

Efek Ekstrak Etanol Propolis terhadap Aktivitas Metabolisme Karbohidrat dan Arginin *Enterococcus faecalis*

The Effect of Ethanolic Extract of Propolis to Carbohydrate and Arginine Metabolic Activity of *Enterococcus faecalis*

Arya Adiningrat¹, Rizqi Alifna Waskita Prabowo², Ridho Kurnia², Erma Sofiani³

¹Departemen Biologi Mulut dan Biomedika Program Studi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

²Mahasiswa Profesi Program Studi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

³Departemen Endodontologi Program Studi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Abstrak: Virulensi yang dimiliki oleh bakteri *Enterococcus faecalis* dapat menyebabkan kegagalan pada perawatan endodontik. Virulensi ini didukung oleh aktivitas metabolisme energi dari sumber karbohidrat dan arginin. Propolis sebagai bahan medikasi herbal yang memiliki daya antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol propolis (EEP) terhadap aktivitas metabolisme karbohidrat dan arginin *Enterococcus faecalis*. Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratoris in vitro. Metode yang digunakan adalah uji metabolisme karbohidrat dan arginin pada media uji yang diawali dengan pretreatment pada sampel bakteri klinis dan ATCC 29212 yang dilanjutkan dengan kuantifikasi warna media menggunakan imageJ dan pengukuran pH media. Bahan yang diujikan adalah EEP dengan konsentrasi 0,00125%, 0,4%, 10%, dan kontrol positif *chlorhexidine digluconate* 2%. Hasil observasi warna pada semua konsentrasi EEP terdapat perubahan warna pada media, sedangkan kontrol positif tidak terdapat perubahan warna media. Perubahan warna menandakan adanya aktivitas metabolisme. Pengukuran data kuantifikasi imageJ menunjukkan bahwa semua konsentrasi EEP memiliki perbedaan yang signifikan dengan kontrol positif ($p < 0.05$). Pada pengukuran pH media uji terdapat perubahan nilai pH pada perlakuan EEP berbagai konsentrasi. Hal tersebut menandakan semua konsentrasi EEP tersebut tidak dapat memberikan efek terhadap penghambatan aktivitas metabolisme karbohidrat dan arginin bakteri *Enterococcus faecalis*.

Kata kunci: Ekstrak Etanol Propolis, *Enterococcus faecalis*, imageJ

Abstract: Virulence that possessed by *Enterococcus faecalis* bacteria caused failure in endodontic treatment. This virulence is supported by energy metabolic activity from carbohydrates and arginine. Propolis as an herbal medicine that has antibacterial properties. This study aims to determine the effect of ethanolic extract of propolis on carbohydrate and arginine metabolic activity of *Enterococcus faecalis*. The design of this study is in vitro experimental laboratory. The method to detect the carbohydrate and arginine metabolism activity test were used in the test media which were preceded by pretreatment in clinical bacterial samples and ATCC 29212, followed by color media quantification using imageJ and media pH measurements. Materials that tested are EEP with concentrations: 0.00125%, 0.4%, 10%, and 2% chlorhexidine digluconate for positive control. The color observation results in all EEP concentrations had color changed in the media, while positive controls had no color changed. It changes indicate the metabolic activity. Data measurement of imageJ quantification showed that all EEP concentrations had a significant difference with positive controls ($p < 0.05$). The measurement of pH test media, there was a change in the pH value of the EEP treatment of various concentrations. It is indicates that EEP cannot effect on the inhibition of carbohydrate and arginine metabolic activity of *Enterococcus faecalis*.

Key words: Ethanolic Extract of Propolis, *Enterococcus faecalis*, imageJ

PENDAHULUAN

Permasalahan yang sering terjadi di kedokteran gigi pada bidang endodontik adalah kegagalan perawatan endodontik. Kegagalan endodontik ini disebabkan oleh faktor mekanis, faktor

kimiawi dan faktor mikroorganisme yang persisten.¹ Bakteri yang sering ditemukan resisten terhadap bahan medikamen saluran akar adalah *Enterococcus faecalis*.² *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri yang terlibat pada infeksi endodontik yang persisten dengan prevalensi 24% sampai 77%.³

Enterococcus faecalis merupakan bakteri gram positif fakultatif anaerob yang terdiri dari rantai pendek atau tunggal berpasangan.⁴ Bakteri ini dapat bertahan pada lingkungan ekstrem pH yang sangat alkalis, konsentrasi garam tinggi, minim sumber nutrisi dan resisten terhadap beberapa jenis antibiotik.^{5,6} *Enterococcus faecalis* mempunyai faktor-faktor virulen seperti *Aggregation substances* (AS), *surface adhesin*, *lytic enzyme*, *lipoteichoic acid* (LTA), *sex pheromones*, *gelatinase*, dan *cytolisin*. Faktor-faktor virulen tersebut berfungsi untuk membentuk kolonisasi pada host, bersaing dengan bakteri lain, resisten terhadap mekanisme pertahanan host dan bersifat patogenik. Sehingga dibutuhkan energi yang cukup dalam meningkatkan aktivitas virulensi dan patogenitas bakteri tersebut untuk menginvasi jaringan.⁷

