

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Propolis terhadap Biofilm Bakteri *Enterococcus faecalis*

(*Determination of Minimum Inhibitory Concentration Propolis Extract to Bacterial Biofilms of Enterococcus faecalis*)

Rizko Wira Artha Megantara¹, Ari Subiyanto², Dian Agustin Wahjuningrum²

¹Mahasiswa Strata-1 Fakultas Kedokteran Gigi Universita Airlangga Surabaya, Indonesia

²Staf Pengajar Departemen Ilmu Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

ABSTRACT

Background. Endodontic root canal treatment is a treatment that can be performed in the dental pulp necrosis. Failure in endodontic root canal treatment can still occur, although it has been done in accordance with procedures. One cause of failure of root canal treatment is bacterial resistance to conservative treatment. Some microorganisms in pulp necrosis were able to form biofilm to enhance pathogen virulence. This happens because the necrotic pulp tissue is an opportunistic environment for development of microorganisms due to organic residues or nutrients, which serve as a substrate or microorganism culture. One of these microorganisms is *Enterococcus faecalis*. Medikamentosa needed to eliminate microorganisms in the root canal pulp necrosis, especially in the form of bacterial biofilms. The problem faced by this time almost all the materials used in dentistry is a chemical and it has side effects, it is necessary for natural ingredients from nature that has antibacterial or antibiofilm. Antibiofilm or antibacterial agent can be found in propolis. Propolis contains *tt-farnesol* and *apegenin* that have mechanisms for inhibiting growth and development of bacterial biofilm. **Purpose.** The aim of this study was to know the antibiofilm effects of propolis extracts by determining its minimum inhibitory concentration to *Enterococcus faecalis* biofilm. **Methods.** This study is an in-vitro experimental research laboratory. Propolis extract used is propolis extracted by maceration method, and dilution into several concentrations using aquadest. Biofilm formation was observed using the microtiter plate method then continued reading of Optical Density (OD) using ELISA reader to determine the minimum inhibitory concentration of propolis extracts to *Enterococcus faecalis* biofilm. **Results.** Minimum concentrations of propolis extract can inhibit the growth and development of *Enterococcus faecalis* biofilm is 5,75%. **Conclusion.** Influence of propolis extract in inhibiting the formation of biofilm produced by *Enterococcus faecalis*, compared with no propolis extract. Propolis extract concentration by 5,75% is Minimum Inhibitory Concentration to *Enterococcus faecalis* biofilm in vitro.

Keywords: Propolis extract, Biofilm, *tt-Farnesol*, *Apegenin*, *Enterococcus faecalis*, Antibiofilm

Korespondensi (*correspondence*): Rizko Wira Artha Megantara, Mahasiswa Strata-1, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: wira.megan@gmail.com

PENDAHULUAN

Nekrosis pulpa adalah matinya sebagian atau seluruh jaringan pulpa, biasanya disebabkan adanya inflamasi atau injuri traumatik. Nekrosis pulpa juga merupakan suatu proses infeksi bakteri. Rencana perawatan yang dapat dilakukan dalam perawatan nekrosis pulpa adalah perawatan saluran akar. Perawatan saluran akar bertujuan mengembalikan keadaan gigi yang sakit agar dapat diterima secara biologik oleh jaringan sekitarnya. Hal ini berarti

bahwa gigi tersebut dapat berfungsi dan tidak ada tanda-tanda patologi yang lain.^{1,2}

Kegagalan perawatan saluran akar masih dapat terjadi walaupun telah dilakukan sesuai dengan prosedur. Kegagalan perawatan saluran akar dapat disebabkan karena daya resisten bakteri terhadap terapi konservatif. Diduga beberapa mikroorganisma pada infeksi endodontik mampu membentuk biofilm sebagai salah satu mekanisme signifikan dalam

menghindari sistem pertahanan *host* dan meningkatkan virulensi patogennya.^{3,4}

