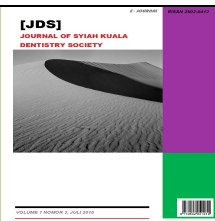




[JDS]
**JOURNAL OF SYIAH KUALA
DENTISTRY SOCIETY**

Journal Homepage : <http://jurnal.unsyiah.ac.id/JDS/>
E-ISSN : 2502-0412



**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK PROPOLIS ALAMI DARI SARANG
LEBAH TERHADAP PERTUMBUHAN *Enterococcus faecalis***

Zaki Mubarak^{1*}, Santi Chismirina¹, Hafizah Humairah Daulay²

¹ Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Syiah Kuala

² Mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Syiah Kuala

Abstract

The major cause of endodontic failure is the survival of microorganisms in the root filled teeth. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) is primary bacterium in patients with post treatment endodontic infection because Ca(OH)₂ as a medicament unable to eliminate this bacteria. Propolis, sometimes called bee glue, is a natural resinous substance collected by honey bee from plants. Propolis contains many flavonoids and other compounds like tannin, steroid, and essential oil that have antibacterial properties. This study was aimed to clarify the antibacterial activity of propolis extracts against *E. faecalis*. In this laboratory experimental study, natural propolis from bee hives was extracted by maceration method and 96% ethanol solvent. Propolis that had been phytochemicals test, was tested using *Standard Plate Count (SPC)* method to know the antibacterial activity it has. Results showed a decrease colony of *E. faecalis* after treated with various concentrations of propolis extract. The highest quantity of colonies was founded in concentration 20% is 74.7 x 10⁶ CFU / mL and the least quantity of colonies at a concentration 100% is 7.3 x 10⁶ CFU / mL. Conclusion of this study is natural propolis extract from the bee hives showed antibacterial activity against of *E. faecalis*.

Keyword: Endodontic treatment, *Enterococcus faecalis*, propolis, bee hives

PENDAHULUAN

Perawatan endodontik pada dasarnya bertujuan untuk mengeliminasi bakteri semaksimal mungkin dari saluran akar. Hal ini dapat dilakukan melalui proses pembersihan saluran akar secara kemomekanis yang bertujuan untuk menurunkan jumlah mikroorganisme. Eliminasi mikroorganisme melalui proses tersebut kurang sempurna dikarenakan masih tersisanya mikroorganisme dalam saluran akar.

Keterbatasan tersebut terjadi akibat anatomi ruang pulpa yang rumit, selain itu jauhnya penetrasi bakteri ke dalam tubulus dentin juga menyebabkan perawatan saluran akar dan irigasi tidak dapat membebaskan saluran akar dari bakteri.

Oleh karena itu, untuk mengatasi hal-hal tersebut diperlukan pemberian medikamen saluran akar.^{1,2,3}

Tujuan pemberian medikamen saluran akar adalah untuk memperoleh aktivitas antimikroba di dalam pulpa dan periapiks, menetralkan sisa-sisa debris di saluran akar, serta mengontrol dan mencegah nyeri pasca-perawatan. Medikamen yang biasa digunakan ada beberapa macam, yaitu *phenolic biocides*, *non-phenolic biocides*, formokresol, iodine,

* Corresponding author

Email address : zakimubarak54@yahoo.com

kalsium hidroksida, dan antibiotik.^{4,5}

Medikamen saluran akar yang banyak digunakan saat ini adalah kalsium hidroksida (Ca(OH)₂). Bahan tersebut memiliki efek antimikroba lebih kuat, dapat bertahan lama dan dapat menghambat pertumbuhan kembali dari bakteri.^{5,6}

Kalsium hidroksida ini memiliki kekurangan. Bahan tersebut memiliki kemampuan terbatas untuk mengeliminasi mikroba dari saluran akar dan membutuhkan waktu panjang untuk mencapai aktivitas antimikrobanya.^{5,7}

Penelitian menunjukkan bahwa *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) resisten terhadap Ca(OH)₂ pada pH 11,1 sedangkan dalam dentin radikular, sifat alkalin Ca(OH)₂ hanya mencapai pH 10,3 setelah *dressing* saluran akar.⁷

Enterococcus faecalis adalah bakteri yang paling banyak ditemukan dalam kasus infeksi periradikular dan kegagalan perawatan endodontik dengan bahan medikamen kalsium hidroksida.^{6,8} *Enterococcus faecalis* memiliki kemampuan untuk berinvansi ke dalam tubulus dentin, sehingga medikamen saluran akar sangat sulit untuk mengeliminasinya. Bakteri tersebut juga memiliki kemampuan untuk bertahan di lingkungan asam dan basa di dalam saluran akar. Faktor ini menjadi alasan mengapa mikroorganisme ini sering ditemukan sebagai patogen yang resisten terhadap perawatan endodontik.^{3,8}

Penelitian saat ini banyak berfokus pada bahan herbal medikamen saluran akar yang bekerja cepat dan efektif dalam mengeliminasi *E. faecalis*. Salah satunya pada penelitian Awawdeh dan kawan-kawan (2009), menyatakan bahwa propolis secara signifikan lebih efektif daripada *non-setting calcium hydroxide* dalam melawan *E. faecalis* setelah aplikasi jangka pendek.⁹

