

Data pada naskah ini merupakan bagi dari
tema peneliti yang sudah di publikasikan
pada jurnal internasional, mohon untuk tidak di
revisi
lebih
dahulu
TTD

**EFFECT OF PROPOLIS ETHANOL EXTRACT (*Apis Trigona*) DIFFERENT
CONCENTRATION TO PROTEOLITICAL ACTIVITY BACTERIA *Enterococcus
faecalis* (in vitro)**

Nurul Fitri Fika Septianti¹, Arya Adiningrat²

¹ Dentistry Student, Faculty of Medicine and Health Science UMY

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

ABSTRACT

Background : *Enterococcus faecalis* is a pathogenic bacteria that is often encountered in endodontic treatment failure. The bacteria play a role in the inflammation that occurs due to extracellular enzymes in their proteolytic activity. To prevent the possibility of endodontic treatment failure. Some microbial agent such as irrigation and antibiotics can be given. In addition to these two options, propolis is an attractive options because of its beneficial biological and medical effects. Propolis has the potential to inhibit the activity of proteolytic bacteria when used as a natural medical agent. **Purpose :** This study to determine the effect of propolis extract (*Apis Trigona*) various concentrations on proteolytic activity of bacteria *Enterococcus faecalis* . **Methods :** The type of research conducted was laboratory experimental in vitro. The extract of *Apis Trigona*'s propolis was tested on *Enterococcus faecalis* bacteria consisting of various concentrations: 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,4%; and 0,8% by weight/volume (w/v). the method used was liquid dilution on Brain Heart Infusion media which was then measured turbidity with Spectrophotometer UV-mini and continued with gelatin hydrolysis test. **Result :** All tested concentrations may inhibit the proteolytic activity of bacteria *Enterococcus faecalis* . The most effective concentration in inhibiting the proteolytic activity bacteria is 0,4%. **Conclusion :** The extract of *Apis Trigona* ethanol propolis effectively inhibits the proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* bacteria.

Keywords : Extracts of ethanol propolis (*Apis Trigona*), proteolytic activity, *Enterococcus faecalis*

INTISARI

Latar belakang : *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri patogen yang sering dijumpai pada kegagalan perawatan endodontik. Bakteri tersebut berperan dalam peradangan yang terjadi akibat enzim ekstraseluler pada aktivitas proteolitiknya. Untuk mencegah kemungkinan terjadinya kegagalan perawatan endodontik, beberapa agen mikroba seperti bahan irigasi dan antibiotik dapat diberikan. Selain dua pilihan tersebut, propolis merupakan pilihan yang menarik karena efek biologis dan medisnya yang menguntungkan. Propolis memiliki potensi menghambat aktivitas proteolitik bakteri apabila digunakan sebagai agen

penghambatan senyawa polifenolik terhadap enzim tergantung pada berat molekul, derajat hidroksilasi, jumlah dan posisi substitusi, derajat polimerisasi dan glikosilasinya⁹.

Penelitian ini mengujikan propolis *Apis Trigona* yang di ambil dari peternakan di daerah Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta. Tujuan dari peneliti ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak propolis (*Apis Trigona*) berbagai konsentrasi terhadap aktivitas proteolitik bakteri *Enterococcus faecalis* . Manfaat hasil penelitian ini dapat menjadi acuan sebagai upaya penggunaan propolis sebagai medikamen intrakanal alternatif.

Metode

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen laboratorium secara *in vitro* tentang daya hambat ekstrak propolis (*Apis Trigona*) terhadap aktivitas proteolitik bakteri *Enterococcus 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 September-November 2017.

Bakteri *Enterococcus 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 24 jam pada suhu 37⁰C.

Dalam penelitian ini langkah pertama yaitu pretreatment menggunakan 16 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 2 tabung. Konsentrasi diperoleh berdasarkan perbandingan berat dan volume (w/v). Ke dalam 10 tabung pertama dimasukkan konsentrasi 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%. Pada 4 tabung berikutnya dimasukkan kontrol positif berupa antibiotik dan kontrol negatif berupa aquades steril. Pada 2 tabung terakhir tidak diberikan perlakuan (*untreated*). Setelah ke-16 tabung siap, ditambahkan 200 µl 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 digunakan sebagai acuan dalam menentukan volume yang akan diinjeksikan kedalam media agar BHI dengan gelatin, yang dilakukan dengan perbandingan nilai OD.

