

PROPOLIS SEBAGAI ALTERNATIF BAHAN ANTIKARIES GIGI

A. E. Zainal Hasan¹, I Made Artika¹, Popi A.K¹ dan Metty Lasmiyanti¹

¹Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Pertanian Bogor

Diterima 29-02-2011; Diterima setelah direvisi 01-03-2011; Disetujui 09-03-2011

ABSTRACT

Zainal Hasan A. E. *et al.*, 2011. Propolis as alternative additive anti-caries

Periodontal disease included dental caries still the major problem in the world. Usually commercial tooth paste contains fluoride which has an important role to prevent tooth from damage. Contain fluoride overdose caused fluorosis, bone damage and anemia. Therefore, the propolis was being tested as alternative additive anti caries to prevent the growth of cariogenics bacteria (*Streptococcus mutans*). This research studied propolis activity antibacterial and the minimum inhibitory concentration (MIC) of propolis against *S. mutans*.

Ethanollic extract of propolis (EEP) contained various bioactive compound such as flavonoid, tannine, alkaloid, triterpenoid and saponin based on phytochemistry analyses. The extract effectivities are 96.5% relative to the propolis X, 41.04% relative to ampicillin 10 mg/ml and 240.57% relative to NaF 3000 ppm. The MIC of the extract is 3.13%. Therefore, propolis extract can be used asa additive anti caries element in tooth paste. Statistical analyses showed that 100% EEP, X propolis and ampicillin 10 mg/ml had the ability to decrease *S. mutans* colony

Keywords : propolis, anti-caries, ethanolic extract

PENDAHULUAN

Sampai saat ini masalah penyakit periodontal termasuk karies gigi masih banyak terjadi di kalangan masyarakat dunia. Hal ini disebabkan oleh faktor dalam, yaitu kehygienisan mulut dan gigi serta faktor luar yang mempengaruhi faktor dalam tersebut. Faktor luar yang tidak langsung diantaranya pola diet masyarakat dan pengetahuan masyarakat tentang kehygienisan mulut termasuk pengetahuan tentang cara menggosok gigi yang benar. Hanya 27,5% sukarelawan di dua kecamatan di Medan yang menggosok gigi pada waktu yang tepat atau setelah makan dan sebelum tidur (Situmorang 2004). Dari pola makan, sebagai contoh rata-rata para ibu selalu memberikan makanan pokok dengan kadar karbohidrat 80%, dan memberikan jajanan yang mengandung 96,7% karbohidrat (Yuyus *et al.* 1991).

Plak gigi yang menjadi penyebab terjadinya karies gigi dapat dihilangkan dengan menggosok gigi dengan cara yang benar dan dilakukan pada waktu yang tepat. Selain itu, pemakaian pasta gigi yang mengandung bahan antibakteri yang mampu membunuh bakteri penyebab karies gigi. Pasta gigi komersial biasanya mengandung fluorida dalam bentuk natrium fluorida (NaF). Zat tersebut berperan penting dalam mencegah kerusakan gigi. Senyawa fluorida ini juga sangat penting untuk pemeliharaan gigi agar tetap kuat, terutama pada anak-anak. Hal ini disebabkan senyawa fluorida dapat membantu pembentukan enamel gigi yang lebih tahan terhadap kerusakan.

Walaupun demikian, penggunaan senyawa berfluorida secara berlebih dapat menyebabkan fluorosis yang beraibat terjadinya kerusakan tulang dan anemia. Fluorosis merupakan kerusakan gigi ditandai dengan perubahan warna gigi menjadi gelap dan rapuh. Selain itu dapat juga timbul bercak pada gigi dan yang lebih berbahaya lagi dapat menyebabkan gagal ginjal.

Penggunaan bahan alternatif lain sebagai antibakteri dalam pasta gigi banyak dilakukan. Hal ini dilakukan dengan mencari bahan alami yang memiliki potensi sebagai antibakteri dalam pasta gigi dan sekecil mungkin memiliki efek samping. Minyak daun sirih dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* yang lebih tinggi dibandingkan dengan NaF (Sundari 1991). Bahan alami lain yang berfungsi sebagai antibakteri adalah propolis. Propolis *Trigona* spp. berdasarkan penelitian Anggraini (2006) terbukti memiliki potensi sebagai antibakteri, namun belum diujikan pada bakteri kariogenik. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian terhadap propolis *Trigona* spp. sebagai antibakteri kariogenik (*S. mutans*).

Penelitian bertujuan untuk menentukan adanya aktivitas antibakteri propolis dan menentukan konsentrasi hambat tumbuh minimum (KHTM) propolis terhadap *S. mutans.a L.*

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang dibutuhkan adalah propolis kasar *Trigona* spp yang berasal dari peternakan lebah di Pandeglang Banten, bakteri *S. mutans*, media cair PYG (pepton, yeast, glukosa), media padat PYG, etanol 70%, propilen glikol teknis, natrium fluorida (NaF), larutan natrium klorida 0,9%, pereaksi-pereaksi uji fitokimia, dan akuades.

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf, shaker, rotavapor, spektrofotometer UV, laminar air flow cabinet, inkubator, mikropipet, neraca analitik, alat penghitung koloni, vortex, jangka sorong, mortar, jarum ose, cawan petri, dan beberapa alat gelas lainnya.

Ekstraksi propolis

Propolis diekstraksi menggunakan metode yang sesuai dengan prosedur yang telah didaftarkan paten dengan biaya dari DIKTI, Departemen Pendidikan Nasional tahun 2007 atas nama Hasan *et al.* (2007). Selanjutnya ekstrak tersebut dilakukan uji fitokimia dan uji aktivitas antibakteri penyebab karies gigi.

Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia merupakan uji kualitatif untuk mengetahui keberadaan golongan senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak propolis. Analisis fitokimia dilakukan berdasarkan metode Harbone (1987). Identifikasi yang dilakukan adalah uji alkaloid, uji tanin, uji flavonoid, uji saponin, uji steroid, dan uji minyak atsiri. Sampel propolis yang digunakan adalah ekstrak propolis 100% dan propolis merk X yang telah diencerkan dengan akuades.

Uji Alkaloid. Sampel propolis dengan pengenceran 1:2 sebanyak 0,3 mL ditambahkan 1,5 mL kloroform dan 3 tetes ammonia. Kemudian fraksi kloroform diasamkan dengan 2 tetes asam sulfat. Bagian asamnya diambil dan ditambahkan reagen Dragendrof, Meyer, dan Wagner. Keberadaan alkaloid dalam sampel ditandai dengan terbentuknya endapan merah dengan penambahan reagen Dragendrof, endapan putih dengan reagen Meyer, dan endapan putih dengan reagen Wagner.

Uji Tanin. Sampel propolis dengan pengenceran 1:10 dididihkan selama 5 menit. Selanjutnya 3 tetes sampel dipindahkan ke dalam papan uji dan ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1% (v/v). Keberadaan senyawa tanin dalam sampel ditandai dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman.

Uji Flavonoid. Sampel propolis dengan pengenceran 1:2 sebanyak 0,3 mL dicampur dengan 1,5 mL metanol dan dipanasi pada suhu 50 °C selama 5 menit. Kemudian 5 tetes larutan tersebut dipindahkan ke dalam papan uji dan ditetesi 5 tetes asam sulfat pekat. Warna merah yang terbentuk menunjukkan bahwa sampel yang digunakan mengandung senyawa flavonoid.

Uji Saponin. Sampel propolis dengan pengenceran 1:10 sebanyak 10 mL dikocok selama 10 menit. Selanjutnya didiamkan selama 15 menit dan dilihat tinggi buih yang terbentuk. Keberadaan senyawa saponin dalam sampel ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil dengan tinggi lebih dari 1 cm.

Uji Steroid dan Triterpenoid. Sampel propolis dengan pengenceran 1:10 dilarutkan ke dalam 2 mL etanol 30% dan dipanaskan. Filtratnya diuapkan dan ditambah 1 mL eter. Fraksi eter sebanyak 5 tetes dipindahkan ke dalam papan uji dan ditambahkan 3 tetes asetat anhidrida dan 1 tetes asam sulfat pekat. Warna merah atau ungu yang terbentuk menunjukkan bahwa sampel mengandung senyawa triterpenoid dan warna hijau menunjukkan adanya senyawa steroid.

Uji Minyak Atsiri. Sampel propolis dilarutkan dengan etanol teknis dan diuapkan hingga kering. Jika berbau aromatis yang spesifik maka sampel mengandung minyak atsiri.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode perforasi atau difusi sumur, metode hitungan cawan, dan metode turbidimetri (kekeruhan). Pembanding yang digunakan adalah tablet ampicilin 250 mg dengan konsentrasi 10 mg/mL (kontrol positif), akuades (kontrol negatif), propolis merk X, kontrol pelarut (propilen glikol dan etanol 70%), dan NaF 3000 ppm..

Penentuan Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum (KHTM)

Penentuan konsentrasi hambat tumbuh minimum dilakukan setelah diketahui bahwa ekstrak propolis memiliki aktivitas antibakteri. Tahap pertama yaitu pengenceran propolis dengan akuades sehingga didapatkan beberapa konsentrasi (100% sampai 1.56% v/v). Tiap konsentrasi sebanyak 50 µL dimasukkan ke dalam lubang media PYG padat yang mengandung bakteri uji. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri diperoleh dengan

mengukur diameter zona bening di sekitar lubang sampel dengan menggunakan jangka sorong.

Uji Aktivitas Antibakteri Metode Hitungan Cawan

Setelah nilai KHTM didapatkan, jumlah sel bakteri dihitung berdasarkan metode hitungan cawan. Sampel yang digunakan adalah ekstrak propolis dengan konsentrasi saat KHTM dan ekstrak propolis 100%. Ekstrak propolis 100% merupakan ekstrak propolis yang sudah dilarutkan dengan propilen glikol dengan perbandingan 1:1. Perbandingan yang digunakan pada metode ini adalah ampisilin dengan konsentrasi 10 mg/mL (kontrol positif), akuades (kontrol negatif), propolis merk X, kontrol pelarut (propilen glikol dan etanol 70%), dan larutan NaF 3000 ppm.

Bakteri uji sebanyak satu ose dikulturkan ke dalam 10 mL media PYG cair lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Nilai absorbansi kultur tersebut diukur dan kultur tersebut dengan volume tertentu dipindahkan ke dalam 10 mL media PYG cair yang berisi 50 µL sampel. Selanjutnya biakan tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kemudian kultur tersebut diencerkan dengan larutan NaCl 0,9% steril sehingga diperoleh bakteri dalam jumlah tertentu. Larutan bakteri hasil pengenceran sebanyak 100 µL disebar ke dalam cawan petri lalu media agar PYG dituang dan dibiarkan hingga memadat. Setelah memadat kultur bakteri tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Uji Aktivitas Antibakteri Metode Turbidimetri

Sebanyak satu ose biakan bakteri dikulturkan ke dalam 10 mL PYG cair dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah itu 100 µL kultur tersebut dan 50 µL sampel dipipet ke dalam 10 mL PYG cair lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sampel dan perbandingan yang digunakan sama seperti pada uji aktivitas antibakteri metode hitungan cawan.