Biofilm dapat didefinisikan sebagai populasi mikroba yang mengandung substrat organik atau anorganik, yang dilapisi oleh produk ekstraselular mikroba, yang membentuk matriks intermikrobial. Dalam biofilm, mikroorganisma menunjukkan ketahanan yang lebih tinggi, baik pada agen antimikroba maupun mekanisme pertahanan *host* bila dibandingkan dalam bentuk sel planktonik. Pembentukan biofilm merupakan proses pembentukan yang kompleks yang melibatkan perlekatan dan imobilisasi, interaksi sel ke sel, pembentukan mikrokoloni, pembentukan biofilm konfluen, serta pembentukan struktur tiga dimensi biofilm. Bakteri dalam biofilm memiliki sifat yang berbeda dengan bentuk planktonik. Produksi biofilm diatur oleh sistem quorum sensing pada beberapa bakteri patogen. Quorum sensing merupakan sistem pengaturan ekspresi gen bakteri dalam merespon densitas populasi mikroorganisma yang diperoleh melalui produksi molekul sinyal ekstraseluler atau yang disebut autoinducers.^{3,5}

Pembentukan biofilm di saluran akar mungkin dimulai setelah invasi pertama pada ruang pulpa oleh mikroorganisma planktonik oral. Jaringan pulpa nekrotik menjadi lingkungan yang menguntungkan bagi perkembangbiakan mikroorganisma karena adanya residu organik atau nutrisi, yang berfungsi sebagai media substrat atau kultur mikroorganisma. Dalam penelitian ditemukan beberapa komunitas mikroba biofilm saluran akar salah satunya adalah *E. faecalis*.^{6,7}

E. faecalis adalah mikroorganisma persisten yang meskipun jumlahnya sedikit pada saluran akar nekrosis, tetapi berperan dalam terjadinya lesi periradikuler persisten setelah perawatan saluran akar. *E. faecalis* dapat bertahan dalam kondisi yang tidak mendukung, seperti pada saluran akar yang telah dilakukan instrumentasi dan obturasi dengan hanya sedikit nutrisi yang tersedia. Model pertumbuhannya melalui pembentukan biofilm.⁸

Ada tiga tahap dasar yang pasti dalam perawatan saluran akar yang dikenal sebagai "Triad Endodontik", yang terdiri dari preparasi biomekanik, irigasi dan disinfeksi, serta obturasi. Menghilangkan jaringan pulpa yang tersisa pada dentin serta menghilangkan mikroorganisma yang terdapat pada saluran akar merupakan hal yang dominan selama perawatan saluran akar. Irigasi dan preparasi biomekanikal

tidak dapat mengeliminasi seluruh mikroorganisma dalam saluran akar. Dengan demikian, penggunaan bahan sterilisasi saluran akar dibutuhkan untuk perawatan saluran akar. Masalah yang dihadapi di bidang kedokteran gigi saat ini adalah hampir semua bahan yang dipakai dalam perawatan gigi merupakan bahan kimia dan memiliki efek samping.^{9,10,11}

Penelitian-penelitian di Indonesia saat ini banyak dilakukan untuk mencari bahan-bahan pengganti bahan kimia dengan memakai bahan dasar dari tanaman tradisional ataupun bahan-bahan yang dapat diperoleh dari lingkungan alam yang ada di Indonesia. Indonesia telah dikenal memiliki berbagai jenis lebah lokal. Lebah madu menghasilkan beberapa produk yang memiliki kegunaan baik untuk lebah itu sendiri maupun untuk manusia. Salah satu hasil produknya adalah lem lebah atau *propolis*. Lem lebah atau propolis diketahui memiliki potensi antibakteri yang dapat dimanfaatkan untuk terapi pulpa baik pada gigi sulung maupun permanen.^{11,12}

Propolis merupakan resin lengket yang berasal dari batang pohon atau kulit kayu, dikumpulkan dan diproses dengan sekresi cairan ludah lebah. Setiap jenis lebah memiliki sumber resin tertentu yang ada di daerah masing-masing sehingga komposisi propolis sangat bervariasi. Komponen utama dari propolis adalah flavonoid dan asam fenolat, termasuk *caffeic acid phenylethylester* (CAPE) yang kandungannya mencapai 50% dari seluruh komposisi. Berdasarkan hasil penelitian, di dalam ekstrak dan propolis komersil terkandung senyawa aktif yang sama, yaitu mengandung flavonoid, fenolik, hidrokinon, tanin, minyak atsiri, steroid, saponin, dan gula pereduksi. Dalam ekstrak propolis juga terkandung *tt-farnesol* (terpenoid) dan apigenin.^{13,14,15}

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum ekstrak propolis terhadap biofilm bakteri *E. faecalis*, yang nantinya dapat menjadi bahan pertimbangan penggunaan ekstrak propolis sebagai bahan sterilisasi guna menunjang keberhasilan perawatan saluran akar dengan menghambat pembentukan biofilm bakteri *E. faecalis*.