Selanjutnya menyiapkan 8 tabung untuk uji hidrolisa gelatin yang berisi bakteri yang telah diberikan pretreatment EEP dan gelatin. Masing-masing tabung akan diuji dengan 3 kali pengulangan sehingga dibutuhkan sebanyak 24 tabung. Bakteri diinjeksikan kurang lebih dengan kedalaman $\frac{3}{4}$ tabung yang berisi gelatin. Semua tabung dimasukkan ke dalam anaerobic jar dan diinkubasikan pada suhu

35° C. Selanjutnya mengamati kemampuan mikroorganismen mencairkan gelatin dengan memasukan semua tabung ke dalam refrigerator selama 1 jam. Kemudian ukur likuifaksi gelatin menggunakan *sliding caliper*.

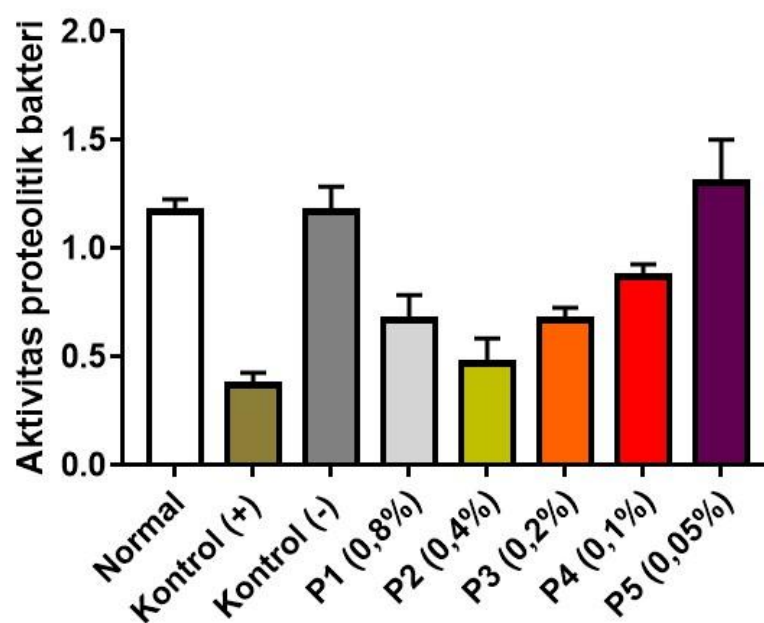
Data yang diperoleh selanjutnya akan dibandingkan dalam bentuk tabel dan kurva. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) kemudian dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-wilk* dikarenakan jumlah sample kurang dari 50 sample, dilanjutkan dengan uji korelasi dengan *Pearson*, uji *Regresi Linier Sederhana* dan uji *ANOVA*.

Hasil

Penelitian ini menggunakan pengujian hidrolisa gelatin. Metode tersebut digunakan untuk mengetahui volume likuifaksi akibat dari penghambatan aktivitas proteolitik bakteri menggunakan ekstrak etanol propolis. Hasil penelitian dapat dilihat pada tabel dan kurva berikut.

Tabel 1. Rata-rata volume gelatin (µL)

Sample	Kelompok Perlakuan							
	N	K (-)	K (+)	0,8 %	0,4 %	0,2 %	0,1 %	0,05 %
S1	843.9	910.4	218.6	551.3	414.1	487.4	624.6	830.3
S2	810.6	778.0	279.7	428.4	297.3	450.1	640.2	816.7
S3	793.0	775.3	291.2	435.8	298.7	489.5	567.6	772.6
Mean	815.8	821.3	263.2	471.8	336.7	475.7	610.8	806.5



Gambar 1. Rerata volume liquifikasi (μL); kelompok normal (0%) 815.8 μL ; control positif (ampicillin) 263.2 μL ; kontrol negatif (aquadest) 821.3 μL ; EEP 0,8% (P1) 471.8 μL ; EEP 0,4% (P2) 336.7 μL ; EEP 0,2% (P3) 475.5 μL ; EEP 0,1% (P4) 610.8 μL ; EEP 0,05% (P5) 806.5 μL .

Berdasarkan tabel dan gambar 1 di atas dapat disimpulkan bahwa konsentrasi ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) yang paling menghambat aktivitas proteolitik bakteri *Enterococcus faecalis* adalah konsentrasi 0.4 %.

Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) dengan konsentrasi 0,1%, 0,2%, 0,4%, dan 0,8% menghambat aktivitas proteolitik bakteri *Enterococcus faecalis* secara bermakna dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan (untreated), akan tetapi konsentrasi 0,05% tidak ada perbedaan apabila dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan. Adanya penurunan volume liquifikasi yang dihasilkan menunjukkan adanya penurunan aktivitas proteolitik bakteri *Enterococcus faecalis* oleh EEP. Hal ini terjadi karena adanya penghambatan interaksi antara substrat-enzim oleh senyawa polifenolik¹⁰.

Aktivitas flavonoid terkait dengan kemampuannya untuk menghambat enzim salah satunya melalui aksi molekuler flavonoid membentuk kompleks dengan protein melalui kekuatan nonspesifik seperti ikatan hydrogen, efek hidrofobik, modifikasi glikosilasi, dan allosteric, serta adanya sifat flavonoid sebagai inhibitor kompetitif^{3,6,9}. Akibat dari adanya inhibitor enzim ini menyebabkan terhambatnya aktivitas proteolitik enzim yang ditandai dengan menurunnya volume liquifikasi gelatin.

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Konsentrasi ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) yang diujikan memiliki pengaruh terhadap penghambatan aktivitas proteolitik bakteri *Enterococcus faecalis* dengan efektivitas tertinggi yaitu pada konsentrasi 0,4%.
2. Konsentrasi ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) 0,05% tidak menunjukkan adanya pengaruh penghambatan terhadap aktivitas proteolitik bakteri *Enterococcus faecalis* .

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan memisahkan senyawa zat aktif dari ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) agar dapat diketahui pengaruh daya hambat aktivitas proteolitik bakteri pada masing-masing senyawa zat aktif dan bagaimana cara kerja senyawa zat aktif tersebut.

Daftar Pustaka

1. Baker, NE, FR Liewehr, TB Buxton, AP Joyce, and Gordon F. "Antibacterial Efficacy of Calcium Hydroxide and Betadine Scrub With and Without Surfactant Against *E. Faecalis* In Vitro." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* , 2004: 98 : 354-364.
2. Charles, H. Stuart, et al. "Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases sit *Enterococcus faecalis* : Its Role in Root Canal Treatment." *JOE* 32 (2006): 93 - 98.
3. Havsteen, Bent H. "The biochemistry and medical significance of the flavonoids." *Pharmacology & Therapeutics* 96, 2002: 67-202.
4. Hollenbeck, B.L., and L.B. Rice. "Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus." *Virulence*, 2012: 3(5): 421-433.
5. Kayaoglu, G., and D. Orstavik. "Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* : Relationship to Endodontic Disease." *International and American Association for Dental Research*, 2004: 15(5): 308-320.
6. Kumar, S., and A. K. Pandey. "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview." *The Scientific World Journal*, 2013: 32-48.
7. Love, R.J., R.A. Burne, M.S. Lantz, and D.J. Jebanc. "Invasion of Dentinal Tubules by Oral Bacteria." *Critical Review Oral Biology Medicine*, 2002: 171-183.
8. Macovei, L, A Ghosh, VC Thomas, LE Hancock, S Mahmood, and L Zurek. "*Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment." *Environ Microbiol*, 2009: 1540-7.
9. Martinez-Gonzalez, Alejandra I., Ángel G. Díaz-Sánchez, Laura A. de la Rosa, Claudia L. Vargas-Requena, Ismael Bustos-Jaimes, and Emilio Alvarez-Parrilla. "Polyphenolic Compounds and Digestive Enzymes: In Vitro Non-Covalent Interactions." *Molecules*, 2017: 1-24.
10. Quesada, Cristina, Begona Bartolome, Ofelia Nieto, Carmen Gomez Cordoves, Teresa Hernadez, and Isabel Estrella. "Phenolic Inhibitors of Amylase and Trypsin Enzymes by Extracts From Pear, Lentils, and Cocoa." *Journal of Food Protection*, 1996: 59 : 185-192.
11. Walton, RE, and M. Torabinejad. "Principles and Practices of Endodontic." *WB Saunders*, 2002: 206-38.