Propolis merupakan bahan resin yang dikumpulkan lebah dari berbagai jenis tumbuhan dan digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri di dalam sarang lebah.¹⁰ Propolis mengandung senyawa yang meliputi resin dan balsam (50-70%), minyak essential dan lilin (30-50%), *pollen* (5-10%), senyawa

organik, dan mineral. Resin di dalam propolis banyak mengandung flavonoid.⁹ Flavonoid ini mempunyai sifat sebagai antibakteri, antifungal, antivirus, antioksidan, dan antiinflamasi. Propolis diketahui sangat efektif melawan bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri Gram negatif *Salmonella*. Penelitian Kujumgiev dan kawan-kawan (1999), menyimpulkan propolis sangat efektif melawan *Escherichia coli* dan *Candida albicans* (*cit. Parolia et al, 2010*).¹¹ Dalam penelitian Koru dan kawan-kawan (2007), menemukan bahwa propolis juga sangat efektif melawan bakteri anaerob seperti *Fusobacterium nucleatum* (*cit. Parolia et al, 2010*).¹¹

BAHAN DAN METODE

Sebelum dilakukan uji daya hambat, terlebih dahulu dilakukan sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan. Seluruh alat yang terbuat dari kaca dan tahan panas, seperti gelas ukur, jarum ose, batang L, cawan petri, tabung reaksi, dan labu Erlenmeyer dicuci bersih, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas tahan panas. Lalu alat-alat ini disterilisasi di dalam sterilisator (*Hot air oven*) sampai suhu mencapai 160°C. Bahan yang akan digunakan seperti media MHA, TSB, dan akuades disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat yang lainnya disterilisasikan dengan alkohol 70% dan api spiritus.¹²

Propolis yang digunakan pada penelitian didapatkan dari peternakan lebah Jambi dengan jenis lebah yaitu *Apis dorsata*. Adapun teknik pembuatan ekstrak etanol propolis adalah dengan teknik maserasi. Perbandingan propolis dan etanol adalah 1:10. Propolis direndam dengan larutan etanol 96%, lalu didiamkan di dalam gelas kaca kedap udara selama 5 hari pada suhu 37°C, selanjutnya dilakukan penyaringan dengan kertas saring untuk memisahkan filtrat dari ampas. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan kecepatan 180 rpm pada suhu 70°C hingga kandungan

etanolnya menguap sehingga diperoleh ekstrak etanol propolis dengan konsistensi yang kental. Lalu dilakukan uji fitokimia¹³

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan mengambil 1 mL larutan ekstrak propolis lalu ditambahkan 1 – 2 tetes FeCl₃. Warna biru tua atau hitam kehijauan yang terbentuk menunjukkan adanya tanin.¹⁴

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan mengambil 2 ml ekstrak propolis lalu ditambahkan 1 mL HCl dan 0,5 g serbuk Mg. Larutan dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning, atau jingga.¹⁵ Uji steroid dilakukan dengan menambahkan ekstrak propolis dengan dietil eter. Lapisan eter ditambahkan dengan pereaksi *Liebermen-Burchard*. Warna kehijauan menunjukkan adanya steroid.¹⁴ Uji senyawa minyak atsiri dilakukan dengan menguapkan propolis yang telah direndam etanol sampai kering. Jika residu yang diperoleh berbau enak, menunjukkan ekstrak positif mengandung minyak atsiri.¹⁶ Ekstrak propolis diencerkan menjadi berbagai konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80%. Konsentrasi 100% tidak dilakukan pengenceran. Bahan pengencer yang digunakan adalah akuades. *Chlorhexidine* 2% digunakan sebagai variabel kontrol positif dan akuades steril sebagai kontrol negatif, sehingga jumlahnya menjadi 7 variabel. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$\% = \frac{W \times 100}{V}$$

Keterangan :

% = Persentase ekstrak yang dibutuhkan

W = Berat (g)

V= Volume pelarut yang diinginkan (mL)

Konsentrasi ekstrak 20% :

$$20\% = \frac{g \times 100}{20mL}$$

$$\frac{20}{100} = \frac{g \times 100}{20mL}$$

$$\frac{0,8}{20} = \frac{g}{mL}$$

Berdasarkan rumus di atas untuk mendapat konsentrasi 20%, diambil 0,8 g ekstrak propolis dan ditambahkan 20 mL akuades karena volume yang diinginkan adalah 20 mL. Demikian seterusnya sehingga didapat konsentrasi yang akan digunakan yaitu 40%, 60% dan 80%.

Kultur dilakukan dengan teknik goresan T (*streak T*). Kultur *Enterococcus faecalis* dilakukan pada media *CHROMagar VRE*.²⁸ Cawan petri dibagi menjadi 3 bagian menggunakan spidol. Cara mengkultur adalah dengan memanaskan jarum ose dan ditunggu dingin, kemudian 1 ose biakan murni diambil untuk diinokulasi di daerah 1 dengan goresan zig-zag. Setelah itu dilanjutkan goresan zig-zag di daerah 2, tegak lurus dengan goresan pertama, kemudian dilanjutkan ke daerah 3, tegak lurus daerah 2. Cawan petri yang telah digoreskan bakteri kemudian ditutup rapat dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.^{12,17}

Tahap selanjutnya adalah pewarnaan Gram untuk menentukan bakteri yang tumbuh yaitu *Enterococcus faecalis*. Cara pewarnaan Gram adalah dengan membuat preparat ulas (*smear*) yang telah difiksasi oleh *E. faecalis*. Kristal violet sebagai pewarna utama ditetaskan pada seluruh preparat agar terwarnai seluruhnya, lalu ditunggu ±1 menit, lalu dicuci dengan akuades mengalir. Selanjutnya Mordant (*lugol's iodine*) ditetaskan, lalu ditunggu ±1 menit, dicuci dengan akuades yang mengalir, lalu diberi larutan etanol 96% setetes demi setetes hingga etanol yang jatuh berwarna jernih, lalu dicuci dengan akuades mengalir.

