

Aktivitas antibakteri flavonoid propolis *Trigona* sp terhadap bakteri *Streptococcus mutans* (in vitro)

(In vitro antibacterial activity of flavonoids *Trigona* sp propolis against *Streptococcus mutans*)

Ardo Sabir

Bagian Konservasi Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin
Makassar - Indonesia

ABSTRACT

A number of investigations have shown a positive correlation between the number of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) in dental plaque and the prevalence of dental caries. Consequently, this microorganism has been the prime target for the prevention of dental caries. Propolis being a substance made by the honeybee, is a potent antibacterial agent. The main chemical class present in propolis is flavonoids. Flavonoids are well-known plant compounds that have antibacterial property. Because *S. mutans* is accepted to be one of the microorganisms responsible for dental caries and flavonoids in propolis are antibacterial, the purpose of this study was to evaluate in vitro the antibacterial activity of flavonoids *Trigona* sp propolis against *S. mutans* as a first step in its possible use as an alternative anticaries agent. Extract flavonoids was purified from ethanol extract of propolis which was obtained from Bulukumba Regency South Sulawesi using thin layer chromatography. The purification of flavonoids was carried-out by UV-radiation at λ_{max} 254 nm and λ_{max} 366 nm and treatment with ammonia. Extract flavonoids was diluted in aquadest to 0.05%; 0.075%; 0.1%; 0.25%; 0.5%; 0.75% concentrations. Aquadest and 10% Povidone iodine were also used as control solution. *S. mutans* were grown in medium glucose nutrient agar and incubated with flavonoids for 24 and 48 hours, at 37° C. Antibacterial activity was reflected by the diameter of the inhibition zones around the stainless steel cylinder. The data were analyzed by using ANOVA followed by LSD test with significance level of 5%. The results of this study showed that after being incubated for 24 and 48 hours, all flavonoid concentrations significantly ($p < 0.05$) inhibited the growth of *S. mutans*. 0.1% flavonoid was the most effective concentration to inhibit the growth of *S. mutans* after 24 hours of incubation and 0.5% flavonoid after 48 hours of incubator.

Key words: antibacterial activity, flavonoids, propolis, *Streptococcus mutans*

Korespondensi (correspondence): Ardo Sabir, Bagian Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin. Jln. Kande 5 Makassar, Indonesia.

PENDAHULUAN

Seiring perkembangan zaman, maka masalah kesehatan khususnya kesehatan gigi dan mulut semakin lama makin meningkat pula. Hal ini disebabkan timbulnya penyakit gigi dan mulut dipengaruhi oleh berbagai faktor yang saling berinteraksi satu dengan lainnya yakni faktor pendidikan, status sosial, penghasilan, pola makan, pekerjaan, bahkan budaya manusia itu sendiri.¹ Penyakit karies gigi dan penyakit periodontal merupakan dua penyakit gigi dan mulut yang paling sering ditemukan di klinik gigi dan merupakan penyebab utama hilangnya gigi di dalam rongga mulut.² Berdasarkan survei kesehatan gigi yang dilakukan oleh Direktorat Kesehatan Gigi Departemen Kesehatan RI pada tahun 1994, ternyata selama PELITA ke-V jumlah masyarakat yang berkunjung maupun pasien yang dirujuk ke rumah sakit karena menderita penyakit gigi dan mulut akibat karies gigi menduduki jumlah terbesar yaitu 53,05%, sedangkan penyakit periodontal menduduki tempat kedua yaitu sebanyak 28,32%.³

Karies gigi merupakan suatu penyakit infeksi yang dapat menular dan terutama mengenai jaringan keras gigi, sehingga terjadi kerusakan jaringan keras setempat. Proses terjadinya kerusakan pada jaringan keras gigi melalui suatu reaksi kimiawi oleh bakteri, dimulai dengan proses kerusakan pada bagian anorganik, kemudian berlanjut pada bagian organik.⁴ Bakteri berperan penting pada proses terjadinya karies gigi, karena tanpa adanya bakteri maka karies gigi tidak dapat terjadi. Terdapat berbagai spesies bakteri yang berkoloni di dalam rongga mulut khususnya pada plak gigi dan bakteri tersebut mampu menghasilkan asam sehingga terjadi proses demineralisasi jaringan keras gigi.⁵

Salah satu spesies bakteri yang dominan dalam mulut yaitu bakteri *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Jenis bakteri ini diketahui merupakan bakteri penyebab utama timbulnya karies gigi.⁵ Telah banyak penelitian yang membuktikan adanya korelasi positif antara jumlah bakteri *S. mutans* pada plak gigi dengan prevalensi karies gigi,⁴ hal ini disebabkan beberapa karakteristik dari bakteri *S. mutans*⁶ yaitu mampu mensintesis polisakarida

ekstraseluler glukosa ikatan α (1–3) yang tidak larut dari sukrosa, dapat memproduksi asam laktat melalui proses homofermentasi, membentuk koloni yang melekat dengan erat pada permukaan gigi, dan lebih bersifat asidogenik dibanding spesies *Streptococcus* lainnya. Oleh karena itu bakteri ini telah menjadi target utama dalam upaya mencegah terjadinya karies gigi.

Telah banyak dilakukan penelitian dengan memanfaatkan bahan alam yang kesemuanya bertujuan untuk menghasilkan obat-obatan dalam upaya mendukung program pelayanan kesehatan gigi, khususnya untuk mencegah dan mengatasi penyakit karies gigi. Kembalinya perhatian ke bahan alam yang dikenal dengan istilah *back to nature* ini dianggap sebagai hal yang sangat bermanfaat karena sejak dahulu kala masyarakat kita telah percaya bahwa bahan alam mampu mengobati berbagai macam penyakit. Selain itu, pemanfaatan bahan alam yang digunakan sebagai obat jarang menimbulkan efek samping yang merugikan dibandingkan obat yang terbuat dari bahan sintetis.⁷

Madu merupakan salah satu produk alam yang dihasilkan oleh lebah yang telah lama dikenal dan dimanfaatkan di Indonesia karena khasiatnya dalam menyembuhkan berbagai macam penyakit. Namun demikian, ternyata lebah juga menghasilkan produk lain seperti *royal jelly*, *pollen*, venom, dan propolis. Setiap produk lebah tersebut mempunyai fungsi dan manfaat yang berbeda bagi kesehatan manusia.⁸

Propolis atau lem lebah merupakan suatu bahan resin yang dikumpulkan oleh lebah madu dari berbagai macam jenis tumbuhan.^{9,10} Salah satu jenis lebah yang mampu menghasilkan propolis dalam jumlah banyak yaitu jenis *Trigona sp.* Jenis lebah ini banyak dijumpai di propinsi Sulawesi Selatan baik didataran tinggi maupun dataran rendah, namun demikian propolis yang dihasilkan pemanfaatannya belum optimal oleh karena penelitian yang dilakukan masih terbatas.⁸ Namun demikian, di luar negeri, penelitian terhadap propolis telah banyak dilakukan baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dan hasilnya menunjukkan bahwa propolis memiliki beberapa aktivitas biologis dan farmakologis antara lain bersifat antibakteri baik terhadap bakteri Gram positif^{11–13} maupun Gram negatif.¹⁴ Aktivitas antibakteri propolis yang sangat bervariasi ini lebih disebabkan komposisi dari propolis yang digunakan. Komposisi propolis sendiri sangat dipengaruhi oleh jenis dan umur tumbuhan, iklim, dan waktu di mana propolis tersebut diperoleh.^{15,16}

Salah satu kandungan senyawa kimia yang penting pada propolis adalah senyawa flavonoid.⁹ Flavonoid merupakan salah satu senyawa fenol alami yang tersebar luas pada tumbuhan, yang disintesis dalam jumlah sedikit (0,5–1,5%)¹⁷ dan dapat ditemukan pada hampir semua bagian tumbuhan.¹⁸ Penelitian secara *in vitro* maupun *in vivo* menunjukkan aktivitas biologis dan farmakologis dari senyawa flavonoid sangat beragam,¹⁹ salah satu diantaranya yakni memiliki aktivitas antibakteri.^{20,21} Walau demikian, penelitian untuk mengetahui pengaruh

flavonoid propolis *Trigona sp* terhadap bakteri *S. mutans* belum pernah dilakukan.

Berdasarkan uraian di atas maka timbul suatu permasalahan yaitu bagaimana pengaruh flavonoid yang terdapat pada propolis *Trigona sp* terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans* secara *in vitro*, sehingga tujuan penelitian ini adalah untuk melihat aktivitas antibakteri flavonoid yang terdapat pada propolis *Trigona sp* terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans* secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris, dan dilakukan di dua tempat yakni: laboratorium Galenika, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta untuk proses ekstraksi flavonoid dari propolis *Trigona sp* dan laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Hasanuddin, Makassar untuk menentukan konsentrasi hambat minimal (KHM) dan uji aktivitas antibakteri dari flavonoid terhadap bakteri *S. mutans*.

Proses ekstraksi senyawa flavonoid dari propolis *Trigona sp* dilakukan dengan cara:²² ditimbang propolis sebanyak 1 kg, kemudian dimasukkan ke dalam maserator berpengaduk elektrik. Lima liter etanol 95% ditambahkan sebagai pelarut. Maserasi dilakukan dengan pengadukan sebanyak 12 kali selama 15 menit dengan tenggang waktu 5 menit antar pengadukan, dilanjutkan dengan perendaman selama 120 jam, selanjutnya dilakukan penyaringan dengan corong dan kertas saring untuk memisahkan filtrat dari ampas ke dalam labu *Erlenmeyer* sehingga diperoleh filtrat $\pm 2,5$ liter. Filtrat diuapkan di atas cawan porselin sehingga kandungan etanolnya menguap dan diperoleh ekstrak yang konsistensinya kental (± 100 g). Ekstrak kental tersebut kemudian dituang ke dalam labu *Erlenmeyer* dan ditambahkan 500 ml larutan toluena, lalu diaduk sehingga semua ekstrak larut. Larutan air : etanol = 2 : 1 (v/v) sebanyak 1,5 liter ditambahkan ke labu *Erlenmeyer* yang berisi larutan ekstrak dalam toluena, kemudian diaduk hingga homogen dan didiamkan selama 24 jam.

Setelah 24 jam, larutan dipindahkan ke dalam corong pemisah dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Melalui corong pemisah, larutan bagian bawah ($\pm 1,5$ liter) dipisahkan dan diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kental yang merupakan fraksi flavonoid polar (± 17 g). Lapisan atas (± 500 ml) yang berada pada corong pemisah merupakan larutan toluena ditambah 1,5 liter larutan etanol : air = 2 : 1 (v/v), diaduk hingga homogen dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan bagian bawah (fraksi flavonoid semipolar) diuapkan sampai diperoleh ekstrak dengan konsistensi kental seberat ± 1 g, sedangkan lapisan bagian atas (fraksi non flavonoid) menghasilkan ekstrak yang konsistensinya kental seberat ± 100 g setelah diuapkan.

Tahap berikutnya adalah analisis kimia menggunakan teknik kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam

lempeng silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak larutan n-butanol : asam asetat : air = 3 : 1 : 1 (v/v) untuk mengetahui apakah kedua ekstrak flavonoid (polar dan semipolar) yang diperoleh tidak mengandung unsur lain, selain senyawa flavonoid. Kedua ekstrak flavonoid yang telah dilarutkan dengan alkohol, diteteskan dengan pipet kapiler pada lempeng silika berukuran 10 cm × 4 cm dan dimasukkan ke bejana pengembang yang berisi fase gerak. Setelah daya kapiler dari kedua ekstrak telah maksimal, lempeng dikeringkan, kemudian dilihat di bawah lampu ultraviolet sebelum dan setelah diuapi dengan amoniak.

Penentuan konsentrasi hambat minimal (KHM) ekstrak flavonoid propolis *Trigona* sp terhadap bakteri *S. mutans* diawali dengan membuat ekstrak flavonoid dalam beberapa konsentrasi yaitu 0,05%; 0,075%; 0,1%; 0,25%; 0,5%; dan 0,75%, dengan cara: untuk konsentrasi 0,75%, ekstrak flavonoid ditimbang seberat 0,075 g. Setelah ditimbang ekstrak kemudian dilarutkan dengan *aquades* steril dalam lumpang hingga mencapai volume 10 ml, setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur, begitu pula untuk membuat konsentrasi lainnya. Masing-masing sampel dimasukkan ke dalam botol yang berbeda, kemudian ditutup dengan menggunakan kapas dan *aluminium foil*, selanjutnya dibuat medium *nutrient agar* (NA) yang komposisinya: ekstrak ragi 3 g, pepton 5 g, agar 15 g, dan *aquades* 1000 ml dibuat sebanyak 250 ml pada labu *Erlenmeyer*. Medium ini kemudian dipanaskan sampai seluruh bahan larut, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121° C. Setelah steril, medium dimiringkan dan ditunggu sampai memadat. Bakteri *S. mutans* diambil dengan menggunakan ose lalu digoreskan pada medium NA miring dan diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37° C. Medium NA yang berisi bakteri *S. mutans* kemudian disuspensikan dengan menggunakan NaCl 0,9 %.

Setelah itu dibuat medium *nutrient broth* (NB) dengan komposisi: ekstrak ragi 3 g, pepton 5 g, dan *aquades* steril 1000 ml dibuat sebanyak 250 ml di dalam gelas kimia. Medium ini dimasukkan ke dalam 8 tabung reaksi masing-masing 5 ml, kemudian disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121° C. Tabung reaksi tersebut kemudian dibiarkan dingin. Tahap selanjutnya adalah pada 6 dari 8 tabung reaksi dimasukkan biakan bakteri *S. mutans* sebanyak 0,02 ml dan diaduk hingga homogen kemudian ditambahkan 5 ml dari setiap konsentrasi flavonoid, sedangkan pada 2 tabung reaksi lainnya masing-masing diisi dengan flavonoid konsentrasi terendah (0,05%) dan konsentrasi tertinggi (0,75%) sebagai kontrol. Semua tabung reaksi diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37° C, setelah masa inkubasi, dilakukan pemeriksaan ada/tidaknya pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

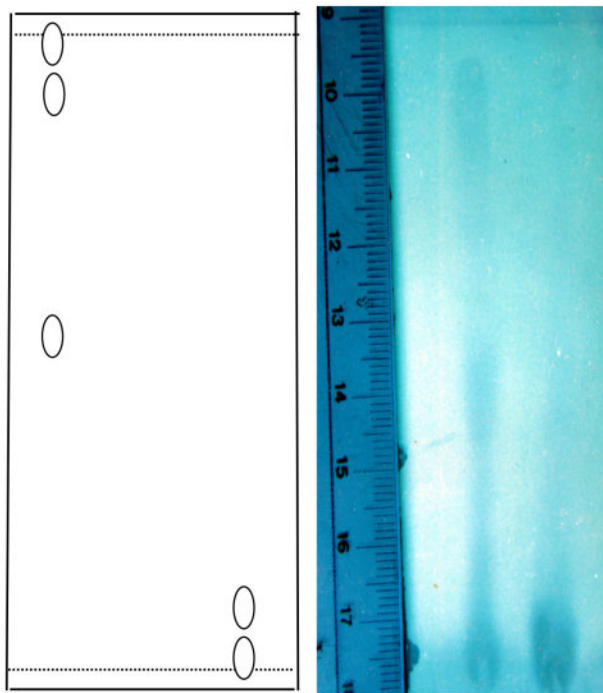
Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri ekstrak flavonoid propolis *Trigona* sp terhadap bakteri *S. mutans* adalah metode difusi agar. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan cara mengambil sampel satu konsentrasi di bawah KHM, semua konsentrasi di atas

KHM, kontrol positif, dan Kontrol negatif. Adapun prosesnya adalah sebagai berikut, medium *glucose nutrient agar* (GNA) dengan komposisi: glukosa 10 g, ekstrak ragi 5 g, pepton 10 g, NaCl 2,5 g, agar 15 g, dan *aquades* steril 1000 ml dibuat sebanyak 300 ml di dalam labu *Erlenmeyer*. Medium ini kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan dibuat menjadi 2 lapisan dengan ketebalan yang hampir sama ($\pm 0,5$ cm). Lapisan pertama dibiarkan pada temperatur kamar ± 20 menit hingga mengeras, setelah itu dibuat lapisan kedua yang sebelumnya telah dicampurkan dengan biakan bakteri *S. mutans* sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam cawan petri. Sebelum lapisan kedua mengeras, ditempatkan 7 silinder *stainless steel* (diameter luar 8 mm dan diameter dalam 6 mm) pada cawan petri, 5 untuk masing-masing sampel konsentrasi flavonoid, 1 untuk kontrol negatif (*aquades* steril), dan 1 untuk kontrol positif (*povidone iodine* 10%). Pada silinder tersebut kemudian diisi dengan larutan sampel dan Kontrol dengan menggunakan spuit, selanjutnya, cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam pada temperatur 37° C. Pengukuran diameter dari setiap *zone* inhibisi pertumbuhan bakteri yang terjadi di sekeliling selinder dilakukan dengan menggunakan jangka sorong setelah 24 jam dan 48 jam masa inkubasi. Prosedur ini dilakukan dengan replikasi sebanyak 3 kali terhadap bakteri *S. mutans*. *Zone* inhibisi adalah jarak terdekat (mm) dari tepi luar selinder hingga mulai terjadinya pertumbuhan bakteri.²³

Data yang diperoleh merupakan hasil pengamatan secara laboratorium yang selanjutnya dianalisis dengan menggunakan statistik parametrik yaitu uji *One-way ANOVA*. Bila hasil uji *ANOVA* tersebut menunjukkan hasil yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD). Sementara untuk mengetahui ada/tidaknya interaksi antara lama waktu kontak dengan konsentrasi flavonoid maka dilakukan uji *Two-way ANOVA*.

HASIL

Hasil proses ekstraksi senyawa flavonoid dari propolis *Trigona* sp diperoleh 3 macam ekstrak kental yang masing-masing merupakan fraksi flavonoid polar, fraksi flavonoid semi polar, dan fraksi non flavonoid dengan berat berturut-turut 17 g, 1 g, dan 100 g. Hasil analisis dengan teknik kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan bahwa pengamatan di bawah sinar UV λ_{maks} 254 nm ternyata pada fraksi flavonoid semi polar terdapat 3 bercak, sedangkan pada fraksi flavonoid polar 2 bercak (gambar 1). Kelima bercak tersebut kemudian diberi tanda. Pengamatan terhadap bercak di bawah sinar UV λ_{maks} 366 nm, menunjukkan bahwa kelima bercak tersebut berfluoresensi (gambar 1). Hal ini membuktikan bahwa tidak terdapat senyawa lain, selain senyawa flavonoid pada kedua ekstrak fraksi flavonoid tersebut.



A B

Gambar 1. Hasil kromatografi lapis tipis fraksi flavonoid polar dan semipolar dari propolis *Trigona sp.* A: fraksi flavonoid semi polar; B: fraksi flavonoid polar; fase diam: silika gel GF₂₅₄; fase gerak: n butanol: asam asetat : air = 3 : 1 : 1 (v/v); identifikasi bercak: sinar UV λ_{maks} 366 nm; pereaksi: uap amoniak.

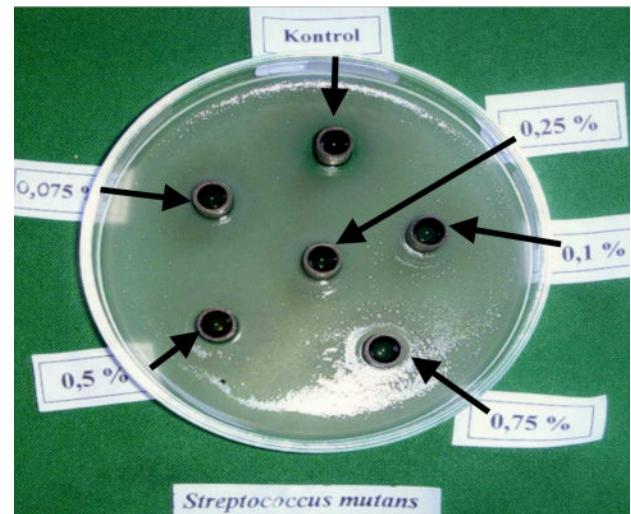
Penilaian uji konsentrasi hambat minimal (KHM) ekstrak flavonoid propolis *Trigona sp* terhadap bakteri *S. mutans* berdasarkan tingkat kekeruhan yang terjadi pada tabung reaksi yang berisi medium NB dan bakteri *S. mutans*. Hasil uji KHM menunjukkan bahwa KHM ekstrak flavonoid propolis *Trigona sp* terhadap bakteri *S. mutans* adalah 0,1%. Hal ini disebabkan flavonoid 0,1% merupakan konsentrasi flavonoid terkecil yang masih dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans*, yang ditandai dengan warna jernih pada tabung reaksi.

Setelah KHM diperoleh, maka dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri. Hasil pengamatan aktivitas antibakteri flavonoid propolis *Trigona sp* terhadap *S. mutans* setelah inkubasi selama 24 jam dan 48 jam pada temperatur 37° C dapat dilihat pada gambar 2.

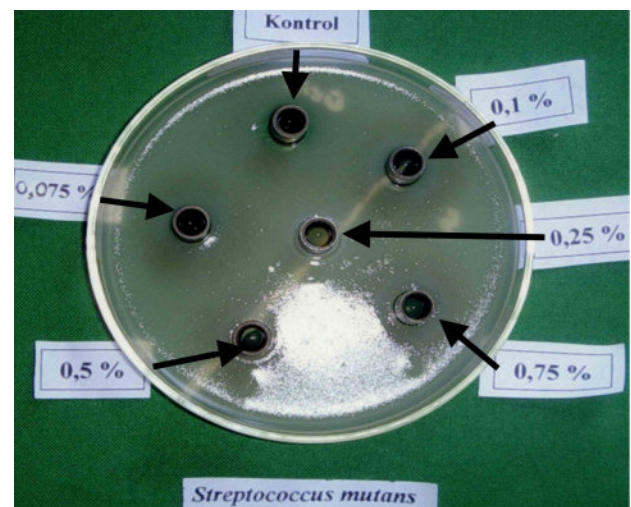
Pada gambar 2 terlihat bahwa 24 jam dan 48 jam setelah inkubasi terlihat adanya *zone* inhibisi di sekitar selinder baik yang berisi berbagai konsentrasi ekstrak flavonoid propolis *Trigona sp* maupun pada selinder yang berisi *Povidone iodine* 10% (kontrol positif).

Rerata hasil pengukuran terhadap diameter *zone* inhibisi yang telah dilakukan pada setiap kelompok setelah inkubasi 24 jam dan 48 jam diperoleh bahwa semakin lama

waktu kontak antara flavonoid dengan bakteri *S. mutans* maka diameter *zone* inhibisi yang terjadi juga semakin besar demikian pula dengan kontrol positif, kecuali kontrol negatif, sedangkan pada pengamatan 48 jam setelah masa inkubasi menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi flavonoid maka *zone* inhibisi yang terjadi semakin luas.



A



B

Gambar 2. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak flavonoid propolis *Trigona sp* dengan konsentrasi 0,075%; 0,1%; 0,25%; 0,5%; 0,75%; dan kontrol positif terhadap pertumbuhan *S. mutans* pada temperatur 37° C setelah inkubasi; (A) 24 jam, (B) 48 jam.

Untuk mengetahui ada/tidaknya perbedaan yang signifikan antarkelompok, maka dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji *One-way ANOVA* yang hasilnya tampak pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji *One-way ANOVA* jalur diameter *zone* inhibisi antara kelompok

A					
	JK	Db	RK	F	Sig F
Antar kelompok	271,832	6	45,305	787,920	0,001*
Dalam kelompok	0,805	14	5,750E-02		
Jumlah	272,637	20			
B					
	JK	Db	RK	F	Sig F
Antar kelompok	609,321	6	101,554	546,127	0,001*
Dalam kelompok	2,603	14	0,186		
Jumlah	611,925	20			

Keterangan:

JK = jumlah kuadrat; Db = derajat bebas; RK = rerata kuadrat; F = F hitung; * = signifikan pada $p < 0,001$ (A) 24 jam, (B) 48 jam.

Oleh karena hasil uji *One-way ANOVA* di atas menunjukkan adanya perbedaan diameter *zone* hambat yang signifikan ($p < 0,001$) antara semua kelompok setelah masa inkubasi 24 jam dan 48 jam, maka dilakukan analisis lebih lanjut dengan menggunakan uji *Least Significant Difference (LSD)* yang hasilnya tampak pada tabel 2.

Pada tabel 2 terlihat bahwa pada pengamatan 24 jam, terdapat perbedaan yang signifikan antara kontrol negatif dan flavonoid 0,075% dengan kelompok lainnya, sebaliknya tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara flavonoid 0,1%; 0,25%; 0,5%; 0,75%, dan kontrol positif. Sementara pada pengamatan 48 jam, selain terdapat perbedaan yang signifikan antara kontrol negatif dan flavonoid 0,25% dengan kelompok lainnya, dan antara flavonoid 0,075% dengan kelompok flavonoid 0,25%; 0,5%; 0,75%; dan kontrol negatif, juga terdapat perbedaan yang signifikan antara flavonoid konsentrasi 0,5% dengan semua kelompok, kecuali dengan flavonoid 0,75%.

Untuk mengetahui ada/tidaknya interaksi antara lama waktu inkubasi dengan konsentrasi flavonoid, maka dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji *Two-way ANOVA*, yang hasilnya dapat dibaca pada tabel 3. Pada tabel 3 tampak bahwa terdapat interaksi antara lama waktu kontak dengan konsentrasi flavonoid propolis *Trigona* sp.

Tabel 3. Hasil uji *Two-way ANOVA* mengenai interaksi antara lama waktu kontak dengan konsentrasi flavonoid

	JK	Db	RK	F	Sig F
Hari	157,567	1	157,567	1294,440	0,001*
Konsentrasi	831,109	6	138,518	1137,948	0,001*
Hari*konsentrasi	50,045	6	8,341	68,521	0,001*

Keterangan:

JK = jumlah kuadrat; Db = derajat bebas; RK = rerata kuadrat; F = F hitung; * = signifikan pada $p < 0,001$.

PEMBAHASAN

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini berupa ekstrak hasil ekstraksi yang mengandung seluruh jenis senyawa flavonoid yang terdapat pada propolis *Trigona* sp. Propolis *Trigona* sp dikumpulkan dari sarang lebah yang terdapat di Kabupaten Bulukumba propinsi Sulawesi Selatan. Ekstrak flavonoid hasil ekstraksi selanjutnya dianalisis dengan menggunakan teknik kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengetahui tingkat kemurnian atau purifikasi dari ekstrak. Pemilihan teknik KLT didasarkan atas beberapa alasan, yakni teknik ini hanya memerlukan cuplikan dalam jumlah sedikit, waktu yang dibutuhkan untuk menganalisis cuplikan relatif singkat, alat yang digunakan cukup sederhana dan mudah diperoleh, biaya yang dibutuhkan relatif ekonomis, dan yang penting adalah memberikan hasil pemisahan yang memuaskan baik antara flavonoid itu sendiri, maupun antara flavonoid dengan senyawa lainnya.^{24,25}

Para peneliti menyatakan pendapat yang berbeda-beda sehubungan dengan mekanisme kerja dari flavonoid dalam

Tabel 2. Hasil uji *LSD* mengenai diameter *zone* inhibisi antar kelompok setelah inkubasi 24 dan 48 jam

	24 jam	Kontrol Negatif	Flavonoid					Kontrol Positif
			0,075%	0,1%	0,25%	0,5%	0,75%	
48 jam								
Kontrol Negatif		–	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
Flavonoid 0,075%		0,001*	–	0,001*	0,002*	0,004*	0,003*	0,001*
Flavonoid 0,1%		0,001*	0,315	–	0,148	0,060	0,082	0,324
Flavonoid 0,25%		0,001*	0,001*	0,001*	–	0,617	0,739	0,617
Flavonoid 0,5 %		0,001*	0,001*	0,001*	0,023*	–	0,867	0,324
Flavonoid 0,75%		0,001*	0,001*	0,001*	0,012*	0,745	–	0,409
Kontrol Positif		0,001*	0,177	0,711	0,000*	0,001*	0,001*	–

Keterangan: * = signifikan pada $p < 0,05$

menghambat pertumbuhan bakteri, antara lain bahwa flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri,^{26,27} sementara Mirzoeva *et al.*²¹ dalam penelitiannya mendapatkan bahwa flavonoid mampu melepaskan energi transduksi terhadap membran sitoplasma bakteri selain itu juga menghambat motilitas bakteri. Mekanisme yang berbeda dikemukakan oleh Di Carlo *et al.*²⁸ dan Estrela *et al.*²⁹ yang menyatakan bahwa gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transpor nutrisi yang akhirnya akan mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri.

Hasil dari uji konsentrasi hambat minimal memperlihatkan nilai KHM yang diperoleh yaitu flavonoid 0,1%. Kecilnya nilai KHM ini mungkin disebabkan ekstrak flavonoid yang digunakan pada penelitian ini yang merupakan hasil proses ekstraksi dari propolis *Trigona sp* sudah tidak mengandung senyawa lain yang mungkin tidak bersifat antibakteri yang dapat mengganggu daya antibakteri flavonoid, mengingat komposisi propolis sebagian besar berupa campuran resin dan getah (39–53%), serta lilin (*wax*) (19–35%).^{15,16}

Metode yang digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri dari flavonoid terhadap bakteri *S. mutans* adalah metode difusi agar, oleh karena metode ini paling umum digunakan untuk menentukan suseptibilitas dari bakteri terhadap bahan yang diuji.^{30,31} Hasilnya menunjukkan bahwa setelah 24 jam dan 48 jam, kecuali kontrol negatif, semua kelompok flavonoid dan kontrol positif mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*. Setelah masa inkubasi 48 jam, ternyata semakin tinggi konsentrasi flavonoid maka rerata diameter *zone* inhibisi yang terjadi semakin luas pula. Hal ini sesuai dengan pendapat Pelzcar and Chan³² bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu bahan antibakteri maka aktivitas antibakterinya akan semakin kuat pula. Hal yang berbeda terjadi pada hasil pengamatan 24 jam di mana flavonoid 0,1% menghasilkan rerata diameter *zone* inhibisi yang terluas dibanding flavonoid lainnya maupun kontrol positif. Hal ini mungkin disebabkan karena diameter *zone* inhibisi yang terjadi sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain toksisitas bahan uji, kemampuan difusi bahan uji pada media, interaksi antar komponen medium, dan kondisi lingkungan mikro *in vitro*.³¹

Berdasarkan tabel 2 maka dapat disimpulkan bahwa setelah masa inkubasi 24 jam, semua konsentrasi flavonoid yang diuji mampu menghambat pertumbuhan *S. mutans* dan flavonoid dengan konsentrasi 0,1% merupakan konsentrasi yang paling efektif dibanding konsentrasi flavonoid lainnya. Selain itu, pada periode waktu ini efektivitas daya antibakteri flavonoid 0,1% sama dengan *Povidone iodine* 10% (kontrol positif). Sementara setelah inkubasi 48 jam, semua konsentrasi flavonoid yang diuji

mampu menghambat pertumbuhan *S. mutans* dan flavonoid dengan konsentrasi 0,5% merupakan konsentrasi yang paling efektif dibanding konsentrasi flavonoid lainnya, dan efektivitas daya antibakteri flavonoid 0,5% lebih baik dibanding *Povidone iodine* 10% (kontrol positif).

Hasil uji *Two-way ANOVA* (tabel 3) memperlihatkan adanya interaksi antara lama waktu kontak dengan konsentrasi. Hal ini tampak dengan terjadinya peningkatan konsentrasi flavonoid yang efektif dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans* seiring dengan semakin lamanya waktu kontak atau dengan kata lain dengan bertambah lamanya waktu kontak maka terjadi penurunan aktivitas antibakteri dari flavonoid, hal ini mungkin disebabkan akibat terjadinya penurunan metabolisme flavonoid tersebut,³³ walaupun pada penelitian ini terlihat bahwa semakin lama waktu kontak maka diameter *zone* inhibisi yang terjadi juga semakin luas. Berdasarkan hal tersebut di atas, maka penulis berasumsi bahwa penggunaan flavonoid dengan konsentrasi rendah (0,1%) untuk periode waktu singkat (24 jam), sangat efektif dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans* bila frekuensi aplikasinya dilakukan secara terus menerus atau kontinyu, sedangkan bila flavonoid digunakan untuk periode waktu yang lama (> 24 jam) dengan frekuensi aplikasi yang jarang, maka penggunaan flavonoid dengan konsentrasi yang tinggi (> 0,1%) sangat dianjurkan.

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan beberapa hal, yakni setelah inkubasi selama 24 dan 48 jam, semua konsentrasi flavonoid yang diuji mampu menghambat pertumbuhan *S. mutans*. Setelah masa inkubasi 24 jam, flavonoid 0,1% merupakan konsentrasi yang paling efektif dibanding konsentrasi flavonoid lainnya dan flavonoid 0,5% merupakan konsentrasi yang paling efektif dibanding konsentrasi flavonoid lainnya setelah masa inkubasi 48 jam, serta terdapat interaksi antara konsentrasi flavonoid dengan lama waktu kontak antara flavonoid dengan bakteri *S. mutans*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa flavonoid yang terdapat pada propolis *Trigona sp* yang berasal dari Kabupaten Bulukumba, propinsi Sulawesi Selatan mampu menghambat pertumbuhan *S. mutans* secara *in vitro*. Hasil ini merupakan langkah pertama kemungkinan pemanfaatan bahan alam ini sebagai salah satu bahan antikaries alternatif di bidang kedokteran gigi pencegahan, tentu saja masih diperlukan serangkaian uji lainnya, sehingga beberapa saran yang mungkin bermanfaat bagi penelitian mendatang, yaitu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui kemampuan antibakteri flavonoid propolis *Trigona sp* secara *in vivo*, penting untuk dilakukan uji toksisitas dan uji biokompabilitas dari flavonoid propolis *Trigona sp*, dan diperlukan adanya penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan antibakteri flavonoid propolis *Trigona sp* terhadap bakteri lain yang terdapat pada rongga mulut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DR. Suwidjiwo Pramono, Apt (Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta) atas segala bimbingannya selama pelaksanaan proses ekstraksi flavonoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Fajerkov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997; 25:5–12.
- WHO. Epidemiology: etiology and prevention of periodontal diseases. Technical Report Series no 621. Geneva: World Health Organization 1978; p. 1–7.
- Departemen Kesehatan RI. Profil kesehatan gigi dan mulut di Indonesia pada Pelita V. Jakarta. 1994. h. 12–3.
- Lundeen TF, Roberson TM. Cariology: the lesion, etiology, prevention, and control. In: CM Sturdevant, TM Roberson, HO Heymann, JR Sturdevant, editors. The art and science of operative dentistry. 3rd ed. St Louis: Mosby-Year Book Inc; 1995. p. 62.
- Lavelle CLB. Applied oral physiology. 2nd ed. London: Wright. 1988; p. 96–7.
- Roeslan OB. Karakteristik *Streptococcus mutans* penyebab karies gigi. *Majalah Ilmiah Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Usakti*. 1995; 29–30(10):112–5.
- Wiryo widagdo S. Perkembangan dan masa depan mikrobiologi. Kursus singkat Pengontrolan Kualitas Bahan Pangan secara Mikrobiologi. Ujung Pandang: Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin; 1996. h. 1–10.
- Sila M. Madu tropis, gizi dan kesehatan masyarakat. Ujung Pandang: Lembaga penelitian Universitas Hasanuddin; 1998. h. 5–15.
- Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World* 1979; 60:59–84.
- Dadant CC. The hive and the honey bee. Illinois: Dadant and sons; 1984. p. 25–35.
- Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SAH, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991; 35:77–82.
- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Cristov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64:235–40.
- Moreno MIN, Isla MI, Cudmani NG, Vattuone MA, Sampietro AR. Screening of antibacterial activity of *Amaicha del Valle* (Tucumán, Argentina) propolis. *J Ethnopharmacol* 1999; 69:97–102.
- Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J R Soc Med* 1990; 83(3):159–60.
- Hill R. Propolis: the natural antibiotic. 6th ed. Wellingborough: Thorsons Publishers Limited; 1981. p. 10–21.
- Chen Y. Apiculture in China. 1st ed. Agricultural Publishing House; 1993. p. 96–7.
- Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 1983; 32(7):1141–8.
- Markham KR. Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press Inc Ltd; 1982. p.1–20.
- Sabir A. Pemanfaatan flavonoid di bidang kedokteran gigi. *Maj Ked Gigi (Dent J) FKG Unair* 2003; (Edisi khusus Timnas III): 81–7.
- Pepeljnjak S, Jalenjak I, Maysinger D. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie* 1985; 40:122–3.
- Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential, and motility of bacteria. *Microbiol Res* 1997; 152:239–46.
- Sabir A. Identifikasi golongan flavonoid dalam propolis *Trigona* sp dari kabupaten Bulukumba Sulawesi Selatan yang digunakan pada perawatan kaping pulpa langsung. *Maj Ked Gigi (Dent J) FKG Unair* 2003; (Edisi khusus Timnas III):59–63.
- Gomes BPFA, Ferraz CCR, Garrido FD, et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod* 2002; 28(11):758–761.
- Sudjadi. Metode pemisahan. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; 1986. h. 11–5.
- Adnan M. Teknik kromatografi untuk analisis bahan makanan. Yogyakarta: Penerbit Andi; 1997. h. 9–23.
- Bryan LE. Bacterial resistance and susceptibility. Sydney: McGraw-Hill Co; 1982. p. 20–4.
- Wilson, Gisvold. Kimia farmasi dan medisinal organik. Edisi ke-8. Achmad Mustofa Fatah. Jakarta: Dirjen Dikti dan Kebudayaan; 1982. h. 10–2.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 1999; 65(4):337–53.
- Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Jr O. Mechanism of action calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Brazil Dent J* 1995; 6:85–90.
- Tobias RS. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. *Int Endod J* 1988; 21:155–60.
- Mickel AK, Sharma P, Chogle S. Effectiveness of stannous fluoride and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2003; 29(4):259–60.
- Pelzcar MJ, Chan ECS. Dasar-dasar mikrobiologi. Jakarta: Universitas Indonesia Press; 1977. h. 450–8.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96:67–202.