus faecalis* resisten terhadap beberapa antibiotik seperti *vancomycin*, *tetracycline* (53,2%), *erythromycin* (80,8%), *clindamycin* 2 µg/mL (100%), dan *metronidazole* 4 µg/mL (100%)^{6&9}.

Ekstrak Etanol Propolis (EEP) dapat digunakan sebagai agen antibakteri karena memiliki senyawa yang bersifat sebagai antibakteri yaitu flavonoid. *Apigenin*, *acacatin*, *galangin*, *kaempferol*, *quercetin*, *pinocembrin*, *chrysin*, *fisetin*, dan CAPE (*caffeic acid phenethyl ester*) adalah senyawa-senyawa turunan/ derivat flavonoid yang paling sering ditemukan dalam propolis¹⁴. Flavonon pinocembrin, flavonol galangin dan CAPE (*caffeic acid phenethyl ester*) dalam EEP bekerja sebagai antibakteri dengan cara menghambat aktivitas RNA *polymerase* bakteri. Efek antibakteri dalam EEP tersebut juga dapat dijadikan sebagai agen antibakteri untuk bakteri *Enterococcus faecalis*¹².

Penelitian ini mengujikan propolis *Apis Trigona* yang di ambil dari peternakan di daerah Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta. Tujuan dari peneliti ini adalah untuk mengetahui daya hambat ekstrak etanol propolis lebah *Apis trigona* terhadap penghambatan laju pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. Manfaat hasil penelitian ini dapat menjadi acuan sebagai upaya penggunaan propolis sebagai medikamen antibakteri alternatif.

Metode

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen laboratorium secara *in vitro* tentang daya hambat ekstrak propolis (*Apis trigona*) terhadap laju pertumbuhan bakteri *E. faecalis* secara *in vitro*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Juli 2017.

Bakteri *E. faecalis* diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Kota Yogyakarta. Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil beberapa koloni

bakteri dengan menggunakan ose lalu dimasukkan ke dalam 25 ml media *Brain Heart Infusion* (BHI) lalu diinkubasikan selama 2-4 jam pada suhu 37°C.

Dalam penelitian ini percobaan dilakukan dengan *triplicate design* sehingga terdapat 24 tabung reaksi yang digunakan dalam percobaan ini. Setiap tabung reaksi diisi dengan media BHI sebanyak 4.8 ml. Selanjutnya menambahkan tiap-tiap konsentrasi pada masing-masing 3 tabung. Konsentrasi diperoleh berdasarkan perbandingan berat dan volume (w/v). Ke dalam 15 tabung pertamadimasukkan konsentrasi 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05% dengan prinsip *triplicate design*. Pada 6 tabung berikutnya dimasukkan kontrol positif berupa antibiotik dan kontrol negatif berupa aquades steril. Pada 3 tabung terakhir tidak diberikan perlakuan (*untreated*). Setelah ke-24 tabung siap, ditambahkan 200µl bakteri yang diambil dari suspensi sebelumnya lalu mulai diukur dengan Spectrofotometer untuk mendapatkan Optical Density (OD) yang dalam hal ini menggambarkan kekeruhan. Sebelum dilakukan pengukuran, tabung diaduk dengan vortex agar larutan homogen. Setelah semua tabung reaksi diukur, data yang diperoleh dicatat sebagai t0. Selanjutnya tabung tersebut kembali dimasukkan ke dalam inkubator selama 4 jam dan dilakukan pengukuran kedua yang dicatat sebagai t2, pengambilan data dilakukan sampai interval waktu ke-5 (t4).