Counterstain (safranin) ditetaskan ke preparat, lalu ditunggu selama ±45 detik, dan dicuci dengan akuades mengalir. Preparat

dikeringkan dengan kertas *tissue* yang ditempelkan di sisi ulasan lalu dibiarkan mengering di udara. Preparat yang kering diamati di bawah mikroskop cahaya untuk mengkonfirmasi warna *Enterococcus faecalis*. Bakteri Gram positif akan tampak berwarna ungu.¹²

Koloni *Enterococcus faecalis* yang sudah tumbuh pada media *CHROM* agar *VRE*, diambil dengan jarum ose sebanyak 1-2 ose dan disuspensikan ke dalam tabung berisi NaCl 0,9% 5 mL. Kekeruhan bakteri dihitung menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm dan nilai absorbansi 0,08-0,1 atau setara dengan larutan *Mc Farland* 0,5 atau $1,5 \times 10^8$ Colony Forming Unit (CFU)/mL.¹²

Siapkan 7 tabung reaksi yang sudah diisi dengan 9 mL NaCl ke dalam setiap tabung. Kemudian dari tabung yang sudah diukur dengan spektrofotometer diambil 1 mL suspensi *E. faecalis* lalu dicampur dengan tabung pengenceran 1 (10^{-1}) dan dihomogenkan. Dari tabung I diambil 1 mL dengan pipet *eppendorf* kemudian dipindahkan ke tabung pengenceran 2 (10^{-2}) lalu dihomogenkan. Dari tabung 2 diambil 1 mL dengan pipet *eppendorf* kemudian dipindahkan ke tabung pengenceran 3 (10^{-3}) lalu dihomogenkan. Dan seterusnya hingga tabung terakhir dari seri pengenceran (seri dilusi).¹²

Setelah itu, ambil 0,1 mL suspensi *E. faecalis* menggunakan pipet *eppendorf* pada tabung pengenceran terakhir (10^{-7}) sampai pengenceran 2 (10^{-2}) dan diteteskan ke cawan petri untuk ditanam di media MHA dengan metode *spread plate* menggunakan batang L. Lalu diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C . Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan cara menghitung koloni *E. faecalis* yang tumbuh pada media dengan *colony counter*. Tabung yang dipilih adalah yang memiliki jumlah koloni 30 -300 koloni bakteri.¹²

Tujuh tabung reaksi disiapkan dan ditandai sesuai konsentrasi yang digunakan. Tabung 1 diisi *chlorhexidine* 2% (kontrol

positif), tabung 2 diisi akuades steril (kontrol negatif), tabung 3 diisi ekstrak konsentrasi 20%, tabung 4 diisi ekstrak konsentrasi 40%, tabung 5 diisi ekstrak konsentrasi 60%, tabung 6 diisi ekstrak konsentrasi 80%, dan tabung 7 diisi ekstrak konsentrasi 100%. Masing-masing tabung tersebut diisi sebanyak 3,5 mL dan ditambah 1 mL TSB (*Tryptic Soy Broth*). Kemudian setiap tabung diisi 0,5 mL suspensi *E. faecalis* yang telah diencerkan dengan metode *serial dilution* lalu dikocok hingga homogen.^{12,18}

Kemudian dari setiap tabung diambil 0,1 mL suspensi dengan menggunakan pipet *eppendorf* dan diteteskan pada media MHA untuk ditanam dengan metode *spread plate*. Kemudian diratakan dengan metode sebar menggunakan batang L dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C . Setelah 48 jam pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh dengan menggunakan *colony counter*.¹²

HASIL

Hasil Ekstraksi Propolis dengan Pelarut Etanol

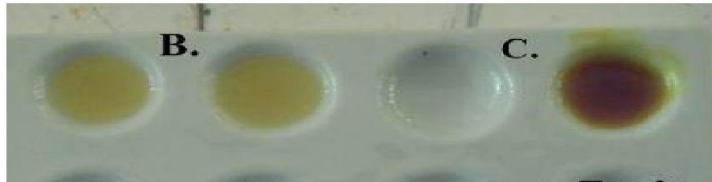
Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah propolis alami dari sarang lebah. Ekstrak propolis didapat dengan proses maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Pada proses tersebut, didapatkan ekstrak propolis kental berwarna kuning sebanyak 42 gram (Gambar 1).