METODE DAN BAHAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris *in-vitro* dengan rancangan penelitian *posttest only control group design*. Sampel dari penelitian ini yaitu ekstrak

propolis yang diencerkan menjadi berbagai konsentrasi menggunakan pengencer aquadest.

Alat-alat yang digunakan meliputi, oese, brander spiritus, inkubator, anaerobik jar, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *petri dish*, pipet, mikroskop, *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*, ELISA reader. Bahan-bahan yang digunakan meliputi, media *Tryptone Soya Broth* (TSB), stok bakteri *E. faecalis*, larutan *phosphate-buffered saline* (pH 7,3), ekstrak propolis, aquadest steril, kristal violet 0,2 ml 2%, isopropanol.

Ekstrak propolis yang digunakan adalah ekstrak propolis yang didapat dari Balai Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI) Surabaya yang diekstrak dengan metode maserasi (nomor hasil tes laboratorium 03573/KI/VI-2012). Selanjutnya, dilakukan metode penipisan seri untuk mendapatkan berbagai konsentrasi, yaitu 11,45%, 5,75%, 2,86%, 1,43%, 0,715%, 0,38%, 0,19%, dan 0,10%. Bakteri *E. faecalis* yang digunakan didapat dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya a.

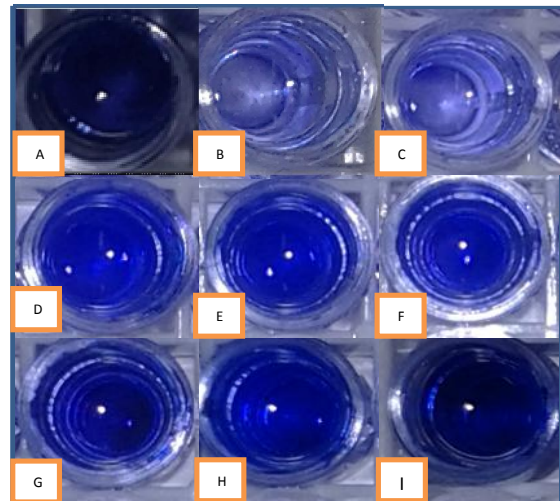
Pembentukan biofilm dan penentuan konsentrasi hambat minimum : Kultur *E. faecalis* pada *trypticase soy broth* (TSB) didilusi sampai 1:100 pada *TSB glu* selama semalam. Kemudian 0,1 ml *E. faecalis* konsentrasi 1×10^6 bakteri/ml diisikan pada *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate* dan 0,2 ml *E. faecalis* diisikan pada *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate* sebagai kontrol positif. Selanjutnya mikrotiter diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, ekstrak propolis diaplikasikan ke dalam masing-masing mikrotiter dengan konsentrasi 11,45%, 5,75%, 2,86%, 1,43%, 0,715%, 0,38%, 0,19%, dan 0,10% dan diinkubasi lagi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian isi dari tiap mikrotiter plate diaspirasi dan dicuci 3 kali dengan 0,2 ml *phosphate-buffered saline* (pH 7,3) dengan menggunakan pipet. Mikroorganisma biofilm yang menempel pada *well* kemudian dicat dengan *crystal violet*. Selanjutnya dilakukan pembilasan dengan menggunakan *aquadest* dan dikeringkan. Untuk menganalisis pembentukan biofilm ditambahkan 0,2 ml isopropanol di setiap *well*. Kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) pada 570 nm menggunakan ELISA Reader.