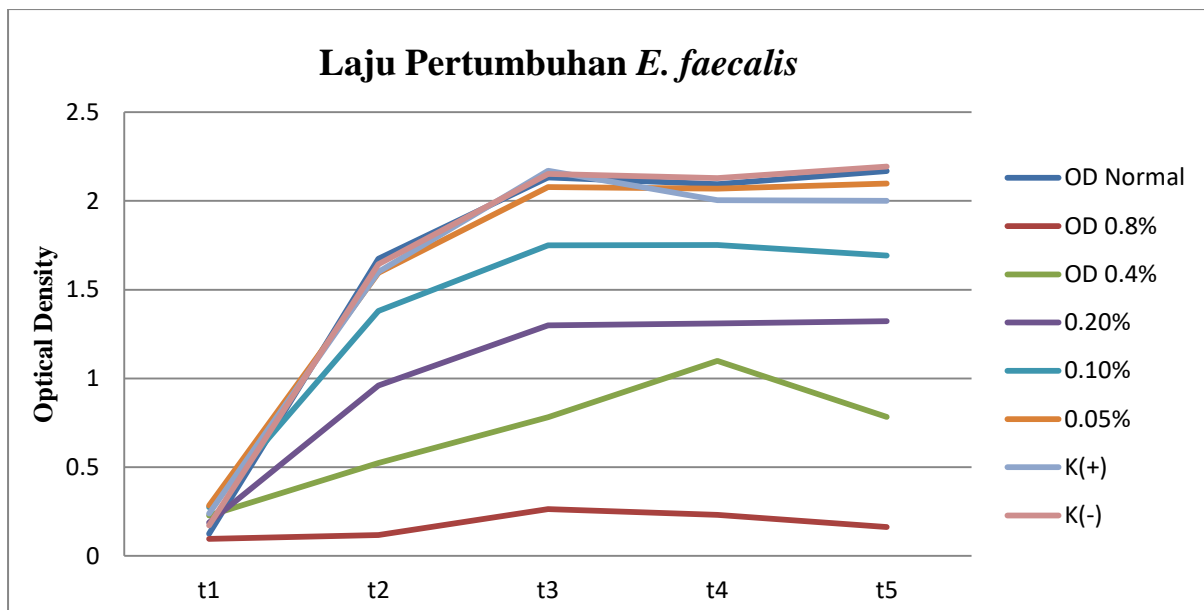
Data yang diperoleh selanjutnya akan dibandingkan dalam bentuk tabel dan kurva. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) kemudian dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-wilk* dikarenakan jumlah sample kurang dari 50 sample, uji hipotesis dengan data berdistribusi tidak normal maka uji hipotesis menggunakan *Kruskall-Wallis*.

Hasil

Penelitian ini menggunakan metode dilusi cair dan pengukuran dengan spektrofotometer uv-vis. Metode tersebut digunakan untuk mengetahui konsentrasi yang dapat menghambat laju pertumbuhan bakteri dilusi. Hasil penelitian dapat dilihat pada tabel dan kurva berikut.

Tabel 1. Hasil Pengukuran *Optical Density* (OD) pertumbuhan *E. faecalis*.

Interval Waktu	OD Kelompok Perlakuan							
	Normal	0.8%	0.4%	0.2%	0.1%	0.05%	K(+)	K(-)
t1	0.1243	0.0960	0.2285	0.1888	0.2754	0.2843	0.2378	0.1720
t2	1.6736	0.1180	0.5236	0.9598	1.3806	1.5952	1.6006	1.6442
t3	2.1329	0.2638	0.7819	1.2982	1.7498	2.0781	2.1692	2.1514
t4	2.0946	0.2314	1.0985	1.3105	1.7520	2.0698	2.0081	2.1281
t5	2.1688	0.1620	0.7840	1.3229	1.6913	2.0972	2.0599	2.1928



Gambar 1. Kurva laju pertumbuhan bakteri *E. faecalis* selama 54 jam

Berdasarkan tabel dan gambar 1 di atas dapat disimpulkan bahwa konsentrasi ekstrak etanol propolis (*Apis trigona*) yang paling menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* adalah konsentrasi 0.08%.

Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, semua konsentrasi ekstrak etanol propolis (EEP) yang diujikan yaitu 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1%, dan 0.05% dapat menghambat laju pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* jika dibandingkan dengan pertumbuhan bakteri pada kelompok tanpa perlakuan (*untreated*). Sehingga penelitian ini sesuai dengan penelitian yang efektif mengujikan 3 konsentrasi ekstrak propolis yaitu 2.5%, 5%, dan 10% terhadap bakteri *Streptococcus mutans*². Hasil pengukuran pada kelompok kontrol negatif dengan menggunakan aquades steril, menunjukkan adanya peningkatan nilai *Optical Density* (OD) yang serupa dengan kelompok *untreated*. Hal ini disebabkan karena aquades steril bersifat netral dan tidak memiliki sifat antibakteri. Kelompok kontrol positif tidak efektif dalam menghambat laju pertumbuhan bakteri. Hal ini berbeda dengan penelitian sebelumnya oleh Sandoe dkk., yang efektif mengujikan 4gr/l sebagai konsentrasi minimal yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. Faecalis*¹⁰. Variasi metode dan prosedur penelitian yang berbeda dengan penelitian sebelumnya dapat menyebabkan perbedaan efektifitas kontrol positif. Selain itu, *Enterococci* berpotensi untuk menyimpan dan mentransfer gen resistensi⁶.