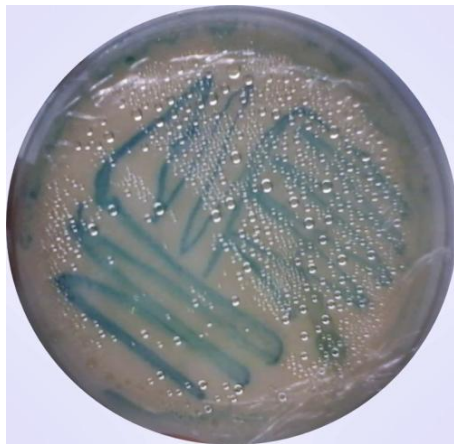
Gambar 1. Ekstrak Propolis

Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Propolis

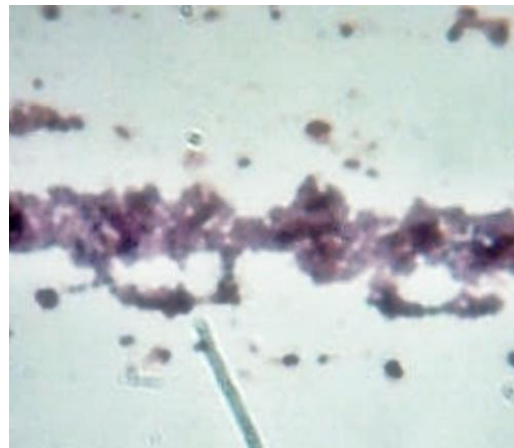
Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak propolis mengandung senyawa flavonoid, steroid, tanin, dan minyak atsiri. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya pembentukan warna keunguan pada endapan larutan setelah penambahan Mg dan HCl pada uji flavonoid, pembentukan warna kehijauan setelah penambahan dietil eter dan pereaksi *Lieberman-Bouchard* pada uji steroid, perubahan warna ekstrak menjadi hijau kehitaman setelah penambahan $FeCl_3$ pada uji tanin, dan adanya bau khas madu pada ekstrak propolis setelah larutan etanol diuapkan pada uji minyak atsiri (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Propolis. (A). Uji Flavonoid, (B). Uji Steroid, (C). Uji Tanin.



Gambar 3. Kultur *E. faecalis* pada Media *CHROM* Agar *VRE*.



Gambar 4. Hasil Pewarnaan Gram *E. faecalis*

Hasil Kultur dan Identifikasi *Enterococcus faecalis*

Hasil kultur *Enterococcus faecalis* yang dilakukan pada media *CHROM* Agar *VRE* setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^{\circ}C$ dalam kondisi anaerob terlihat koloni bakteri berwarna hijau kebiruan seperti pada Gambar 3.

Hasil pewarnaan Gram terhadap *E. faecalis* menunjukkan bahwa koloni bakteri berwarna ungu. Hasil pewarnaan Gram pada *E. faecalis* dapat dilihat pada Gambar 4.

Hasil Suspensi *Enterococcus faecalis*

Proses penghitungan kadar kekeruhan suspensi *E. faecalis* dilakukan dengan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm dan nilai absorbansi 0,08 – 0,1 yang nilainya setara dengan larutan *Mc Farland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Nilai suspensi yang didapat adalah 0,089.

Jumlah Koloni *Enterococcus faecalis* Hasil Pengenceran Bertingkat

Hasil pengenceran bertingkat yang dilakukan pada suspensi *E. faecalis* pada tingkat pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , dapat dilihat pada Tabel 1

Tabel 1. Data Jumlah Koloni *E. faecalis* Hasil Pengenceran Bertingkat

Tingkat Pengenceran	Jumlah Pertumbuhan Koloni (CFU/cawan)
10^{-2}	TBUD
10^{-3}	TBUD
10^{-4}	311
10^{-5}	222
10^{-6}	74
10^{-7}	18

Keterangan : TBUD = Terlalu Banyak Untuk Dihitung

Berdasarkan tabel di atas menunjukkan bahwa pengenceran 10^{-5} dan pengenceran 10^{-6} memenuhi syarat koloni 30-300. Jika terdapat 2 cawan, masing-masing dari pengenceran rendah dan tinggi yang berurutan dengan jumlah koloni 30-300 dan hasil bagi dari jumlah koloni pengenceran tertinggi dan terendah >2 , maka jumlah yang dilaporkan adalah cawan dengan pengenceran terendah. Berdasarkan penjelasan tersebut, pengenceran 10^{-5} yang dapat digunakan untuk uji sampel dengan metode *Standard Plate Count* (SPC).

Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Propolis terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis* dengan Metode *Standard Plate Count* (SPC)

Uji pengaruh ekstrak propolis terhadap pertumbuhan koloni *E. faecalis* pada media MHA pada setiap perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan. Jumlah rata-rata pertumbuhan koloni bakteri *E. faecalis* setelah dibagi dengan tingkat pengencerannya (10^{-5}) yaitu pada konsentrasi 20% adalah $74,7 \times 10^6$ CFU/mL, konsentrasi 40% adalah $59,7 \times 10^6$ CFU/mL, konsentrasi 60% adalah $25,7 \times 10^6$ CFU/mL, konsentrasi 80% adalah $20,3 \times 10^6$ CFU/mL, dan konsentrasi 100% adalah $7,3 \times 10^6$ CFU/mL. Jumlah pertumbuhan koloni *E. faecalis* pada kontrol positif (CHX 2%) adalah 0 CFU/mL, sedangkan pada kontrol negatif (akuades) adalah $176,7 \times 10^6$ CFU/mL. Nilai rata-rata dari hasil perhitungan koloni *E. faecalis* dapat dilihat pada Tabel 2 dan grafik pertumbuhan koloni.

Tabel 2. Jumlah Koloni *E. faecalis* Setelah Diuji dengan Ekstrak Propolis.