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif

dari pembacaan pada spektrofotometri yang berupa *Optical Density* (OD) setiap *well-plates* yang diberi perlakuan berbeda, yaitu pemberian ekstrak propolis dengan konsentrasi 11,45%, 5,75%, 2,86%, 1,43%, 0,715%, 0,38%, 0,19%, 0,10%, dan sebagai kontrol positif *well* dengan biofilm tanpa pemberian ekstrak propolis. Selanjutnya data dianalisis menggunakan uji *one-way Anova*.

HASIL

Peneliti melakukan penelitian menggunakan bakteri *E. faecalis* pembentuk biofilm dan selanjutnya diberi konsentrasi ekstrak propolis sebesar 11,45%, 5,75%, 2,86%, 1,43%, 0,715%, 0,38%, 0,19%, 0,10%, dan 0% sebagai kontrol positif yang diberikan perlakuan pada *microtiter plate*. Pengamatan penghambatan pembentukan biofilm menggunakan ELISA reader yang menilai seberapa besar kemampuan ekstrak propolis menghambat biofilm dibaca melalui panjang gelombang 570nm. Dari hasil penelitian tersebut diketahui bahwa ekstrak propolis dapat menghambat pembentukan biofilm.



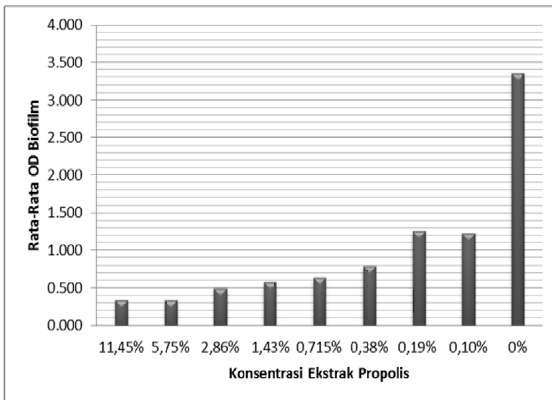
Gambar 1. Hasil Pewarnaan dengan *Crystal Violet* pada Biofilm Bakteri *E. faecalis* dengan Pengaplikasian Berbagai Konsentrasi Ekstrak Propolis

Keterangan :

A. Kontrol; B. Konsentrasi Ekstrak propolis 11,45% ; C. Konsentrasi Ekstrak propolis 5,75% ; D. Konsentrasi Ekstrak propolis 2,86% ; E. Konsentrasi Ekstrak propolis 1,43% ; F. Konsentrasi Ekstrak propolis 0,715% ; G. Konsentrasi Ekstrak propolis 0,38% ; H. Konsentrasi Ekstrak propolis 0,19% ; I. Konsentrasi Ekstrak propolis 0,10%.

Tabel 1. Hasil Pengukuran ELISA reader OD Biofilm Bakteri *E. faecalis*

Konsentrasi Ekstrak	n	Mean OD	Persentase OD
0%	5	3,344	100%
0,10%	5	1,2264	36,67%
0,19%	5	1,2536	37,48%
0,38%	5	0,7802	23,33%
0,715%	5	0,6292	18,81%
1,43%	5	0,5706	17,06%
2,86%	5	0,4898	14,65%
5,75%	5	0,3304	9,88%
11,45%	5	0,3360	10,04%



Gambar 2. Grafik Hasil Pengukuran ELISA Reader OD Biofilm

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak propolis mampu menghambat pembentukan biofilm oleh bakteri *E. faecalis*. Pada penelitian ini, konsentrasi ekstrak mulai dari konsentrasi 0,10% dapat menghambat pertumbuhan biofilm (tabel 1). Dari hasil analisis, diketahui bahwa pada konsentrasi 5,75% ekstrak propolis terdapat biofilm bakteri dengan persentase kurang dari 10%, sehingga konsentrasi 5,75% merupakan konsentrasi hambat minimum ekstrak propolis terhadap biofilm bakteri *E. faecalis*.