Enterococcus faecalis membutuhkan sumber energi untuk menunjang aktivitas kehidupannya. Salah sumber energi yang didapatkan berasal dari hasil metabolisme karbohidrat dan asam amino arginin.⁴ Karbohidrat dikatabolisme melalui 2 jalur yaitu aerob dan anaerob. Pada kondisi aerob, karbohidrat dipecah oleh berbagai jalur metabolisme, yaitu glikolisis (*EMP pathway*), *The entner-doudoroff* (*ED pathway*), pentose fosfat, dekarbosisasi oksidatif, siklus asam sitrat, dan fosforilasi oksidatif.⁸ Sedangkan pada kondisi anaerob, glukosa dipecah melalui jalur glikolisis dan menjadi asam laktat.⁹ Asam amino arginin yang dimetabolisme *Enterococcus faecalis* dapat digunakan untuk memperoleh energi merupakan ciri khas yang dimiliki bakteri tersebut, namun perolehan energi dari katabolisme arginin lebih rendah dibandingkan dengan glikolisis, yakni hanya 1 mol ATP per mol substrat.¹⁰ Katabolisme arginin bakterial melalui jalur *arginase* dan *Arginin Deiminase* atau *ADI Pathway*. Pada jalur *arginase*, enzim *arginase* menghidrolisis arginin menjadi glutamat dan akan dirubah menjadi α -ketoglutarat sehingga dapat masuk dalam siklus asam sitrat untuk memproduksi ATP. Pada jalur *Arginin Deiminase* atau *ADI Pathway*, arginin di hidrolisis oleh enzim *arginine deiminase* (*ArcA*) menjadi *citruilin*. *Citruilin* akan diubah lagi oleh enzim *ornithine carbamoyltransferase* (*ArcB*) menjadi karbamoil fosfat dan ornitin.¹¹ Pada akhirnya karbamoil fosfat digunakan untuk fosforilasi ADP didalam reaksi katalisasi oleh enzim karbamoil kinase yang menghasilkan ATP sebagai energi dan produk sampingan berupa CO₂ dan NH₃.¹²

Propolis merupakan salah satu produk lebah yang memiliki kandungan 50% resin, 30% lilin, 10% minyak esensial, 5% polen, dan 5% senyawa kompleks lain.¹³ Propolis mempunyai kandungan senyawa biologis dan farmakologis seperti, *flavonoid*, *chrysin*, *galangin*, *pinocembrin*, *pinobaksin*, *caffeic acid phenethyl ester*, *terpenoid*, fenol, hidrokarbon, ester dan elemen lainnya.¹⁴ *Flavonoid* merupakan komponen utama propolis dengan aktivitas biologis dan farmakologis yang luas.¹⁵ *Caffeic acid phenethyl ester* juga sebagai komponen utama propolis dalam iklim sedang dengan aktivitas biologi yang luas, termasuk menghambat proliferasi sel dan induksi pemberhentian siklus sel atau apoptosis. *Terpenoid* memiliki kontribusi dalam efek farmakologis yang memiliki pengaruh sebagai antioksidan, antimikroba, dan berbagai aktivitas biologi lainnya.¹³

Berdasarkan uraian diatas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang efek ekstrak etanol propolis terhadap aktivitas metabolisme karbohidrat dan arginin *Enterococcus faecalis*.

BAHAN DAN CARA

Bahan uji untuk penelitian ini adalah propolis lebah *Apis Trigona* yang diambil dari peternakan lebah di daerah Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta yang kemudian dilakukan ekstraksi dengan teknik maserasi. Konsentrasi ekstrak etanol propolis yang digunakan adalah 0,00125%, 0,4%, dan 10%. Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratoris *in vitro* yang diawali dengan penelitan pendahuluan atau *preliminary*.

Preliminary bertujuan untuk mendapatkan lamanya waktu paparan perlakuan yang digunakan pada penelitian yang sebenarnya. Sampel yang digunakan adalah sampel klinis bakteri *Enterococcus* yang diisolasi dari saluran akar pasien dengan perawatan endodontik dan sampel *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Studi *preliminary* menggunakan 5 sampel perlakuan dengan paparan waktu yang berbeda dan 1 sampel tanpa perlakuan sebagai kontrol bakteri. Larutan perlakuan yang digunakan adalah *chlorhexidine digluconate 2%*. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 diambil dari *master suspensi*, diinokulasi dan diinkubasi dalam BHI broth selama 24 jam. Volume bakteri sebanyak 200µl dilakukan pendistribusian tiap tabung perlakuan dengan kelompok waktu perlakuan 5 menit, 1 jam, 6 jam, 12 jam, dan 24 jam kemudian inkubasi pada suhu 37°C. Kemudian larutan perlakuan dibuang dan digantikan dengan larutan nutrisi berupa BHI *broth*. Selanjutnya pengukuran nilai OD jumlah populasi bakteri pasca paparan perlakuan, inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 24 jam. Lakukan pengukuran nilai OD jumlah populasi bakteri pasca inkubasi BHI *broth*. Nilai OD populasi bakteri dengan resuspensi BHI dan pasca diberikan paparan perlakuan dilakukan pengamatan. Hasil akhir *preliminary* berupa penentuan lama waktu perlakuan (*t* yang digunakan untuk penelitian sebenarnya).

Penelitian ini menggunakan 2 sampel bakteri yakni sampel klinis dan sampel ATCC 29212. Sampel *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta. Sampel klinis bakteri di ambil dari saluran akar gigi yang hendak dilakukan perawatan endodontik pada pasien di RSGM UMY dan diinokulasi pada BHI *broth* selama 24 jam dengan suhu 37°C. Plating bakteri pada media isolasi *Slantez and Bartley agar* dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 44°C. Ada tidaknya populasi bakteri *Enterococcus* yang ditandai dengan titik-titik merah gelap pada media tersebut. Ambil 1 titik (1 populasi) pada media agar kemudian inokulasi dalam BHI *broth* selama 24 jam pada suhu 37°C untuk membuat *master suspensi* sampel klinis. Inokulasi bakteri pada sampel ATCC 29212 dalam BHI *broth* untuk membuat *master suspensi* sampel ATCC 29212.