Konsentrasi Bahan Uji	Jumlah Koloni (CFU/mL)			Rata-Rata Jumlah Koloni <i>E. faecalis</i> (CFU/mL)
	P1	P2	P3	
Akuades	150×10^6	138×10^6	242×10^6	$176,7 \times 10^6$
20%	78×10^6	56×10^6	90×10^6	$74,7 \times 10^6$
40%	65×10^6	51×10^6	63×10^6	$59,7 \times 10^6$
60%	41×10^6	12×10^6	24×10^6	$25,7 \times 10^6$
80%	33×10^6	10×10^6	18×10^6	$20,3 \times 10^6$
100%	10×10^6	4×10^6	8×10^6	$7,3 \times 10^6$
CHX 2%	0	0	0	0

Uji statistik pada penelitian ini menggunakan *one way ANOVA* dengan syarat penelitian memiliki lebih dari dua kelompok tidak berpasangan, distribusi data normal dan varians data sama. Jumlah kelompok perlakuan pada penelitian ini

adalah tujuh kelompok dan distribusi data pada penelitian ini normal, dengan nilai $p > 0,05$, sedangkan untuk varians data pada penelitian ini tidak sama, dengan nilai $p=0,02$ ($p < 0,05$). Hasil analisis statistik dengan menggunakan *one way* ANOVA terhadap pertumbuhan koloni *E. faecalis* tidak dapat dilakukan karena data tidak memenuhi syarat yaitu varians data tidak sama ($p < 0,05$). Oleh karena itu, digunakan uji non-parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis* sebagai alternatif uji *one way* ANOVA dengan *post hoc* yaitu uji *Mann-Whitney*.

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji *Kruskal-Wallis* diperoleh nilai $p < 0,05$ yaitu $p=0,004$. Hal ini menunjukkan

adanya perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan terhadap pertumbuhan koloni *E. faecalis*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa hipotesis dari penelitian ini dapat diterima yaitu ekstrak propolis alami dari sarang lebah memiliki aktivitas bakteri dalam menghambat pertumbuhan *E. faecalis*. Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa jumlah koloni *E. faecalis* memiliki perbedaan bermakna terhadap kelompok perlakuan antara konsentrasi 20% - CHX 2% ($p=0,037$), konsentrasi 40% - CHX 2% ($p=0,037$), konsentrasi 60% - CHX 2% ($p=0,037$), konsentrasi 80% - CHX 2% ($p=0,037$), konsentrasi 100% - CHX 2% ($p=0,037$), dan akuades - CHX 2% ($p=0,037$) (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil Uji Lanjut *Mann-Whitney* Pengaruh Ekstrak Propolis terhadap Pertumbuhan *E. faecalis*

Kelompok Perlakuan	20%	40%	60%	80%	100%	Akuades	CHX 2%
20%	-	0,275	0,050	0,050	0,050	0,050	0,037*
40%	0,275	-	0,050	0,050	0,050	0,050	0,037*
60%	0,050	0,050	-	0,513	0,050	0,050	0,037*
80%	0,050	0,050	0,513	-	0,077	0,050	0,037*
100%	0,050	0,050	0,050	0,077	-	0,050	0,037*
Akuades	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	-	0,037*
CHX 2%	0,037*	0,037*	0,037*	0,037*	0,037*	0,037*	-

Keterangan : * = $p < 0,05$, terdapat perbedaan bermakna

PEMBAHASAN

Tahap pertama penelitian ini adalah pembuatan ekstrak propolis. Ekstrak propolis yang digunakan dalam penelitian ini dihasilkan melalui proses maserasi. Maserasi adalah metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam propolis di dalam suatu pelarut selama beberapa hari pada suhu kamar. Penyimpanan pada suhu kamar

tersebut dilakukan agar tidak terjadi penguapan senyawa aktif yang terkandung didalamnya.^{19,20,21} Penyimpanan propolis pada suhu tidak lebih dari 25°C juga bertujuan untuk menjaga kestabilan senyawa aktif propolis karena pemanasan dengan suhu tinggi dapat merusak propolis. Oleh karena itu, teknik ekstraksi yang digunakan untuk

mengekstraksi propolis pada penelitian ini adalah teknik maserasi.²²

Pada proses ekstraksi dengan metode maserasi, pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut pada proses ekstraksi karena sifat dari etanol yang semipolar, sementara propolis mengandung senyawa-senyawa aktif dengan nilai kepolaran yang beragam. Pelarut yang memiliki sifat semipolar mampu menarik senyawa-senyawa aktif dari bahan ekstrak baik yang bersifat polar maupun semipolar. Sehingga penggunaan etanol 96% pada ekstraksi propolis mampu menarik senyawa-senyawa aktif lebih banyak. Selain itu, etanol mudah menguap sehingga jumlah etanol yang terbawa dalam ekstrak sangat sedikit. Propolis banyak mengandung flavonoid. Berdasarkan penelitian Pine dan kawan-kawan, kadar flavonoid yang diperoleh secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% tergolong tinggi.^{21,22}