Analisis Statistik

Analisis statistik yang digunakan dalam pengolahan data adalah rancangan percobaan satu faktor dalam Rancangan Acak Lengkap. Berikut ini merupakan model rancangannya (Mattjik 2000):

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = Pengamatan pada perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

μ = Pengaruh rata-rata umum

τ = Pengaruh perlakuan ke-i

ε = Pengaruh acak pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

Rancangan percobaan ini digunakan pada penentuan nilai KHTM, penentuan jumlah koloni dengan metode hitungan cawan dan turbidimetri. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA (*Analysis of variance*) pada tingkat kepercayaan 95% dan taraf α 0,05. Uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan. Seluruh data dianalisis dengan menggunakan program SPSS 15,0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan zat aktif dalam ekstrak propolis secara kualitatif. Hasil analisis fitokimia menunjukkan golongan senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak propolis yaitu flavonoid, triterpenoid, tanin, alkaloid, dan saponin. Terdapat kesamaan golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak propolis dengan propolis komersial. Uji fitokimia yang dilakukan oleh Anggraini (2006) menunjukkan ekstrak propolis yang diperoleh tidak mengandung alkaloid. Perbedaan komposisi zat aktif pada kedua ekstrak tersebut dikarenakan waktu pengkoleksian propolis yang berbeda. Menurut Teixeira (2005) komposisi zat aktif dalam propolis berbeda-beda bergantung dari tumbuhan asal resin, iklim, waktu pengkoleksian, dan jenis lebah.

Analisis komposisi zat aktif dalam propolis Mesir dengan menggunakan kromatografi gas adalah senyawa flavonoid, triterpenoid, alkaloid, dan asam aromatik (Hegazi 2002). Adanya perbedaan senyawa aktif yang berperan sebagai antimikrob, antiinflamasi, dan antioksidan dalam berbagai ekstrak propolis dari tempat yang berbeda (Bankova 2005). Hal tersebut menunjukkan iklim dan sumber tanaman asal sangat mempengaruhi kualitas ekstrak propolis.

Alkaloid merupakan golongan senyawa nitrogen heterosiklik. Senyawa ini pula yang menyebabkan propolis memiliki efek anestesi, karena sifatnya yang mirip dengan morfin. Alkaloid juga memiliki sifat antibakteri, karena memiliki kemampuan menginterkalasi DNA (Murphy 1999).

Senyawa fenol yang terdapat dalam ekstrak propolis berdasarkan uji fitokimia adalah flavonoid dan tanin. Menurut Bankova (2005) golongan senyawa fenol yang terkandung dalam propolis menunjukkan aktivitas antibakteri, antiradang, dan antioksidan. Sifat antibakteri flavonoid secara umum disebabkan senyawa ini mempunyai kemampuan mengikat protein ekstraseluler dan protein integral yang bergabung dinding sel bakteri (Murphy 1999). Akibat mekanisme tersebut, permeabilitas dinding sel terganggu sehingga dinding sel pecah karena tidak mampu menahan tekanan sitoplasma.

Senyawa tanin dalam ekstrak propolis diduga memiliki sifat antimikroba karena kemampuannya dalam menginaktif protein enzim, dan lapisan protein transpor (Murphy 1999). Sifat antibakteri dari senyawa tanin didukung dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Yulia (2006). Rita menyatakan bahwa senyawa tanin yang terdapat dalam ekstrak teh dapat menghambat pertumbuhan bakteri kariogenik (Yulia 2006).

Hasil uji fitokimia menunjukkan ekstrak propolis yang diperoleh mengandung senyawa triterpenoid. Triterpenoid dapat ditemukan pada lapisan lilin buah, damar, kulit, batang dan getah yang mungkin digunakan sebagai sumber resin propolis oleh lebah. Rasa pahit pada ekstrak propolis disebabkan adanya senyawa triperpena dalam ekstrak tersebut.

Analisis fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak propolis mengandung saponin. Senyawa saponin membentuk busa sabun dalam air dan merupakan bahan aktif permukaan (Suradikusumah 1989). Oleh karena itu, saponin dapat mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, sehingga sel tersebut akan lisis.

Tabel 1. Hasil analisis fitokimia ekstrak propolis dan propolis merk X

| Senyawa | Hasil | |
|---------------|---------|--------|
| | Ekstrak | Merk X |
| Alkaloid | √ | √ |
| Flavonoid | √ | √ |
| Minyak Atsiri | √ | √ |
| Triterpenoid | √ | √ |
| Saponin | √ | √ |
| Tanin | √ | √ |

Keterangan: (√) = ada; (-) = tidak ada

Efektivitas Ekstrak Propolis terhadap Propolis Merk X

Metode yang digunakan dalam penentuan aktivitas antibakteri adalah metode difusi sumur. Metode ini dipilih karena mudah, murah dan umum digunakan dalam uji aktivitas antibakteri. Terbentuknya zona bening di sekitar sumur dalam media padat menunjukkan bahwa ekstrak propolis yang digunakan memiliki potensi antibakteri kariogenik.