PEMBAHASAN

Pembentukan biofilm di saluran akar mungkin dimulai setelah invasi pertama pada ruang pulpa oleh mikroorganisma planktonik oral. Jaringan pulpa nekrotik menjadi lingkungan yang menguntungkan bagi perkembangbiakan mikroorganisma karena adanya residu organik atau nutrisi, yang berfungsi sebagai media substrat atau kultur mikroorganisma.⁶

Penelitian di bidang kesehatan terhadap propolis telah banyak dilakukan, baik secara *in vitro* maupun *invivo*. Fokt *et al* 2010, dalam studinya menunjukkan propolis memiliki beberapa aktivitas biologis dan farmakologis, propolis selain bersifat antibakteri baik terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif, propolis juga bersifat anti inflamasi, anti jamur, antivirus, anti oksidan, anti-protozoa, anti-tumor, hepatoprotektif, anti-ulcer, cardio-protektif, neuroprotektif, radiopro- tektif, imunomodulator, menurunkan kadar tekanan darah dan kolesterol tubuh. Propolis juga meningkatkan regenerasi jaringan, tulang, dan kartilago. Propolis juga dapat menghentikan pembentukan biofilm bakteri.^{16,17,18,19}

tt-Farnesol dan apigenin merupakan kandungan dalam propolis yang berperan dalam menghentikan pembentukan biofilm mikroorganisma. Hal ini sesuai dengan studi Koo *et al.*, 2003 yang menemukan bahwa kandungan propolis, yaitu apigenin (*4',5,7-trihydroxyl-flavone*) dan tt-farnesol (*3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol*), menyebabkan penurunan jumlah polisakarida dalam biofilm mikroorganisma tanpa mengganggu kelangsungan hidup dari bakteri tersebut. Karena apigenin dan tt-farnesol memiliki kemampuan bakteriostatik. Hal ini berarti dapat mengatasi infeksi rongga mulut tanpa membunuh mikroorganisma normal dan tidak menimbulkan resistensi bakteri.¹⁵

Apigenin dan tt-farnesol akan memengaruhi salah satu polisakarida dalam biofilm, yaitu *alkali-soluble* glukan, sehingga akan menghambat pembentukan biofilm. *Alkali-soluble* glukan merupakan glukan ekstraselular yang berfungsi untuk perlekatan pada permukaan sel. *Insoluble* glukan yang disintesis dari sukrosa oleh GTFs (*glucosyltransferases*) juga memainkan peran penting dalam perlekatan dan kolonisasi mikroorganisma. Apigenin dan tt-farnesol memiliki dampak signifikan terhadap perkembangan lebih lanjut dan akumulasi biofilm dengan cara memengaruhi sintesis polisakarida dalam biofilm.¹⁵

Apigenin dan tt-farnesol memiliki mekanisme yang berbeda dalam mengurangi sintesis glukan. Target utama untuk apigenin adalah enzim GTF (*glucosyltransferase*). Penghambatan sintesis glukan oleh tt-farnesol memiliki efek pada membran sel, bukan pada aktifitas enzimatik, karena tt-farnesol adalah inhibitor yang buruk untuk GTFs. Struktur kimia dan sifat lipofilik dari tt-farnesol mendukung untuk merusak membran, yang

disebabkan karena perubahan permeabilitas dan fluiditas dari membran sel. Agen yang mampu menimbulkan kerusakan pada membran sel tidak hanya mengurangi metabolisme bakteri, tetapi juga mempengaruhi sintesis glukon oleh mikroorganisma.¹⁵

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak propolis mampu menghambat pembentukan biofilm oleh bakteri *E. faecalis*. Pada konsentrasi ekstrak mulai dari konsentrasi 0,10% dapat menghambat pertumbuhan biofilm (tabel 1). Dari hasil analisis, diketahui bahwa pada konsentrasi 5,75% ekstrak propolis terdapat biofilm bakteri dengan persentase kurang dari 10% atau pada konsentrasi ini ekstrak propolis mampu menghambat biofilm sebesar 90%, sehingga konsentrasi 5,75% merupakan konsentrasi hambat minimum ekstrak propolis terhadap biofilm bakteri *E. faecalis*. Hal ini disebabkan karena ekstrak propolis mengandung tt-farnesol/terpenoid dan apigenin yang dapat menyebabkan gangguan membran biofilm dan menyebabkan penurunan jumlah polisakarida dalam biofilm yang selanjutnya terjadi pelepasan kandungan seluler biofilm. Hal ini ditandai dengan peningkatan konsentrasi protein dan polisakarida di luar sel.^{15,19}