Metode pengujian kandungan propolis pada penelitian ini adalah menggunakan uji fitokimia. Uji fitokimia adalah uji kualitatif untuk mengetahui keberadaan golongan senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak propolis. Hasil uji fitokimia ekstrak propolis dalam penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak propolis mengandung senyawa tanin, flavonoid, steroid, dan minyak atsiri. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya pembentukan warna keunguan pada endapan larutan setelah penambahan Mg dan HCl pada uji flavonoid, pembentukan warna kehijauan setelah penambahan dietil eter dan pereaksi *Lieberman-Bouchard* pada uji steroid, perubahan warna ekstrak menjadi hijau kehitaman setelah penambahan FeCl₃ pada uji tanin, dan adanya bau yang enak pada ekstrak propolis setelah larutan etanol diuapkan pada uji minyak atsiri.^{14,15,16} Hasil ini juga sesuai dengan penelitian Melly (2007) yang menunjukkan hasil uji fitokimia propolis *Trigona* spp mengandung tanin, flavonoid, steroid, terpenoid, minyak atsiri, dan saponin.^{24,22}

Setelah dilakukan uji fitokimia untuk memastikan keberadaan senyawa - senyawa

aktif dalam propolis secara kualitatif, tahap penelitian ini dilanjutkan dengan uji antibakteri propolis terhadap *E. faecalis*. Namun sebelum dilakukan uji antibakteri, terlebih dahulu dilakukan pengkulturan dan pewarnaan Gram pada *E. faecalis*.

Enterococcus faecalis ini merupakan bakteri kokus Gram positif, fakultatif anaerob, dan bakteri yang tidak membentuk spora. *Enterococcus faecalis* berbentuk ovoid dan berdiameter 0,5 – 1 µm.^{25,26,27} Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 10°C dan 40°C, pada pH 9,6, dalam 6,5% NaCl, dan dapat bertahan pada suhu 60°C selama 30 menit.^{29,30} Hasil pengkulturan *E. faecalis* pada media *CHROMagar VRE* menghasilkan koloni *E. faecalis* yang berwarna hijau kebiruan.²⁸ *CHROMagar VRE* memiliki komponen *chromogenic mix* yang mengandung *x-glucoside* sebagai *chromogen*. *Chromogen x-glucoside* ini digunakan untuk mengidentifikasi *E. faecalis*. *Enterococcus faecalis* memiliki enzim β-glukosidase yang dapat memecah *chromogen x-glucoside* yang ada pada media, sehingga menghasilkan pewarnaan biru kehijauan.³¹

Hasil identifikasi dengan pewarnaan Gram pada bakteri *E. faecalis* yang telah dikultur menunjukkan warna keunguan. Morfologi bakteri tersebut berbentuk kokus dan berantai pendek. Warna ungu yang tampak dari hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa *E. faecalis* adalah bakteri Gram positif. Warna ungu ini terbentuk dikarenakan bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel yang tebal dan membran sel selapis yang sedikit mengandung lapisan lemak. Pemberian kristal violet akan mewarnai seluruh permukaan bakteri baik bakteri Gram positif atau Gram negatif. Pemberian *lugol's iodine* akan menghasilkan ikatan kristal violet dengan *iodine* yang akan meningkatkan pengikatan zat warna oleh bakteri. Penetesan etanol 96% akan menyebabkan denaturasi protein pada dinding selnya, sehingga pori-pori jadi mengecil dan kompleks kristal violet-*iodine* yang berwarna ungu dapat dipertahankan. Sedangkan bagi bakteri Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lipid, etanol 96% akan melarutkan

lipid tersebut sehingga pori-pori membesar lalu zat warna mudah terlepas dan bakteri menjadi tidak berwarna. Pemberian safranin yang berwarna merah menjadi pengontras untuk melihat pewarnaan bakteri Gram positif dan menjadi zat pewarna utama bagi bakteri Gram negatif.^{12,26,33,34}

Metode penentuan aktivitas antibakteri ekstrak propolis pada penelitian ini menggunakan metode *serial dilution* terhadap pertumbuhan *E. faecalis*. Metode *serial dilution* atau pengenceran bertingkat adalah proses pengenceran bertahap dari suatu zat dalam larutan. Metode ini lebih teliti dan masih dapat menghitung jumlah koloni dengan pengenceran tinggi.¹²

Metode penghitungan jumlah bakteri dalam penelitian ini menggunakan *Standard Plate Count* (SPC). Metode ini didasarkan pada asumsi bahwa setiap sel mikroorganisme hidup di dalam suspensi akan tumbuh menjadi satu koloni setelah ditumbuhkan dalam media yang sesuai. Koloni yang tumbuh tidak selalu berasal dari satu sel karena mikroorganisme cenderung membentuk kelompok. Atas dasar itu digunakan istilah *Colony Forming Unit* (CFU) per mL. Syarat dari metode ini adalah memilih cawan yang ditumbuhi koloni dengan jumlah 30-300 koloni/cawan. Hal ini dimaksudkan agar hasil perhitungan lebih akurat.¹²

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak propolis alami terhadap *E. faecalis* dengan metode SPC menunjukkan bahwa ekstrak propolis alami dapat menghambat pertumbuhan *E. faecalis* pada setiap konsentrasi. Hal ini dibuktikan dengan menurunnya jumlah koloni *E. faecalis* yang tumbuh di tiap konsentrasi perlakuan jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Hasil perhitungan rata-rata jumlah koloni *E. faecalis* yang tumbuh secara berurutan pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, kontrol negatif, dan kontrol positif yaitu $74,7 \times 10^6$ CFU/mL, $59,7 \times 10^6$ CFU/mL, $25,7 \times 10^6$ CFU/mL, $20,3 \times 10^6$ CFU/mL, $7,3 \times 10^6$ CFU/mL, $176,7 \times 10^6$ CFU/mL, dan 0 CFU/mL.