Berdasarkan analisis statistik, tidak dapat perbedaan secara nyata antara besar diameter zona bening yang terbentuk baik pada kultur bakteri yang ditambahkan ekstrak propolis 100% maupun pada propolis merk X. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa zat aktif yang terkandung baik dalam propolis merk X maupun ekstrak propolis 100% memiliki kemampuan yang sama dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans*. Namun secara matematis,

efektivitas ekstrak propolis terhadap propolis merk X sebesar 96,08%. Efektivitas ekstrak propolis terhadap propolis komersial yang diperoleh Anggraini (2006) sebesar 156,61% untuk *B. subtilis*, 142,70% untuk *S. aureus*, 136,24% untuk *E. coli*, dan 252,04% untuk *P. aeruginosa*. Oleh karena ekstrak propolis yang dipakai tersebut merupakan hasil pengenceran 1:1, maka potensinya sekitar kelipatan dua dari yang ada tersebut.

Perbedaan nilai disebabkan perbedaan sensitifitas tiap bakteri terhadap ekstrak dan perbedaan waktu pengumpulan propolis. Tiap jenis bakteri memiliki daya tahan terhadap senyawa aktif. Perbedaan ini disebabkan perbedaan penyusun dinding sel, keberadaan kapsul pelindung, dan kemampuan mendegradasi senyawa aktif tersebut.

Keragaman jenis tumbuhan asal resin merupakan faktor utama yang menimbulkan perbedaan komposisi senyawa kimia yang terdapat dalam propolis. Perbedaan komposisi senyawa kimia menimbulkan perbedaan warna dan aroma pada jenis propolis yang berbeda. Aroma yang tercium merupakan aroma senyawa aromatis yang bersifat volatil yang terkandung dalam propolis (Salatino 2005). Berdasarkan beberapa penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan komposisi senyawa propolis tergantung daerah asal propolis. Fakta ini diperkuat oleh hasil penelitian bahwa semua sampel propolis dari berbagai daerah asal menunjukkan aktivitas antibakteri meskipun terdapat perbedaan komposisi senyawa kimia (Bankova, 2005).

Efektivitas Penghambatan Ekstrak Propolis terhadap Ampisilin 10 mg/mL

Ampisilin telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri dalam spektrum yang luas, yaitu dapat menghambat bakteri Gram positif maupun Gram negatif (Siswandono 1995). Bakteri gram positif lebih sensitif terhadap antibiotik turunan penisilin ini (Siswandono 1995). Oleh karena itu, ampisilin digunakan sebagai kontrol positif.

Berdasarkan analisis statistik, diameter zona bening yang terbentuk oleh ekstrak propolis dengan ampisilin 10 mg/mL, berbeda nyata. Diameter zona bening yang terbentuk sebesar 12,75 mm untuk ekstrak propolis 100% dan 31,07 mm untuk ampisilin 10 mg/mL. Secara matematis, efektivitas propolis terhadap ampisilin dapat dihitung, yaitu sebesar 41,04%. Nilai efektifitas ekstrak propolis terhadap ampisilin 10 mg/mL memiliki nilai terkecil, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1. Hal tersebut menunjukkan bahwa daya hambat Ampisilin 10 mg/mL terhadap *S. mutans* lebih besar dibandingkan dengan ekstrak propolis.

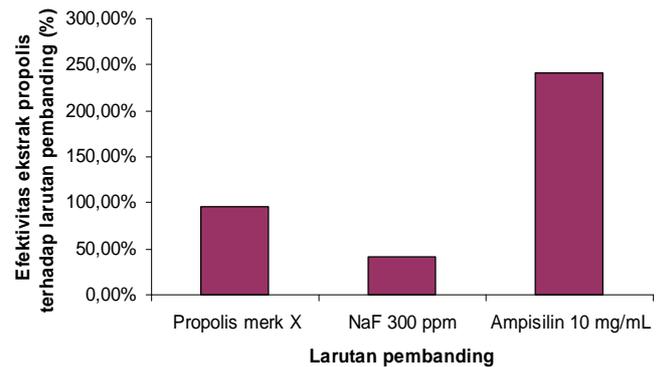
Efektivitas propolis yang diujikan oleh Anggraini (2006) terhadap ampisilin 10 mg/mL adalah sebesar 115,22% untuk *Bacillus subtilis*, 149,80% untuk *Staphylococcus aureus*, 109,03% untuk *Escherichia coli*, dan 144,64% untuk *Pseudomonas aeruginosa*. Nilai efektivitas tersebut berbeda karena perbedaan waktu koleksi propolis dan berbedanya tingkat sensitifitas tiap bakteri terhadap antibakteri. Sensitifitas ini meliputi resistensi suatu bakteri, sebagai contoh *S. aureus* memiliki enzim betalaktamase (Ganiswarna 1995). Enzim ini dapat menghidrolisis cincin betalaktam pada ampisilin sehingga *S. aureus* lebih tahan terhadap ampisilin dibandingkan dengan bakteri lain yang diujikan.

Berdasarkan analisis statistik, diameter zona bening ampisilin secara nyata paling besar dibandingkan dengan seluruh sampel yang diujikan.