Konsentrasi 0.8% merupakan konsentrasi yang paling efektif menghambat laju pertumbuhan bakteri dalam penelitian ini. Sedangkan konsentrasi 0.05% merupakan konsentrasi yang memiliki efektifitas paling rendah. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa terhambatnya bakteri dipengaruhi oleh kadar konsentrasi. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka laju pertumbuhan bakteri akan semakin terhambat.

Aktivitas antibakteri pada propolis sangat kompleks. Hal tersebut diduga karena adanya sinergi antara flavonoid, asam hidroksil, dan *sesquiterpenes*¹¹. Bakteri gram positif sangat sensitif terhadap EEP bahkan pada konsentrasi terendah. Hal ini terjadi karena adanya penghambatan sintesis dinding sel pada bakteri. Gambaran sel pada mikroskopis elektron

menunjukkan bahwa sel yang diobati dengan propolis memiliki dinding sel yang rusak dan gagal terpisah setelah melakukan pembelahan sel dan membentuk struktur *pseudo-multicellular*. Percobaan menggunakan salah satu antibiotik menunjukkan bahwa pembentukan struktur *pseudo-multiselular* tersebut bisa disebabkan oleh penyumbatan sistem pemisah dinding silang¹³.

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Semua konsentrasi EEP yang diujikan dalam penelitian ini dapat menghambat laju pertumbuhan bakteri.\
2. Daya hambat ekstrak etanol propolis (EEP) lebah *Apis trigona* terhadap laju pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi yang diberikan.

Saran

1. Diperlukan uji dengan ekstrak etanol propolis (EEP) dengan konsentrasi etanol yang berbeda.
2. Diperlukan uji lebih lanjut untuk mengetahui fraksi flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol propolis (EEP) lebah *Apis trigona*.
3. Penyiapan kontrol positif antibiotik ampicillin disesuaikan dengan protokol yang dilakukan pada penelitian Andrews¹

Daftar Pustaka

1. Aas, J. A, Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E., 2005. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5721–5732.
2. Asdar, Hasanuddin, As'ad, S., Oktawati, S., Djide, N., Sartini, & Khadijah., 2015. Antibacterial activity test of South Sulawesi Propolis extract against Streptococcus mutans. *Scholars Journal of Dental Sciences*, 2, 195–198.
3. Bodrumlu, E., & Alaçam, T., 2006. Evaluation of antimicrobial and antifungal effects of iodoform-integrating gutta-percha. *Journal of the Canadian Dental Association*, 72(8), 733–733d.
4. Guimaraes, N.L.S.L., Otoch, H.M., Andrade, L.C., Ferreira, C.M., Rocha, M.M.N.P., & Gomes, F.A., 2011. Microbiological evaluation of infected root canals and their correlation with pain. Original Research Article, 9(1), 31-37.
5. Hedge, V., 2009. Enterococcus faecalis; clinical significance and treatment considerations: original research. *Endodontology*, 48–54.
6. Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B., 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), 421–433.
7. Love, R. M., & Jenkinson, H. F., 2002. Invasion of Dentinal Tubules by Oral Bacteria. *Critical Review Oral Bology Medicine*, 13(2), 171–183.
8. Peciuliene, V., Maneliene, R., Balcikonyte, E., Drukteinis, S., & Rutkunas, V., 2008. Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 10(1), 4–9.
9. Rams, T. E., Feik, D., Mortensen, J. E., Degener, J. E., & van Winkelhoff, A. J. (2013). Antibiotic Susceptibility of Periodontal Enterococcus faecalis. *Journal of*

Periodontology, 84(7), 1026–1033.

10. Sandoe, J. A. T., Wylome, J., West, A. P., Heritage, J., & Wilcox, M. H., 2006. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *Journal of Antimicrobial Therapy* 57(2), 767–770.
11. Saroglou, V., Karioti, A., Demetzos, C., Dimas, K., & Skaltsa, H., 2005. Sesquiterpene lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, 68(9), 1404–1407.
12. Takaisi-Kikuni, N. B., & Schilcher, H., 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica*, 60(3), 222–227.
13. Tukmechi, A., Ownagh, A., & Mohebbat, A., 2010. In vitro antibacterial activities of ethanol extract of Iranian propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* & *Streptococcus iniae*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 1086–1092.
14. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., & Perez-Alvarez, J. A., 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73(9), 117–124.