Berdasarkan hasil penelitian diatas propolis memiliki daya hambat bagi pertumbuhan *E. faecalis*. Hal ini disebabkan

propolis banyak mengandung senyawa-senyawa aktif seperti flavonoid, tanin, steroid, dan minyak atsiri yang memiliki sifat antibakteri. Masing-masing senyawa tersebut memiliki mekanisme dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Flavonoid merupakan senyawa fenol yang bersifat koagulator protein pada bakteri. Protein yang terkoagulasi ini adalah protein yang mengalami denaturasi dan tidak dapat berfungsi dalam sintesis protein yang akhirnya menyebabkan bakteri mati. Tanin memiliki aktivitas antibakteri karena sifat toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel kemudian mengganggu permeabilitas sel bakteri sendiri sehingga sel bakteri tidak mampu melakukan aktivitas hidup, pertumbuhan terhambat, dan mati. Steroid dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme penghambatan sintesis protein dan menyebabkan perubahan komponen penyusun sel bakteri. Minyak atsiri sebagai antibakteri dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga terbentuk tidak sempurna.^{21,22}

Penelitian ini menggunakan dua jenis kontrol sebagai pembanding hasil penelitian, yaitu kontrol negatif adalah akuades dan kontrol positif adalah CHX 2%. Akuades sebagai kontrol negatif tidak memiliki zat antibakteri sama sekali sehingga tidak mempunyai daya hambat dan memiliki pH 7 sehingga *E. faecalis* dapat tumbuh bebas dengan jumlah koloni yang tumbuh lebih banyak dibandingkan jumlah koloni pada kelompok perlakuan. CHX digunakan sebagai kontrol positif karena diketahui memiliki aktivitas antibakteri spektrum luas melawan bakteri aerob dan anaerob juga *Candida albicans*. CHX memiliki aktivitas antibakteri lebih besar dalam melawan bakteri Gram positif dibandingkan bakteri Gram negatif. CHX dalam konsentrasi rendah bersifat bakteristatik dan pada konsentrasi tinggi bersifat bakteriosidal.⁴

Berdasarkan hasil uji statistik *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa jumlah koloni *E. faecalis* memiliki perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan dengan kontrol positif. Hal ini ditunjukkan dengan nilai p

(nilai signifikan) yang sama dari tiap kelompok perlakuan baik 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% terhadap kontrol positif yaitu $p=0,037$. Dari nilai ini dapat ditarik kesimpulan bahwa kelompok perlakuan dari semua konsentrasi memiliki perbedaan bermakna terhadap CHX 2%. Penelitian Ercan *et al.* menunjukkan bahwa gel CHX 2% paling efektif dalam melawan *E. faecalis* di dalam tubulus dentin, diikuticampuran $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dan CHX 2%, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sendiri sangat tidak efektif bahkan setelah 30 hari penggunaan.(*cit. Athanassiadis et al, 2007*).⁴

Berdasarkan hasil statistik *Kruskal-Wallis* dengan nilai $p=0,004$ ($p<0,050$), menunjukkan ekstrak propolis alami memiliki perbedaan bermakna terhadap pertumbuhan *E. faecalis*. Hal ini juga sejalan dengan hipotesis penelitian ini bahwa ekstrak propolis alami dari sarang lebah memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *E. faecalis*. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya hasil positif pada uji fitokimia yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid, tanin, steroid, dan minyak atsiri dalam ekstrak propolis. Pada penelitian Melly (2007) tentang potensi propolis sebagai antibakteri juga menunjukkan bahwa ekstrak propolis memiliki potensi antibakteri dalam melawan bakteri *Enterococcus faecalis*.²² Penelitian Oncag *et al* (2006) juga menunjukkan bahwa propolis efisien melawan *E. faecalis* (*cit. Ahangari et al, 2012*).⁶

KESIMPULAN

Ekstrak propolis alami dari sarang lebah memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. Jumlah koloni terbanyak ditemukan pada konsentrasi 20% yaitu $74,7 \times 10^6$ CFU/mL dan jumlah paling sedikit ditemukan pada konsentrasi 100% yaitu $7,3 \times 10^6$ CFU/mL

DAFTAR PUSTAKA

- Ramani N, M. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine Digluconate and Propolis when Used as an Intracanal Medicament: Ex Vivo Study. *J Inter Oral Health* 2012; 4:17-24.
- Peters LB, van Winkelhoff A-J, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of Instrumentation, Irrigation and Dressing with Calcium Hydroxide on Infection in Pulpless Teeth with Periapical Bone Lesions. *Inter Endod J* 2002; 35:13–21.
- Love RM. Invasion of Dentinal Tubules by Root Canal Bacteria. *Endodontic Topics* 2004; 9:52-65.
- Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The Use of Calcium Hydroxide, Antibiotics and Biocides as Antimicrobial Medicaments in Endodontics. *Aust Dent J* 2007; 52:64-82.
- Walton RE, Torabinejad M. Prinsip dan Praktik Ilmu Periodonsia. Edisi ke-3. Jakarta: EGC; 2008; 258-261.
- Ahangari Z, Eslami G, Ghannad S. In Vitro Antimicrobial Activity of Propolis in Comparison with Calcium Hydroxide Against *Enterococcus Faecalis*. *J Dent Sch* 2012; 30(1):9-17.
- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms Involved in The Resistance of *Enterococcus faecalis* to Calcium Hydroxide. *Inter Endod J* 2002; 35: 221-228.
- Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, et al. Resistance to Acidic and Alkaline Environments in The Endodontic Pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 283–288.
- Awawdeh L, Al-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of Propolis and Calcium Hydroxide as a Short-Term Intracanal Medicament Against *Enterococcus faecalis* : A Laboratory study. *Aust Endod J* 2009; 35:52–58.
- Coutinho A. Honeybee Propolis Extract in Periodontal Treatment: A Clinical and Microbiological Study of Propolis in Periodontal Treatment. *Indian J Dent Res* 2012; 23:294.

11. Parolia A, Thomas MS, Kundabala M, Mohan M. Propolis and Its Potential Uses in Oral Health. *Inter J of Medicine and Medical Sciences* 2010; 2(7):210-215.
12. Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Dasar. Purwokerto: Laboratorium Mikrobiologi Universitas Jendral Sudirman, 2008.
13. Sabir A. Respons Inflamasi pada Pulpa Gigi Tikus Setelah Aplikasi Ekstrak Etanol Propolis (EEP). *Maj Ked Gigi (Dent. J)* 2005; 38(2): 77–83.
14. Kristina NN, Kusumah ED, Lailani PK. Analisis Fitokimia dan Penampilan Polapita Protein Tanaman Pegangan (*Centella asiatica*) Hasil Konservasi *In Vitro*. *Bul. Littro* 2009; 20(1): 11-20.
15. Mustikasari K, Ariyani D. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Biji Kalangkala (*Litsea angulata*). *Sains dan Terapan Kimia* 2010; 4(2): 131-136.
16. Soetjipto H, Kristijanto AI, Asmorowati RS. Toksisitas Ekstrak Kasar Bunga dan Daun Ketepeng Cina (*Senna alata* L. Roxb.) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Biota* 2007; 12(2): 78-82.
17. Kaiwar A, Nadig G, Hegde J, Lekha S. Assessment of Antimicrobial Activity of Endodontic Sealers on *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* Study. *World J Dent* 2012;3(1):26-31.
18. Adnyana IK, Yulinah E, Sigit JI, Fisheri NK, Insanu M. Efek Ekstrak Daun Jambu Biji Daging Buah Putih dan Jambu Biji Daging Buah Merah Sebagai Antidiare. *Acta Pharmaceutica Ind* 2004; 29(1): 19-27.
19. Nurdiansyah, Redha A. Efek Lama Maserasi Bubuk Kopro Terhadap Rendamen, Densitas, dan Bilangan Asam Biodiesel yang Dihasilkan dengan Metode Transesterifikasi *In Situ*. *Jurnal Belian* 2011; 10 (2): 218-224.
20. Melawati. Optimasi Proses Maserasi Panili (*Vanilla planifolia* A) Hasil Modifikasi Proses Kuring. Bogor: Institut Pertanian Bogor. 2006. Skripsi.
21. Pine ATD, Alam G, Attamim F. Standardisasi Mutu Ekstrak Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) dan Uji Efek Antioksidan dengan Metode DPPH. Accessed on <http://pasca.unhas.ac.id/jurnal/files/d1043b1ce802ee8dbcb6f1dbb5626d55.pdf> (20 feb 2012)
22. Lasmayanty M. Potensi Antibakteri Propolis Lebah Madu *Trigona* spp. terhadap Bakteri Kariogenik (*Streptococcus mutans*). Bogor: Institut Pertanian Bogor. 2007. Skripsi.
23. Jaya F, Radiati LE, Al Awwaly KU, Kalsum U. Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis Terhadap Sistem Kekebalan Seluler pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar. *J Tek Pertanian* 2008; 9: 1-9.
24. Suchitra U, Kundabala M. *Enterococcus faecalis*: An Endodontic Pathogen. *J. Endod* 2002; 3:11-3.
25. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. *Enterococcal* Infections & Antimicrobial Resistance. *Indian J Med Res* 2008: 111-121.
26. Anonymous. *Enterococcus faecalis*. Available in <http://www.sciencephoto.com>. Accessed on February 2013.
27. Anonymous. CHROMagar VRE. Accessed on: <http://www.drg-international.com/ifu/CHROMagar%20VRE%20IFU%20USA.pdf>, 22 Oktober 2012.
28. Mathew S, Boopathy. *Enterococcus faecalis* – An Endodontic Challenge. *J Ind Aca Dent Spec* 2010; 1(4):46-48.
29. Athanassiadis B, Abbott PV, George N, Walsh LJ. An *In Vitro* Study of The Antimicrobial Activity of Some Endodontic Medicaments Against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *Australian Dent J* 2010; 55: 150–15.
30. Anonymous. Chromogenic Listeria Differential Supplement. Accessed on: <http://www.tokue.com/ProductPDF/MS086%20MS081%20MS079.pdf>. 25 Februari 2013.

31. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *J Endod* 2006; 32: 93-98.
32. Harley-Prescott. Laboratory Exercise in Microbiology. 5th ed. The McGraw-Hill Companies, 2002. p. 117-120.
33. Juliantina R, Citra DA, Nirmani B, Nurmasitoh T, Bowo ET. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *J Kedokt Kesehatan Ind* 2009; 1(1): 15-30.