Master suspensi bakteri dari tiap jenis sampel yang terdiri dari sampel klinis dan ATCC 29212 diinokulasi pada tiap kelompok perlakuan EEP berbagai konsentrasi, kontrol positif dan kontrol negatif. 200µl bakteri dari master suspensi didistribusikan pada tiap larutan perlakuan. Homogenisasi seluruh kelompok perlakuan dan diinkubasi selama paparan lamanya waktu perlakuan (*t*) pada suhu 37°C. Kemudian sentrifugasi larutan perlakuan, buang dan ganti dengan larutan BHI *broth*. Lakukan pengukuran nilai OD pasca pemberian paparan perlakuan. Inkubasi kembali seluruh kelompok perlakuan pasca resuspensi BHI *broth* pada suhu 37°C selama 24 jam. Pasca inkubasi selama 24 jam, lakukan pengukuran nilai OD pasca resuspensi BHI *broth* yang mana berfungsi untuk melihat nilai *recovery rate* dari hasil pengurangan terhadap nilai OD pasca pemberian paparan perlakuan. Selain itu, Hasil pengukuran nilai OD pasca resuspensi BHI *broth* dapat menjadi patokan untuk menentukan volume bakteri yang akan digunakan untuk uji metabolisme bakteri.

Penelitian selanjutnya dilakukan pengujian metabolisme karbohidrat dan arginin pada bakteri sampel klinis dan ATCC 29212 dengan mengobservasi perubahan warna media, kuantifikasi *imageJ* warna media, dan pengukuran pH. Pengujian metabolisme karbohidrat menggunakan media *Phenol Red broth* dan uji metabolisme arginin menggunakan media *Arginine Dehydrolase broth*. Dilakukan triplikasi tabung media uji pada masing-masing perlakuan. Pemberian bakteri pada media uji berdasarkan perhitungan yang telah di tentukan pada masing2 perlakuan. Inkubasi media uji pada suhu 37°C selama 24 jam pada media uji karbohidrat dan 48 jam pada media uji arginin. Observasi perubahan warna yang terjadi pada media uji diikuti dengan kuantifikasi warna pada tiap tabung media uji menggunakan aplikasi *imageJ*, dan melakukan pengukuran pH pada media uji.

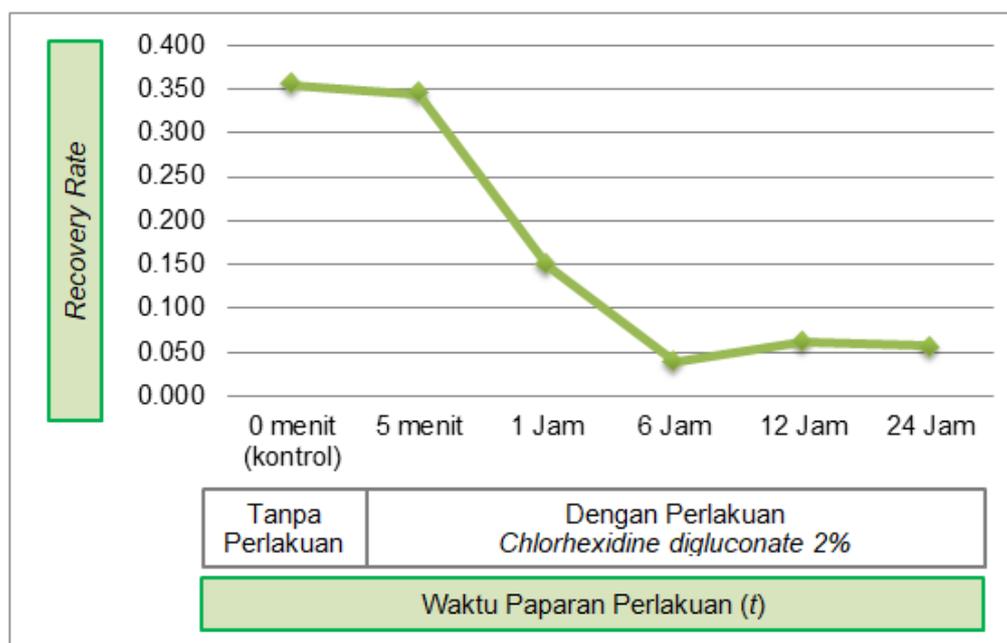
HASIL

A. Hasil Penelitian Pendahuluan (*Preliminary*)

Hasil *preliminary* dijadikan dalam bentuk tabel pengukuran nilai *optical density* pada tiap waktu perlakuan, grafik *recovery rate* terhadap waktu paparan perlakuan. *Recovery rate* tersebut adalah selisih antara OD BHI pasca inkubasi 24 jam dengan OD BHI resuspensi pasca perlakuan.

Tabel 1. Nilai *Optical Density* (OD) pada tiap waktu perlakuan (*preliminary*)

Waktu Perlakuan (t)	OD BHI Resuspensi Pasca Perlakuan	OD BHI Pasca Inkubasi 24 jam	Recovery Rate
0 menit	0,860	1,215	0,355
5 menit	0,905	1,249	0,344
1 Jam	1,091	1,240	0,149
6 Jam	1,077	1,116	0,039
12 Jam	1,096	1,157	0,061
24 Jam	1,046	1,103	0,057



Gambar 1. Grafik *recovery rate* terhadap paparan waktu perlakuan pada *preliminary*

Berdasarkan grafik tersebut didapatkan informasi bahwa semakin lama waktu paparan perlakuan, maka semakin rendah *recovery rate* bakteri. Hal tersebut ditandai dengan penurunan nilai *recovery rate* bakteri seiring dengan penambahan waktu paparan larutan perlakuan.

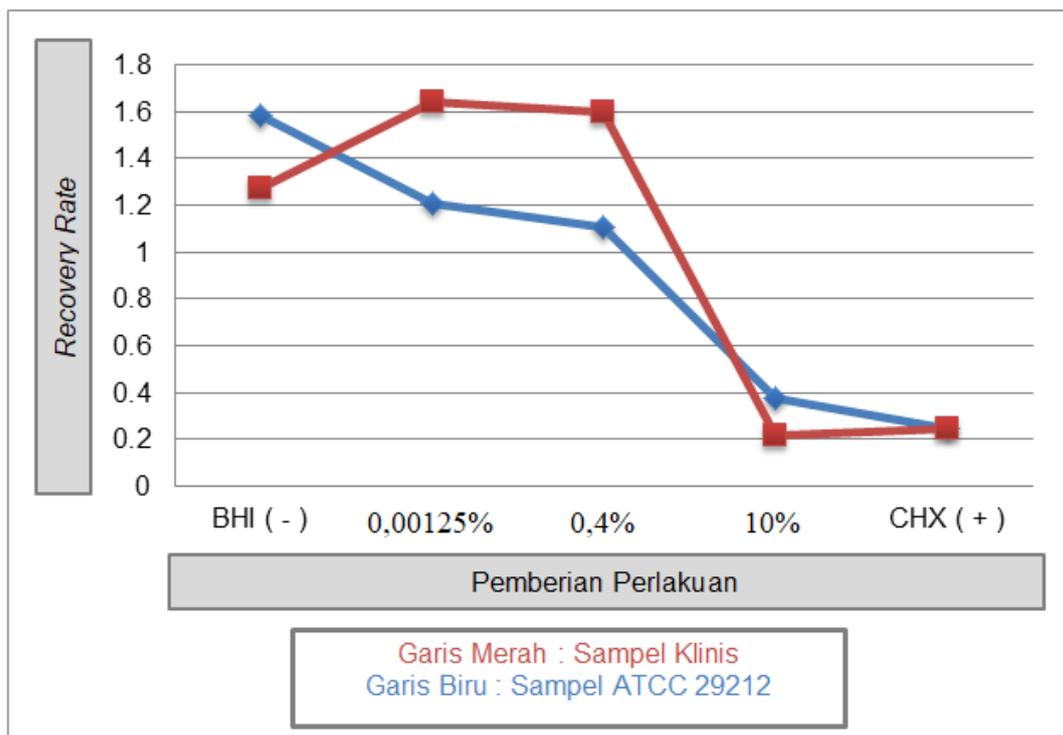
B. Hasil Metabolisme Karbohidrat dan Arginin Bakteri

Pada penelitian ini mengukur 3 data yakni; *recovery rate* bakteri, pengamatan metabolisme karbohidrat dan arginin bakteri, dan pengukuran pH media uji.

Pengukuran pertama adalah mengukur nilai OD BHI resuspensi pasca perlakuan dengan waktu (*t*) yang telah di tetapkan pada penelitian pendahuluan dan nilai OD BHI pasca inkubasi 24 jam. Hasil pengukuran tersebut disajikan dalam bentuk tabel nilai *optical density* sampel dan grafik.

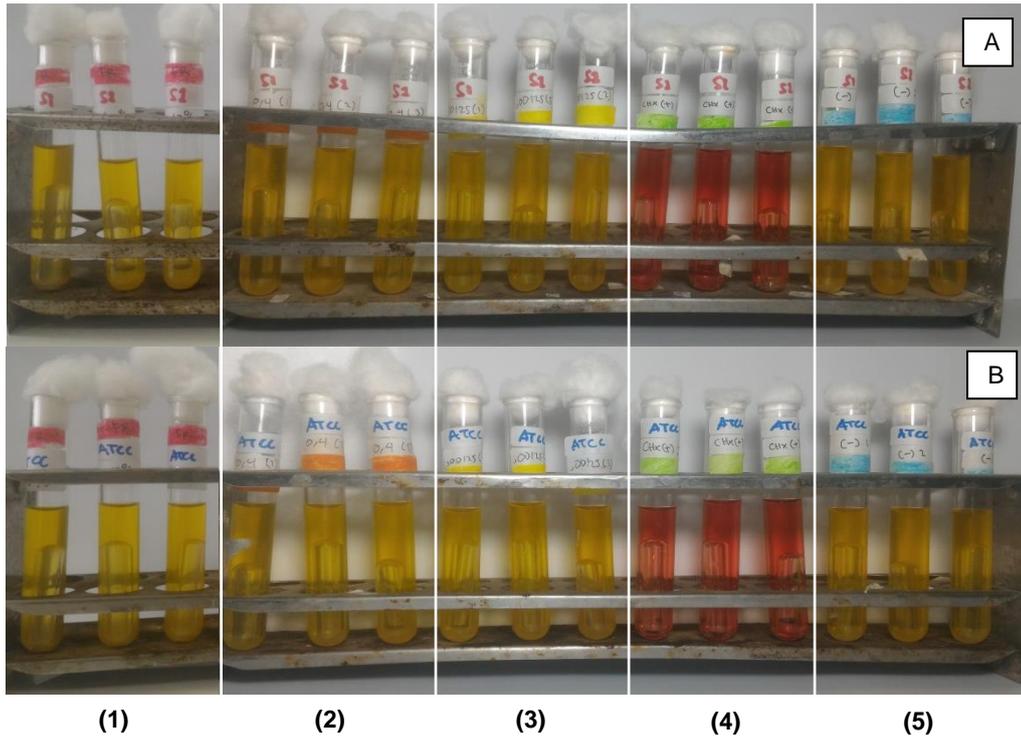
Tabel 2. Nilai *optical density* (OD) sampel klinis dan ATCC 29212

Perlakuan	Sampel Klinis			ATCC 29212		
	OD Setelah Resuspensi Pasca Perlakuan (A)	OD Setelah Inkubasi 24 jam (A)	Recovery Rate	OD Setelah Resuspensi Pasca Perlakuan (A)	OD Setelah Inkubasi 24 jam (A)	Recovery Rate
BHI (K-)	0,684	1,955	1,271	0,437	2,018	1,581
EEP 0.00125 %	0,194	1,835	1,641	0,378	1,585	1,207
EEP 0.4 %	0,304	1,903	1,599	0,288	1,391	1,103
EEP 10 %	2,452	2,669	0,217	2,381	2,753	0,372
CHX (K+)	2,355	2,598	0,243	1,104	1,351	0,247

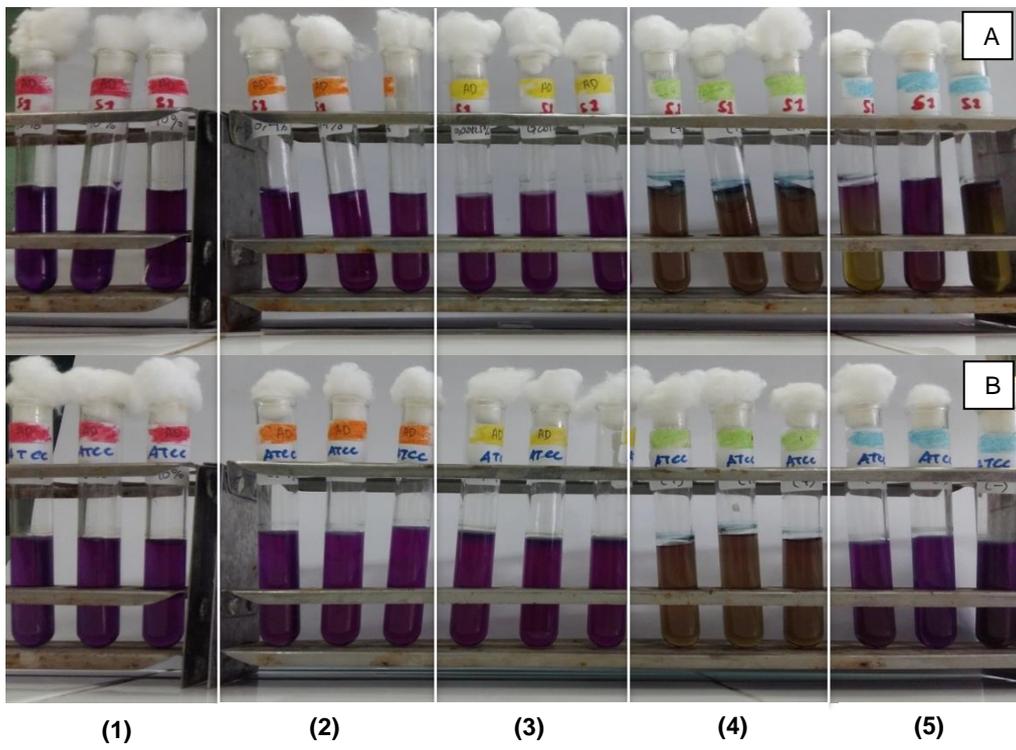


Gambar 2. Grafik *Recovery Rate* sampel ATCC 29212 dan Sampel Klinis

Berdasarkan tabel dan grafik *recovery rate*, terdapat perbedaan hasil pada sampel ATCC 29212 dan sampel klinis. Pada sampel ATCC 29212, EEP dengan konsentrasi 0,00125% sudah dapat memberikan pengaruh terhadap nilai *recovery rate* bakteri dan nilai *recovery rate* bakteri berkurang seiring dengan penambahan konsentrasi pada EEP (0,4% dan 10%). Sedangkan pada sampel klinis penghambatan kemampuan *recovery* bakteri baru dapat terjadi pada EEP dengan konsentrasi 10%. Namun kedua sampel tersebut memiliki kesamaan yaitu *recovery rate* bakteri dapat dihambat dengan baik pada konsentrasi perlakuan EEP 10%. Hal tersebut ditandai oleh nilai *recovery rate* pada perlakuan EEP 10% mendekati nilai *recovery rate* pada kontrol positif (*chlorhexidine digluconate* 2%) dan terpaut jauh dari perlakuan EEP dengan konsentrasi yang lebih rendah (0,4% dan 0,00125%).



Gambar 3. Uji metabolisme karbohidrat pada bakteri sampel klinis (A) dan ATCC 29212 (B) dengan perlakuan 10% (1), 0,4% (2), 0,00125% (3), Kontrol positif (CHX 2%) (4), dan Kontrol negatif BHI tanpa perlakuan (5).



Gambar 4. Uji metabolisme arginin pada bakteri sampel klinis (A) dan ATCC 29212 (B) dengan perlakuan 10% (1), 0,4% (2), 0,00125% (3), Kontrol positif (CHX 2%) (4), dan Kontrol negatif BHI tanpa perlakuan (5).

Tabel 3. Hasil uji metabolisme karbohidrat dan arginin pada sampel klinis dan ATCC 29212

PERLAKUAN	Metabolisme Karbohidrat						Metabolisme Arginin					
	Sampel Klinis			ATCC 29212			Sampel Klinis			ATCC 29212		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,00125%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CHX 2% (+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BHI (-)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Berdasarkan pengamatan perubahan warna media uji metabolisme karbohidrat pada Gambar 3. dan metabolisme arginin pada Gambar 4. menunjukkan bahwa media uji dengan perlakuan EEP 10%, 0,4%, 0,00125%, dan kontrol negatif menunjukkan adanya perubahan warna. Perubahan warna merah ke kuning pada media uji metabolisme karbohidrat dan perubahan warna kuning ke ungu pada media uji metabolisme arginin. Sedangkan pada media uji dengan perlakuan CHX 2% (kontrol positif) menunjukkan tidak adanya perubahan warna pada media uji (warna tetap merah pada media uji metabolisme karbohidrat dan warna tetap kuning pada media uji metabolisme arginin). Hal tersebut di gambarkan pada Tabel 3.

Tabel 4. Hasil kuantifikasi *imageJ* warna pada media uji metabolisme karbohidrat dan arginin

PERLAKUAN	Kuantifikasi <i>Image</i>							
	Metabolisme Karbohidrat				Metabolisme Arginin			
	Sampel Klinis		ATCC 29212		Sampel Klinis		ATCC 29212	
EEP 10%	1	97,200	92,875	43,375	44,900			
	2	101,275	98,150	46,475	37,575			
	3	100,750	101,125	52,550	44,075			
EEP 0,4%	1	75,125	82,725	49,175	47,000			
	2	74,950	84,900	51,550	43,725			
	3	72,725	80,950	48,275	44,200			
EEP 0,00125%	1	71,825	78,500	54,875	50,350			
	2	70,300	76,925	55,000	44,550			
	3	73,125	77,425	50,400	44,300			
CHX 2% (+)	1	64,500	66,575	67,250	66,150			
	2	57,625	61,175	69,050	62,300			
	3	56,500	60,375	69,775	61,125			
BHI (-)	1	97,200	92,875	33,650	56,075			
	2	101,275	98,150	41,175	55,950			
	3	100,750	101,125	44,550	54,250			

Data kuantifikasi *imageJ* media uji metabolisme karbohidrat maupun media uji metabolisme arginin pada Tabel 4 tersebut kemudian dilakukan analisis data menggunakan uji statistik *One Way Anova*. Hasil uji statistik tersebut pada keduanya memiliki hasil yang sama. Pada bakteri sampel klinis dengan perlakuan EEP 3 konsentrasi dibandingkan dengan kontrol positif memiliki nilai signifikansi sebesar 0,00 pada uji metabolisme karbohidrat dan 0,04 pada uji metabolisme arginin ($p < 0,05$). Pada sampel ATCC 29212 dengan perlakuan EEP 3 konsentrasi dibandingkan dengan kontrol positif memiliki nilai signifikansi sebesar 0,00 pada uji metabolisme karbohidrat dan 0,00 pada uji metabolisme arginin ($p < 0,05$). Hal tersebut menandakan terdapat perbedaan yang signifikan antara rerata data kuantifikasi *ImageJ* EEP berbagai konsentrasi dengan kontrol positif *chlorhexidine digluconat* 2% baik pada uji metabolisme karbohidrat maupun metabolisme arginin.

Tabel 5. Pengukuran pH pada media uji metabolisme karbohidrat dan arginin

Perlakuan	pH media uji Metabolisme Karbohidrat						pH media uji Metabolisme Arginin					
	Sampel Klinis			Sampel ATCC 29212			Sampel Klinis			Sampel ATCC 29212		
	pH			pH			pH			pH		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
10%	5	5	5	5	5	5	8	8	8	8	8	8
0,4%	5	5	5	5	5	5	8	8	8	8	8	8
0,00125%	5	5	5	5	5	5	8	8	8	8	8	8
CHX 2% (+)	7	7	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6
BHI (-)	5	5	5	5	5	5	8	8	8	8	8	8
MEDIA	7						6					

Pengukuran pH media uji metabolisme karbohidrat pada sampel klinis dan ATCC 29212 yang tertera pada Tabel 5 menunjukkan bahwa terdapat penurunan pH media uji dari 7 ke 5 pada media uji dengan perlakuan EEP 3 konsentrasi dan kontrol negatif. Hal tersebut serupa dengan pengukuran pH media uji metabolisme arginin pada sampel klinis dan ATCC 29212 yang tertera pada Tabel 4, yang menandakan terdapat beda yang menunjukkan bahwa terdapat penurunan pH media dari 6 ke 8 pada media uji dengan perlakuan EEP 3 konsentrasi dan kontrol negatif.

DISKUSI

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan (*preliminary*), diperoleh data bahwa kondisi bakteri pada paparan larutan perlakuan selama 5 menit tidak menunjukkan adanya kemampuan *recovery* pada bakteri. Hal tersebut ditandai dengan kecilnya selisih antara *recovery rate* perlakuan 5 menit dengan *recovery rate* bakteri pada kontrol negatif. Pada paparan larutan perlakuan selama 6 jam, 12 jam, dan 24 jam memiliki pengaruh yang signifikan terhadap penghambatan *recovery rate* pada bakteri. Hal ini memungkinkan bahwa pada ketiga paparan waktu perlakuan tersebut sudah tidak ada populasi bakteri yang dapat bertahan hidup. Pada paparan waktu perlakuan 1 jam, kondisi bakteri menunjukkan telah mendapatkan pengaruh dari larutan perlakuan tetapi masih ada populasi bakteri yang dapat bertahan hidup. Oleh karena itu, waktu paparan larutan perlakuan selama 1 jam dapat digunakan untuk observasi kemampuan metabolisme arginin pasca paparan larutan perlakuan. Sehingga dapat ditentukan bahwa waktu paparan larutan perlakuan yang sesuai untuk digunakan pada uji metabolisme arginin bakteri adalah dengan lama waktu 1 jam ($t = 1$ jam).

Berdasarkan hasil observasi grafik *recovery rate* pada Gambar 2, sampel *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 menunjukkan hasil bahwa *recovery rate* atau pertumbuhan pada bakteri tersebut dapat dihambat oleh EEP seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol propolis dalam waktu 1 jam. Hasil *recovery rate* pada sampel klinis berbeda dengan sampel ATCC 29212. Perbedaannya adalah pada perlakuan EEP dengan konsentrasi 0,4% dan 0,00125% tidak memiliki pengaruh terhadap penghambatan kemampuan *recovery* bakteri pada sampel klinis. Konsentrasi

EEP yang dapat memberikan pengaruh terhadap penghambatan kemampuan *recovery* bakteri pada sampel klinis adalah pada konsentrasi 10%. Hal tersebut menandakan bahwa EEP dengan berbagai konsentrasi dapat menghambat pertumbuhan dan kemampuan *recovery* bakteri *Enterococcus faecalis*.

Berdasarkan hasil pengujian metabolisme karbohidrat (Gambar 3) pada sampel bakteri menunjukkan bahwa larutan perlakuan EEP dengan konsentrasi 0,00125%, 0,4%, 10%, dan kontrol negatif pada media uji terjadi perubahan warna dari merah ke kuning yang menandakan adanya metabolisme karbohidrat pada bakteri sampel klinis dan sampel ATCC 29212. Berbeda dengan kontrol positif *chlorhexidine digluconate* 2% yang tidak terjadi perubahan warna pada media (tetap berwarna merah) atau dapat menghambat metabolisme karbohidrat pada media uji. Berdasarkan hasil uji statistik yang telah dilakukan pada data kuantifikasi *imageJ* pada media uji. Berdasarkan hasil uji statistik yang telah dilakukan, data kuantifikasi *imageJ* media uji perlakuan EEP 3 konsentrasi dengan kontrol positif (CHX 2%) pada sampel klinis diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0.05$) pada sampel klinis dan 0,000 ($p < 0.05$) pada ATCC 29212. Hal tersebut menunjukkan terdapat perbedaan rerata yang signifikan antara kelompok perlakuan EEP dengan 3 konsentrasi dan kontrol positif.

Uji metabolisme karbohidrat tersebut kemudian dikonfirmasi dengan pengukuran pH media uji pada sampel klinis dan ATCC 29212. Pada EEP konsentrasi 10%, 0,4%, 0,00125%, dan kontrol negatif memiliki nilai pH 5 yang mengalami penurunan 2 poin dari pH media uji yaitu 7. Pada kontrol positif menunjukkan pH yang sama dengan pH kontrol media. Penurunan pH Bakteri berasal dari pemanfaatan kandungan glukosa pada sampel media uji. Pada keadaan anaerob, glukosa dikatabolisme menjadi triosa fosfat, kemudian kondisi pasokan oksigen yang kurang menyebabkan NADH melakukan reoksidasi dengan mereduksi piruvat menjadi asam laktat sehingga terjadi penurunan pH pada media uji⁽⁹⁾.

Berdasarkan hasil pengujian metabolisme arginin (Gambar 4) pada sampel bakteri menunjukkan hasil bahwa larutan perlakuan EEP konsentrasi 10%, 0,4%, dan 0,00125% dan kontrol negatif pada media uji terjadi perubahan warna dari kuning ke ungu yang menandakan adanya metabolisme arginin pada kedua bakteri. Berbeda dengan kontrol positif CHX 2% yang tidak terjadi perubahan warna pada media yang menandakan terjadi penghambatan metabolisme arginin pada media uji. Berdasarkan hasil uji statistik yang telah dilakukan pada data kuantifikasi *imageJ* media uji perlakuan EEP 3 konsentrasi dengan kontrol positif CHX 2% pada sampel klinis diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,041 ($p < 0,05$) pada sampel klinis dan 0,000 ($p < 0,05$) pada ATCC 29212. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rerata yang signifikan antara perlakuan EEP 3 konsentrasi dengan kontrol positif *chlorhexidine digluconate* 2%.

Uji metabolisme arginin tersebut kemudian dikonfirmasi dengan pengukuran pH media uji pada sampel klinis dan ATCC 29212. Pada EEP konsentrasi 10%, 0,4%, 0,00125%, dan kontrol negatif memiliki nilai pH 8 yang mengalami peningkatan 2 poin dari pH media uji yaitu 6. Pada kontrol positif menunjukkan pH yang sama dengan pH kontrol media. Berdasarkan hasil uji statistik dari perlakuan EEP dan kontrol positif didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,012 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan antara ekstrak Peningkatan pH pada media ini disebabkan oleh adanya pelepasan 2 mol NH_3 ketika 1 mol arginin digunakan bakteri dimetabolism. Hal tersebut mengkonfirmasi bahwa ekstrak etanol propolis dengan konsentrasi 10%, 0,4%, dan 0,00125% tidak dapat menghambat metabolisme arginin yang ditandai dengan terjadinya peningkatan pH pada media.¹⁷

Mekanisme aksi antibakteri propolis dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah dengan merusak dinding sel bakteri yang menyebabkan gagalnya pembelahan sel sehingga menghasilkan pembentukan struktur *pseudo-multiseluler*. Selain itu, propolis dapat merusak membran sitoplasma, sitoplasma, dinding sel sehingga dapat menyebabkan bakteriolisis parsial, dan menghambat sintesis protein. Hal tersebut menandakan masih kompleksnya mekanisme kerja propolis terhadap sel

bakteri.¹⁸ Sedangkan daya antibakteri pada *chlorhexidine* tergantung pada konsentrasinya. Pada konsentrasi rendah *chlorhexidine* bersifat bakteriostatik dan pada konsentrasi tinggi bersifat bakteriosid. *Chlorhexidine* dapat menyebabkan kematian sel dengan cara melisis sel bakteri dengan cara merusak dinding sel dan meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri sehingga terjadi pelepasan komponen intraseluler utama termasuk kalium sehingga mengubah struktur protein sel bakteri dan menyebabkan koagulasi protein sitoplasma.¹⁹

Berdasarkan penelitian tentang kedua aksi antibakteri pada propolis dan *chlorhexidine* didapatkan kemungkinan bahwa pada sampel bakteri dengan paparan perlakuan *chlorhexidine* 2% (konsentrasi tinggi) yang bersifat bakteriosid dapat menyebabkan kematian pada seluruh bakteri sehingga bakteri tidak mampu melakukan metabolisme seluler bakteri. Sedangkan pada pemberian perlakuan propolis, bakteri hanya dihambat pertumbuhannya sehingga dimungkinkan hanya jumlah populasinya saja yang tertekan pertumbuhannya, tetapi aktifitas metabolisme energi pada sel bakterinya tidak tertekan. Sehingga pada saat paparan perlakuan propolis dihilangkan dan bakteri tersebut mendapatkan nutrisi serta sumber energi berupa arginin, bakteri tersebut dapat melakukan metabolisme. Hal tersebut menandakan bahwa tingginya virulensi bakteri tidak dapat didasarkan oleh tingginya populasi pada bakteri. Jumlah bakteri yang sedikit bisa jadi memiliki tingkat virulensi dan metabolisme yang tinggi.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol propolis (EEP) dengan berbagai konsentrasi dapat menghambat kemampuan *recovery* bakteri *Enterococcus faecalis* tetapi tidak dapat memberikan efek terhadap penghambatan aktivitas metabolisme karbohidrat dan arginin bakteri *Enterococcus faecalis*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sipavičiūtė E, Manelienė R. Pain and flare up after endodontic treatment procedures [Internet]. Vol. 16, Stomatologija / issued by public institution "Odontologijos studija" ... [et al.]. 2014. p. 25–30.
2. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. J Endod. 1992;18(9):427–30.
3. 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(2):93–8.
4. Gijo J, K PK, S SG, Surya K, Bala KR. Enterococcus faecalis, a nightmare to endodontist: A systematic review. African J Microbiol Res [Internet]. 2015;9(13):898–908. Available from: <http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/0286E7B52141>
5. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: New developments in the 21st century. Cell Mol Life Sci. 2003;60(12):2622–36.
6. Jia W, Li G, Wang W. Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococcus species: A hospital-based study in China. Int J Environ Res Public Health. 2014;11(3):3424–42.
7. Ørstavik D. Virulence Factors of Enterococcus Faecalis : 2004;15(5):308–20.
8. Chen X, Schreiber K, Appel J, Makowka A, Fähnrich B, Roettger M, et al. The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2016;113(19):5441–6. 9. Rodwell V, Bender D, Botham K, Kennelly P, Weil A. Harper's Illustrated Biochemistry, 30th Edition. 2006;821.

10. R.H.Deibel. Utilization of Arginine as An Energy Source for The Growth of *Streptococcus faecalis* ' two distinct physiological types has been reported Deibel , Lake , and Niven , 1963). The *Streptococcus* inability to ferment arabinose ; and by the ability. 1964;87(5):988–92.
11. Xiong L, Teng JLL, Botelho MG, Lo RC, Lau SKP, Woo PCY. Arginine metabolism in bacterial pathogenesis and cancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3):1–18.
12. Barcelona-Andrés B, Marina A, Rubio V. Gene structure, organization, expression, and potential regulatory mechanisms of arginine catabolism in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. 2002;184(22):6289–300.
13. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*. 2014;19(12):19610–32.
14. Fernandes-Silva CC, Freitas JC, Salatino A, Salatino MLF. Cytotoxic activity of six samples of Brazilian propolis on sea urchin (*Lytechinus variegatus*) eggs. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2013;2013:5–8.
15. Cushnie TPT, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(2):99–107.
16. Mihai CM, Mârghitaş L AI, Dezmirean DS, Chirilă F, Moritz RFA, Schlüns H. Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus* larvae. *J Invertebr Pathol*. 2012;110(1):68–72.
17. Karen E. Sjostrom, Kirk C. S. Chen, George E. Keny Detection of End Products of the Arginine Dihydrolase Pathway in Both Fermentation and Nonfermentative *Mycoplasma* Species by Thin-Layer Chromatography. 1986;36(1):60-65
18. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med*. 1994;60(3):222–7.
19. Nazam Lakhani, K.L.Vandana. Chlorhexidine - An Insight. *International Journal of Advanced Research*. 2016;4(7):1321-1328