Ampisilin merupakan antibiotik β -laktam dan termasuk ke dalam golongan penisilin semisintetik (Siswandono 1995). Mekanisme kerja antibakteri ampisilin yaitu menghambat pembentukan dinding sel bakteri dengan mencegah bergabungnya asam N-asetil muramat ke dalam struktur peptidoglikan. Penghambatan biosintetik peptidoglikan menyebabkan dinding sel lemah dan dinding sel dapat pecah karena tidak dapat menahan tekanan dari sitoplasma. Mekanisme kerja yang dimiliki ampisilin tersebut yang menyebabkan ampisilin memiliki daya antibakteri yang besar dan bersifat bakteriosidal

Mekanisme kerja ekstrak propolis belum dapat diketahui pasti dengan penelitian yang dilakukan. Berdasarkan uji fitokimia, baru diketahui golongan senyawa aktif dalam ekstrak propolis tetapi belum diketahui secara pasti senyawa aktifnya. Banyaknya golongan senyawa aktif yang terkandung dalam propolis namun jenis senyawa tersebut tidak diketahui secara pasti. Senyawa aktif tersebut dapat saja menghasilkan efek resultan yang saling mendukung (efek sinergisme) atau saling menghilangkan (antagonis). Hal tersebut dapat diketahui dengan melakukan penelitian lanjutan mengenai mekanisme kerja ekstrak propolis.

Dugaan mekanisme antibakteri propolis adalah dengan mengganggu permeabilitas membran sel, menginaktifkan protein, enzim, mengikat protein ekstraseluler dan protein integral dan menghambat sintesis dinding sel. Hal tersebut didasarkan mekanisme antibakteri secara umum terhadap bakteri dari senyawa aktif yang berhasil diidentifikasi dalam ekstrak propolis berdasarkan uji fitokimia. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Koo (2002) terhadap senyawa aktif dalam propolis, senyawa terpena (farnesol) dapat merusak fungsi membran sel sedangkan flavon dan flavonol efektif menghambat GTase pada *S. mutans*.



Gambar 1. Efektivitas ekstrak propolis 100% terhadap propolis merk X, NaF 3000 ppm, dan ampisilin 10 mg/mL

Oleh karena ekstrak propolis yang dipakai tersebut merupakan hasil pengenceran 1:1, maka potensinya sekitar kelipatan dua dari yang ada tersebut.

Efektivitas Penghambatan Ekstrak Propolis terhadap NaF 3000 ppm

Senyawa fluorida dapat mencegah demineralisasi gigi dan menghambat perkembangan bakteri kariogenik sehingga sering digunakan dalam pasta gigi sebagai antikaries (Lewis 2002). Sumber fluor yang umum digunakan dalam pasta gigi adalah senyawa natrium fluorida dan natrium monofluorofosfat. Konsentrasi NaF atau senyawa fluorida lain dalam pasta gigi berkisar 2500-8000 ppm.

Berdasarkan analisis statistik, diameter zona hambat NaF 3000 ppm dengan kontrol negatif (akuades, etanol 70%, dan propilen glikol) tidak berbeda nyata. Sedangkan, diameter zona bening kultur yang ditambahkan NaF 3000 ppm dengan ekstrak propolis 100% berbeda nyata. Diameter zona bening yang terbentuk sebesar 12,75 mm untuk ekstrak propolis 100% dan 5,30 mm untuk larutan NaF 3000 ppm. Secara matematis, efektivitas ekstrak propolis 100% terhadap NaF 3000 ppm yaitu sebesar 240,57%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa ekstrak propolis 100% memiliki aktifitas antibakteri yang lebih besar dibandingkan dengan NaF 3000 ppm. Hal tersebut diduga karena jumlah NaF yang ditambahkan terlalu sedikit sehingga sulit untuk merintang media padat yang mengandung *S. mutans*, sehingga jumlah bakteri yang beraksi langsung dengan NaF sangat kecil. Berdasarkan pemaparan tersebut, ekstrak propolis dapat dijadikan zat antikaries alternatif dalam pasta gigi pengganti NaF 3000 ppm. Oleh karena ekstrak propolis yang dipakai tersebut merupakan hasil pengenceran 1:1, maka potensinya sekitar kelipatan dua dari yang ada tersebut.

Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum (KHTM)

Penentuan Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum dilakukan untuk menentukan konsentrasi terendah ekstrak propolis yang masih menghambat pertumbuhan *S. mutans*. Parameter adanya penghambatan pertumbuhan pada *S. mutans* yaitu dengan mengukur diameter zona bening kultur bakteri pada media padat. Konsentrasi ekstrak propolis yang diujikan beragam antara 100% sampai dengan 1,56% (v/v). Berdasarkan data dan gambar 2 konsentrasi 6,25% merupakan nilai KHTM untuk ekstrak propolis. Artinya ekstrak propolis dengan konsentrasi 6,25% sudah dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans*. Namun secara statistik, ekstrak propolis 6,25% memiliki diameter zona bening yang tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif (akuades, propilen glikol, dan etanol 70%). Berdasarkan analisis statistik, ekstrak propolis 12,5% baru menunjukkan adanya penghambatan terhadap *S. mutans*.

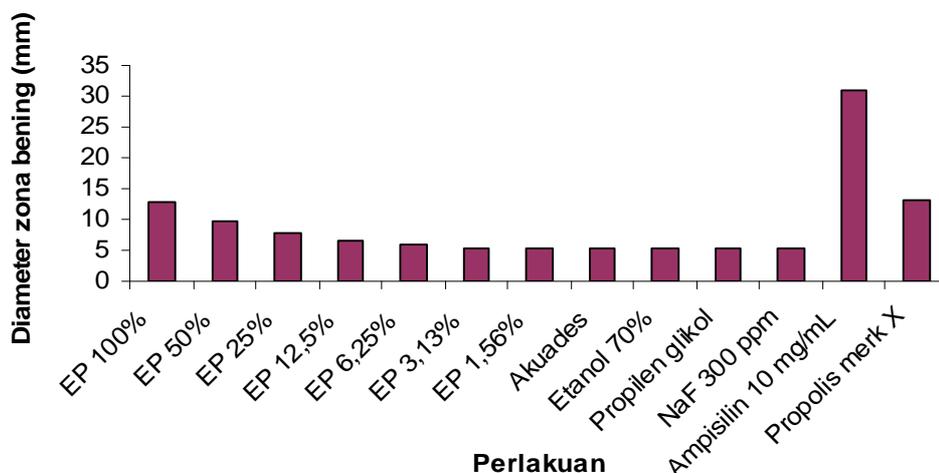
Nilai KHTM ekstrak propolis yang diperoleh Anggraini (2006) terhadap bakteri Gram positif yaitu sebesar 0,75% untuk *Bacillus subtilis* dan 0,39% untuk *Staphylococcus aureus*. Perbedaan nilai KHTM disebabkan sensitifitas bakteri terhadap zat antibakteri. Selain sifat bakteri uji, komposisi zat aktif yang berbeda dalam kedua ekstrak tersebut berdasarkan uji fitokimia menyebabkan perbedaan KHTM.

Nilai KHTM pada ekstrak daun teh variasi *Assamica* yang dilakukan oleh Yulia (2006) sebesar 0,5% pada bakteri *S. mutans*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Sosialisih (2002), nilai KHTM minyak atsiri daun sirih pada kultur *S. mutans* yaitu sebesar 0.1%. Kedua nilai KHTM tersebut lebih kecil dibandingkan dengan KHTM ekstrak propolis yang

didapat. Berdasarkan perbandingan nilai KHTM ketiga ekstrak tersebut, maka ekstrak propolis memiliki daya hambat terhadap *S. mutans* yang paling kecil. Perbedaan ini disebabkan berbedanya komposisi zat aktif pada kedua ekstrak tersebut. Zat aktif bersifat antibakteri yang paling penting dalam teh adalah senyawa tanin sedangkan menurut Grange (1990) zat antibakteri terpenting dalam propolis adalah golongan senyawa flavonoid dan asam kafeat. Berdasarkan analisis dengan kromatografi gas dengan spektrum massa yang dilakukan oleh Sosialisih (2002) senyawa terbanyak dalam sampel yang bersifat antibakteri dalam minyak atsiri daun sirih adalah kavikol dan eugenol.

Ketiga jenis pelarut yang digunakan (etanol 70%, propilen glikol, dan akuades) diuji aktifitas antibakterinya sebagai kontrol negatif. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui pengaruh pelarut terhadap penghambatan pertumbuhan kultur *S. mutans*. Metode yang digunakan sama seperti sampel yang lain, yaitu dengan teknik difusi sumur.

Hasil pengamatan pada metode difusi sumur menunjukkan bahwa ketiga pelarut tidak memberikan efek antibakteri dalam ekstrak propolis. Etanol sering digunakan sebagai antiseptik, namun hasil uji menunjukkan hasil negatif. Hal tersebut diduga jumlah etanol yang ditambahkan terlalu sedikit sehingga sulit untuk merintang media padat yang mengandung *S. mutans*, tidak demikian halnya jika menggunakan etanol 70% sebagai antiseptik. Etanol 70% dapat melakukan kontak langsung dengan bakteri sehingga bakteri dapat dibunuh. Oleh karena ekstrak propolis yang dipakai tersebut merupakan hasil pengenceran 1:1, maka potensinya KHTM merupakan sekitar setengahnya dari konsentrasi yang ada tersebut.



Gambar 2. Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum.

Jumlah Koloni

Metode hitungan cawan bersifat kuantitatif karena setiap sel yang dapat hidup di dalam media yang mengandung propolis diasumsikan akan berkembang menjadi satu koloni. Tiap bakteri memiliki tingkat sensitifitas terhadap antibakteri, termasuk ekstrak propolis, yang berbeda.

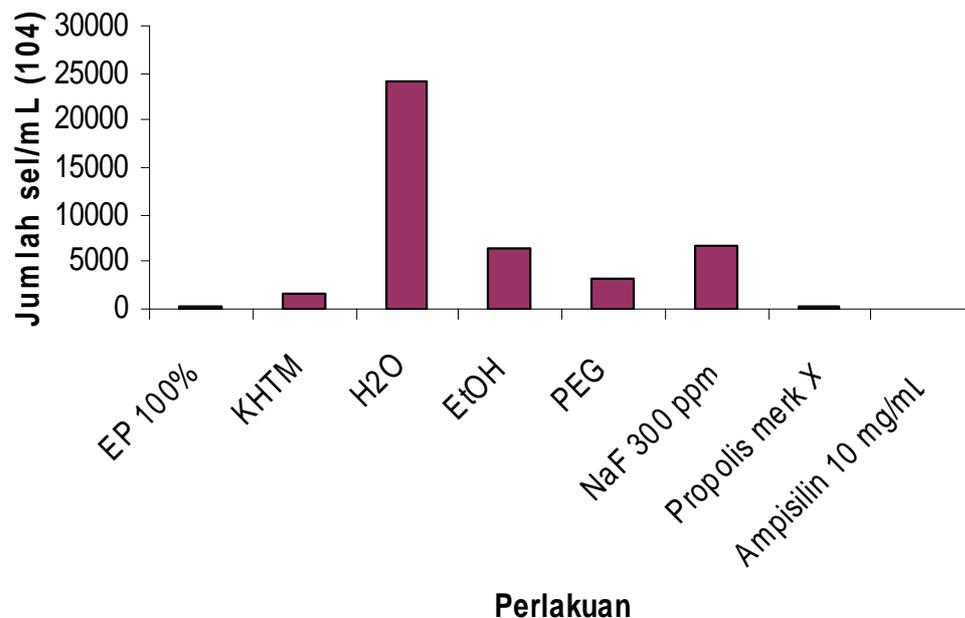
Gambar 3 memperlihatkan jumlah sel/mL yang dapat hidup setelah ditambahkan sampel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah sel/mL *S. mutans* yang ditambahkan ekstrak propolis 100%, propolis merk X, dan ampisilin 10 mg/mL. Ekstrak propolis 6,25% sudah mampu menurunkan jumlah sel/mL *S. mutans*. Hasil tersebut menunjang nilai KHTM ekstrak propolis yaitu pada konsentrasi 6,25%. Namun berdasarkan analisis statistik tidak terdapat penurunan jumlah sel/mL secara nyata dengan kontrol pelarut (etanol 70% dan propilen glikol).

Metode turbidimetri merupakan metode penunjang untuk menentukan jumlah sel/mL. Metode ini bersifat semikuantitatif karena kekeruhan kultur yang terjadi tidak hanya berasal dari sel yang hidup, tetapi sel bakteri yang mati juga dapat menyebabkan kekeruhan pada media cair. Parameter yang diukur dalam metode ini adalah kekeruhan atau absorbansi kultur bakteri. Semakin banyak *S. mutans* yang terdapat dalam media cair semakin besar nilai absorbansi kultur tersebut.

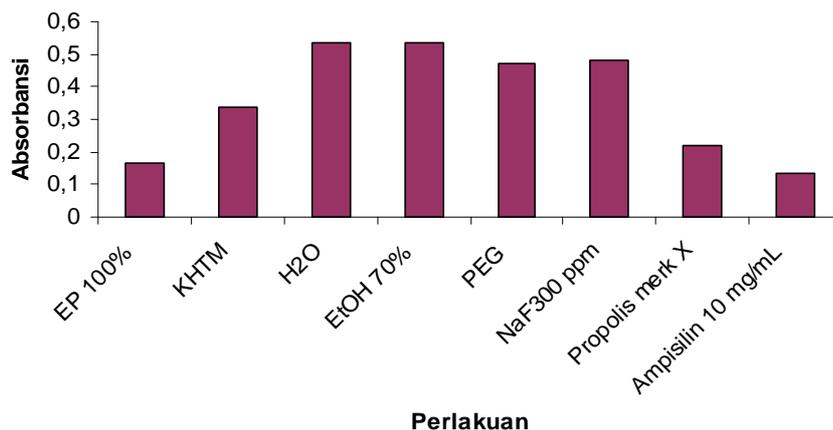
Gambar 4 menunjukkan bahwa, kultur *S. mutans* dengan penambahan ampisilin 10 mg/mL memiliki nilai absorbansi paling kecil yaitu sebesar 0,134 A. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ampisilin memiliki daya aktifitas antibakteri paling besar diantara sampel yang digunakan. Secara analisis statistik, hal ini diperkuat dengan data diameter zona bening terbesar dihasilkan oleh kultur *S. mutans* yang ditambah ampisilin 10 mg/mL.

Berdasarkan analisis statistik pada metode turbidimetri, nilai absorbansi kultur bakteri yang ditambahkan ekstrak propolis 100%, propolis merk X, ampisilin 10 mg/mL dan propolis saat KHTM lebih kecil dan berbeda nyata dengan kontrol negatif (akuades, etanol 70%, dan propilen glikol). Hasil tersebut menunjukkan bahwa ampisilin 10 mg/mL, etanol 70%, dan propolis merk X dapat menurunkan jumlah sel dalam media cair secara nyata. Oleh karena ekstrak propolis yang dipakai tersebut merupakan hasil pengenceran 1:1, maka jumlah koloninya merupakan sekitar setengahnya dari jumlah yang ada tersebut.

Berdasarkan analisis statistik, kultur bakteri dengan penambahan larutan NaF 3000 ppm tidak menunjukkan terjadinya penurunan jumlah *S. mutans* baik menurut metode hitungan cawan maupun turbidimetri. Hal tersebut menunjukkan bahwa larutan NaF 3000 ppm tidak bersifat antibakteri terhadap kultur *S. mutans*.



Gambar 3. Jumlah koloni dengan metode hitungan cawan.



Gambar 4. Absorbansi bakteri dengan metode turbidimetri.

KESIMPULAN

Ekstrak propolis dengan etanol dapat menghambat pertumbuhan bakteri kariogenik *S. mutans* dengan nilai Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum (KHTM) sebesar 1,13%. Ekstrak propolis dapat dijadikan zat antikaries alternatif dalam pasta gigi. Ekstrak propolis 100%, propolis merk X, dan ampisilin 10 mg/mL dapat menurunkan jumlah koloni *S. mutans* berdasarkan metode turbidimetri. Berdasarkan uji fitokimia ekstrak propolis mengandung senyawa flavonoid, triterpenoid, tanin, alkaloid, minyak atsiri, dan saponin.

DAFTAR PUSTAKA

- Angraini AD. 2006. Potensi propolis lebah madu *Trigona* spp. sebagai bahan antibakteri [Skripsi]. Bogor: Program Studi Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Anonim 2002. Dental caries. http://en.wikipedia.org/wiki/Dental_caries [27 Januari 2007].
- Ashurst. 1995. *Flavouring*. New York: Blackie Academic & Profesional.
- Bankova V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *eCAM* 2: 29-32.
- Beighton D, William AM. 1977. A microbiological study of normal flora of macropod dental plaque. *J Dent Res* 56:995-1000.
- Chinthapally V, Rao, Valhalla NY. 1993. Propolis. *Medical journal* 53:1482-1488.
- Coykendall AL. 1989. Classification and identification of the viridian streptococci. *Clinical Microbiology Reviews* 2 : 315-327.
- Dharmayanti NLP, Sulistyowati E, Tejolaksono MN, Prasetya R. 2000. Efektifitas pemberian propolis lebah dan royal jelly pada abses yang disebabkan *Staphylococcus aureus*. *Berita Biologi* Vol 5: 41-48.
- Fardiaz S. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Bogor: PAU Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.
- Fearnly J. 2005. *Bee Propolis: Natural Healg from The Hive*. London: Souvenir.
- Free JB. 1982. *Bees and Mankind*. London: George Allen & Unwin.
- Ganiswarna SG *et al.* 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: UI.
- Gojmerac WL. 1983. *Bee, beekeeping, Honey and Pollination*. Westport: Avi.
- Grange JM, Davey RW. 1990. Antibacteria of propolis (bee glue). *Journal of The Royal Society of Medicine* 83: 159-160.
- Hadioetomo. 1990. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta: Gramedia.
- Hamada S, Slade HH. 1980. Biology, Immunology and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Review* 44:331-384.
- Hardie JM, Whiley RA. 1991. *The Genus of Streptococcus oral*. Ed ke-2 Balows A *et al* editor. New York: Springer Verlag.
- Harbone HB. 1987. *Metode Fitokimia I*. Ed ke-2 Padmawinat K, penerjemah. Bandung: ITB. Terjemahan dari *Phytochemical methode*.
- Hasan, 2007. Ekstraksi Propolis *Trigona* spp. Dokumen Paten.
- Hegazi AG, Faten KA. 2002. Egyptian propolis: 3 antioxidant, antimicrobial, activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Z. Naturforsch* 57c: 395-402.
- Koo H *et al.* 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity *Antimicrob Agents Chemother* 6: 1302-1309.
- Lewis CW, Peter M. 2003. Fluoride. *Pediatrics in Review* 24: 327-336.
- Mantienzo AC, Lamorena M. 2004. Extraction And initial characterization of Propolis from stingless Bees (*Trigona Biro Fries*). Di dalam *Proceeding of 7th Asian Apicultural Association*

- Conference and 10th BEENET Symposium And Technofora Los Banos, 23-27 Februari 2004. Los Banos: Univ Philippines.
- Mattjik AA, Sumertajaya M. 2000. *Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab Jilid I*. Bogor: IPB Press.
- Murphy MC. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev*. 12: 564-582l.
- Nelli. 2004. Waktu pencarian serbuk sari lebah pekerja *Trigona* (Apidae: Hymenoptera) [skripsi]. Bogor: Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Pelczar MJ, Chan ESC. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi* 2. Penerjemah Ratna SH, Universitas Indonesia, Jakarta
- Perum Perhutani Unit Jawa Timur. 1986. Peningkatan kesejahteraan masyarakat `Melalui pelebahan. Di dalam: *Pembudidayaan Lebah Madu untuk Peningkatan Kesejahteraan Masyarakat*. *Prosiding Lokakarya*; Sukabumi, 20-22 Mei 1986. Jakarta: Perum Perhutani. Hlm 293-302.
- Rusiawato Y. 1991. Diet yang dapat merusak gigi pada anak-anak. *Cermin Dunia Kedokteran*, 73: 45-47.
- Salatino A, Erica WT, Giuseppina N, Dejair M. 2005. Origin and chemical variation of brazilian propolis. *Evid Base Complement Alternat Med*, 2: 33-38.
- Singh S. 1962. *Beekeeping in India*. New Delhi: Indian Council Agricultural Research.
- Siswandono, Soekarhjo B. 1995. *Kimia Medisinal*. Airlangga. Surabaya
- Situmorang N. 2004. Dampak karies dan penyakit periodontal terhadap kualitas Hidup, studi di dua kecamatan kota Medan [abstrak]. Jakarta: Program Pascasarjan Ilmu Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia.
- Sosialisih L. 2002. Penambahan vitamin E dan ditergen terhadap sifat fisik dan daya antibakteri pasta gigi minyak atsiri daun sirih [skripsi]. Bogor: Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Sumoprastowo RM, Agus S. 1980. *Beternak Lebah Madu Modern*. Jakarta: Bharatara Karya Aksara.
- Sundari, Koesomardijah, Nusratini. 1991. Minyak atsiri dalam pasta gigi stabilitas fisis dan antibakteri. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 1:5-6.
- Suradikusumah E. 1989. *Kimia Tumbuhan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Teixera EC *et al*. 2005. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2: 85-92.
- Walter JL. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *American Society for Microbiology* Vol ke, 50: 353-370.
- Woo KS. 2004. Use of bee venom and Propolis for apitherapi in Korea. Di dalam *Proceeding of 7th Asian Apicultural Associatio Conference and 10th BEENET Symposium and Technofora*; Los Banos, Februari 2004. Los Banos: Univ Philippines.
- Yulia R. 2006. Kandungan tanin dan potensi antibakteri *Streptococcus mutans* daun teh var. *Assamica* pada berbagai tahap pengolahan. [skripsi]. Bogor Program Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Yuyus R, Magdarina DA, Sintawati F. 2002. Karies gigi pada anak batita di 5 wilayah DKI tahun 1993. *Cermin Dunia Kedokteran*, 134: 39-42.