Dapat disimpulkan, pemberian ekstrak propolis berperan penting dalam penghambatan pembentukan biofilm yang dihasilkan oleh bakteri *E. faecalis*, dibanding tanpa pemberian ekstrak propolis dan konsentrasi hambat minimum ekstrak propolis terhadap biofilm bakteri *E. faecalis in vitro* sebesar 5,75%.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbott P V, Yu C. 2007. A Clinical Classification of The Status of The Pulp And The Root Canal System. Australian Dental Journal Supplement;52:(1 Suppl):S17-S31
- Wintarsih O, Partosoedarmo M, dan Santoso P. 2009. A Comparative Study of Apical Leakage on Irrigation Using and Without EDTA. Vol. 58, No. 2, Mei 2009, hal. 14-19
- Distel J W, Hatton J F, Gillespie M J. 2002. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. Journal of Endodontics, Vol. 28, No. 10, October 2002
- Siqueira J F. 2001. Aetiology of Root Canal Treatment Failure: Why Well-Treated Teeth Can Fail. International Endodontic Journal, 34, 1-10
- Mohamed J A, Huang D B. 2007. Biofilm Formation by Enterococci. Journal of Medical Microbiology, 56, 1581-1588
- Usha H L, Kaiwar A, Deepak M. 2010. Biofilm In Endodontics: New Understanding To An Old Problem. IJCD, December, 1(3)
- Luis E C de P. 2012. Development of a Multispecies Biofilm Community by Four Root Canal Bacteria. JOE, 38(3):318-23.
- Pujar M, Patil C, Kadam A. 2011. Comparison of antimicrobial efficacy of Triphala, (GTP) Green tea polyphenols and 3% of sodium hypochlorite on Enterococcus faecalis biofilms formed on tooth substrate: in vitro. JIOH Volume 3; Issue 2: April 2011. p. 23.
- Shahani M N, Subba Reddy V V. 2011. Comparison of Antimicrobial Substantivity of Root Canal Irrigants in Instrumented Root Canals up to 72 h: An in vitro study. Journal of the Indian Society of Pedodontics & Preventive Dentistry; Jan-Mar 2011, Vol. 29 Issue 1, India: Bharati Vidhyapeeth University, Dental College and Hospital.
- Kustarci A, Altunbas D, Akpinar K E. 2012. Comparative Study of Apically Extruded Debris Using One Manual and Two Rotary Instrumentation Techniques For Endodontic Retreatment. Journal of Dental Sciences 7.
- Abidin T. 2007. Inovasi Perawatan Konservasi Gigi Melalui Teknologi Tissue Engineering. Universitas Sumatera Utara Medan
- Ahuja V and Ahuja A. 2011. Apitherapy - A sweet approach to dental diseases. Part II: Propolis. Journal of Academy of Advanced Dental Research, Vol 2, p. 3, 6
- Riyanti E, Hadidjah D, Iswari A P. 2010. Pemakaian Propolis Sebagai Antibakteri Pada Pasta Gigi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran, h. 3
- Agustrina G. 2011. Potensi Propolis Lebah Madu Apis Mellifera Spp Sebagai Bahan Antibakteri. Departemen Biokimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, h. 1-2, 5-7

15. Koo H, Pearson S K, Scott-Anne K, Abranches J, Cury J A, Rosalen P L, Park Y K, Marquis R E, Bowen W H. 2003. *Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats.* Oral Microbiology Immunology: Vol. 17, p. 339
16. Fokt *et al.* 2010. How does propolis prevent hive protection? The antimicrobial properties of propolis. Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.
17. Abishek *et al.* 2010. Propolis and its potential uses in oral health. Int Jou Med Sci 2(7):210
18. Lotfy M. 2006. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. Asian Pasific Jou of Cancer.
19. Gomes F, Leite B, Teixeira P, Oliveira R. 2011. Strategies to control *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances