



UNIVERSITAS INDONESIA

**KAJIAN SENYAWA BIOAKTIF PROPOLIS *Trigona* spp.
SEBAGAI AGEN ANTI KARIES MELALUI PENDEKATAN
ANALISIS KIMIA DIPANDU DENGAN *BIOASSAY***

DISERTASI

**IRENE MARGERETHA
0906598341**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI
JAKARTA
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**KAJIAN SENYAWA BIOAKTIF PROPOLIS *Trigona* spp.
SEBAGAI AGEN ANTI KARIES MELALUI PENDEKATAN
ANALISIS KIMIA DIPANDU DENGAN *BIOASSAY***

DISERTASI


Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor

**IRENE MARGERETHA
0906598341**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI
JAKARTA
JULI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Disertasi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar**

Nama : Irene Margeretha
NPM : 0906598341
Tanda Tangan : 
Tanggal : 17 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh

Nama : Irene Margeretha
NPM : 0906598341
Program Studi : S3, Ilmu Kedokteran Gigi
Judul Disertasi : Kajian Senyawa Bioaktif Propolis *Trigona* spp. Sebagai Agen Antikaries Melalui Pendekatan Analisis Kimia Dipandu Dengan *Bioassay*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Promotor : Dewi Fatma Suniarti, drg., MS., PhD

Kopromotor : Dr. Ellyza Herda, drg., Msi

Dr. Zainal Alim Mas'ud, DEA

Tim Penguji : Dr. Ratna Meidyawati, drg., SpKG (K) (Ketua)

Dr. Sri Utami Sunardi, drg., SpPM (Anggota)

Dr. dra. Nisa Rachmania, Msi (Anggota)

Dr. Ir. I Made Artika, M.AppSc (Anggota)

Prof. Dr. Ir. Tun Tedja Irawadi, MS (Anggota)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 17 Juli 2012

UCAPAN TERIMA KASIH

Hambamu panjatkan ke hadirat Allah yang telah melimpahkan rahmat dan perkenanNya. Penelitian dan penyusunan disertasi ini tidak mungkin terlaksana tanpa ijin Allah dan bantuan dari berbagai pihak baik moril maupun materiil sehingga penelitian ini dapat diselesaikan sampai pada penulisan disertasi ini.

Kepada kakek almarhum Iljas Gozali dan nenek Ita Sari yang kini berusia ke 93 tahun serta almarhun ayahanda H. Graham dan ibunda Maria yang amat saya cintai dan kagumi, merupakan yang pertama saya ucapkan terima kasih atas didikan, bimbingan, serta kasih sayang beliau saya bisa mencapai pendidikan sampai tingkat doktoral.

Pada kesempatan ini, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada Rektor Universitas Indonesia Prof.Dr.der Soz Gumilar Rusliwa Somantri beserta seluruh Wakil Rektor; Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Prof. Dr. Bambang Irawan, Ph.D beserta Wakil Dekan; Manager Pendidikan dan Riset Dr. Ellyza Herda, drg., M.Si., dan Staf Profesional Program Pascasarjana Dr. Ratna Meidyawati drg.,SpKG(K) yang telah memberi saya kesempatan untuk mengajukan disertasi ini dan memberikan bantuan serta fasilitas kepada saya selama pendidikan doktor.

Dari sanubari terdalam ungkapan rasa terimakasih serta penghargaan yang tiada terhingga saya sampaikan kepada promotor saya Dewi Fatma Suniarti, drg., MS., Ph.D dan ko promotor Dr. Ellyza Herda, drg., M.Si., Dr. Zainal Alim Mas'ud, DEA. Ditengah kesibukan beliau yang sangat padat, pintu rumah beliau selalu terbuka untuk saya sewaktu waktu ingin berdiskusi berbagai macam masalah penelitian yang timbul. Beliau bagi saya bukan hanya sekedar membimbing tetapi juga bijaksana dengan perhatian yang sangat tinggi serta kasih sayangnya mendampingi dalam berbagai pemecahan segala persoalan. Tidak sedikit masalah yang dihadapi sejak saya memasuki pendidikan doktor sampai penyusunan disertasi ini. Namun berkat petunjuk, bimbingan, dan solusi yang diberikan sangat berharga sehingga saya bisa menyelesaikan disertasi ini.

Penghargaan dan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada Dr. Ratna Meidyawati, drg., SpKG (K), Dr. Sri Utami Sunardi, drg., SpPM., Prof. Dr. Ir. Tun Tedja Irawadi, MS., Dr. Ir. I Made Artika, M.App Sc., Dr. dra. Nisa Rachmania Mubarik, M.Si atas pengarahan dan masukan yang sangat berharga demi kesempurnaan disertasi ini.

Staf Administrasi Pendidikan S3 mbak Erni yang sigap membantu tak kenal lelah, Staf Perpustakaan dan seluruh stafnya diucapkan terimakasih atas segala kebaikannya dan bantuannya.

Mengaturkan terima kasih yang setulus tulusnya dari lubuk hati terdalam kepada Kepala Laboratorium Terpadu IPB Dr.Zainal Alim Mas'ud., DEA dengan segala bantuan dan kemurahan hati beliau dan seluruh staf yang telah begitu banyak membantu sampai larut malam.

Terima kasih kepada drg. Rina, SpKG dan drg. Retno, SpOrt atas kesediaannya menjadi pendamping saya pada saat ujian promosi doktoral. Terima kasih juga

pada teman-teman satu angkatan pada pendidikan S3, kebersamaan kita pada semester I dan II merupakan masa yang terindah. Terima kasih atas doa serta dukungannya sekalian semoga ilmu yang saya dapat ini bermanfaat khususnya bagi kedokteran gigi dan masyarakat.

Ibu Luh Putu Susila Dewi, SH ketulusan dan kebaikan hati ibu membantu saya untuk bisa meneruskan pendidikan ini untuk kehidupan Baratha Kusuma. dan drg Ida Bagus Narmada, Sp Ort terima kasih atas dukungan moril dan memberi semangat untuk saya mengikuti pendidikan doktoral ini.

Bersyukur atas perlindungan Allah, dengan segala kemurahan, berkah, rezeki dan nikmatNya telah menuntun saya melalui berbagai ujianNya, baik halangan, rintangan dan gelombang kehidupan yang datang silih berganti, namun perjuangan, dan upaya keras yang tak kenal lelah, sampailah hari ini atas perkenanNya dapat menyelesaikan pendidikan doktoral, di tempat yang sama *Universiteit Indonesie* ayah mendapat gelar dokter Gigi 57 tahun yang lalu. Saat sebagai Kepala Suku Dinas Pusat Departemen Kesehatan RI, ayah mendapat kesempatan melanjutkan pendidikan di Amerika Serikat dalam rangka kerja sama dengan *Unicef*. Ayah meneladani kami untuk tak kenal lelah belajar dan berupaya; dengan semakin banyak pengetahuan semakin kita harus lebih bijaksana dan menjadikan diri tidak angkuh dan terasa semakin kecil di hadapan Allah. Nun jauh direlung sanubari tiada hentinya teriring doa selalu dari Mama dan Oma di *Juniverro San Fransisco*, adik Anneke Agnes kakak turut berbahagia dan mengucapkan selamat sebagai dokter teladan tingkat Kapuskes tahun 2012; adik Laura Agustina drg beserta Jusuf Natahusada *Biotechnology Senior CQV Specialist at Foster Wheeler Biokinetics, Inc. San Francisco Bay Area*; adik Lucy Graham, PhD *Department of Public Health, Los Angles*; Joanne Graham, PhD RD's *Dietetic Internship Director at California State University, Sacramento Lecturer at California State University, Sacramento Nutritionist at Western Human Nutrition Research Center Education* beserta Dr. Nathan C. Hitzeman, MD, *Sacramento, CA*, dan adik bungsu Bridget Eva Angelina SE.

Masih banyak lagi yang telah membantu saya namun mungkin terlewatkan dalam menyebutkannya. Ungkapan permohonan maaf yang setulus tulusnya dan rasa terima kasih saya sampaikan atas bantuan baik tenaga maupun doanya semoga Allah SWT membalas semua amal ibadahnya serta melimpahkan karuniaNya. Selain dari itu saya sebagai manusia yang penuh kekurangan, mungkin selama bimbingan melakukan kesalahan yang tidak saya sadari, untuk itu sekali lagi mohon dibukakan pintu maaf yang sebesar-besarnya. Semoga Allah yang maha pengasih dan penyayang melimpahkan berkahNya

Jakarta, Juli 2012

Irene Margeretha

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Irene Margeretha
NPM : 0906598341
Program Studi : S3, Ilmu Kedokteran Gigi
Fakultas : Kedokteran Gigi
Jenis Karya : Disertasi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:
Kajian senyawa bioaktif propolis *Trigona* spp. sebagai agen anti karies melalui pendekatan analisis kimia dipandu dengan bioassay.

Berdasarkan persetujuan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihkan bentuk, mengalihmediakan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, serta memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis atau pencipta dan juga sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya secara sadar tanpa paksaan dari pihak manapun.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 17 Juli 2012

Yang membuat pernyataan



(Irene Margeretha)

ABSTRAK

Nama : Irene Margeretha
Program Studi : S3, Ilmu Kedokteran Gigi
Judul : Kajian komponen bioaktif propolis *Trigona* spp. sebagai agen antikaries melalui pendekatan analisis kimia dipandu dengan *bioassay*

Kajian agen antikaries propolis *Trigona* spp. telah dilakukan dengan pendekatan analisis kimia dipandu dengan *bioassay*. Metode ekstraksi berbantuan gelombang mikro (*MAE*) paling efisien dibanding metode maserasi dan refluks. Profil kimia EEP menunjukkan komposisi kimia yang kompleks dan didominasi oleh komponen dengan kepolaran rendah. Fraksi kloroform merupakan fraksi potensial sebagai agen anti karies dengan karakteristik: *MIC* = 50 – 100 µg/ml, *MBC* = 400 – 800 µg/ml, *adherence* = 6,02% (penurunan sekitar 60% relatif terhadap media tanpa fraksi kloroform), dan dengan komposisi kimia didominasi oleh senyawa bernitrogen.

Kata kunci: propolis, antikaries, ekstraksi, fraksinasi, *bioassay*, analisis kimia

ABSTRACT

Name : Irene Margeretha
Study Program : Doctoral/S3
Judul : Study of bioactive component of propolis *Trigona* spp. as an anticaries agents through bioassay-guided chemical analysis approach.

Study of anticaries agents in propolis *Trigona* spp. has been done using bioassay-guided chemical analysis approach. The microwave-assisted extraction (MAE) was the most efficient compared to maceration and reflux methods. Chemical profile of EEP showed a complex chemical composition and dominated by low polarity components. The fraction of the chloroform has a potential as an anticaries agent with its characteristics as follows: MIC = 50 – 100 µg/ml, MBC = 400 – 800 µg/ml, adherence characteristic = 6.02% (approximately 60% decrease relative to the media without chloroform fraction) and its chemical composition dominated by nitrogenous compounds.

Key words: propolis, anticaries, extraction, fractionation, bioassay, chemical analysis

DAFTAR ISI

	Hal.
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI DISERTASI ...	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	7
1.2.1. Pertanyaan Umum Penelitian	9
1.2.2. Pertanyaan Khusus Penelitian	9
1.3. Tujuan Penelitian	9
1.3.1. Tujuan Umum	9
1.3.2. Tujuan Khusus	9
1.4. Manfaat Penelitian	10
1.5. Kebaruan Penelitian	11
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	12
2.1. Plak dan Karies Gigi	12
2.2. <i>Streptococcus mutans</i> Sebagai Agen Kausatif Utama Karies ...	19
2.3. Propolis	23
2.3.1. Komposisi Kimia dan Senyawa Bioaktif	25
2.3.2. Propolis Sebagai Agen Antikaries	29
2.3.3. Perkembangan dan Tren Baru Penelitian Propolis	34
2.3.4. Teknik Ekstraksi Bahan Bioaktif Propolis	37
2.4. Kerangka Teori	41
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	45
3.1. Kerangka Konsep	45
3.2. Hipotesis	46
3.2.1. Hipotesis Mayor	46
3.2.2. Hipotesis Minor	46
BAB 4 METODE PENELITIAN	47
4.1. <i>Sampling</i> dan Preparasi Sampel Propolis	47
4.2. Pemilihan Teknik Ekstraksi Senyawa Bioaktif	49
4.2.1. Tempat dan Waktu Kegiatan	49
4.2.2. Bahan dan Alat	49

4.2.3. Prosedur	50
4.2.4. Rancangan Percobaan dan Analisis Statistik	55
4.3. Fraksinasi ekstrak Bioaktif	56
4.3.1. Tempat dan Waktu Kegiatan	56
4.3.2. Bahan dan Alat	56
4.3.3. Prosedur	57
4.4. Analisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (<i>HPLC</i>)	59
4.4.1. Tempat dan Waktu Kegiatan	59
4.4.2. Bahan dan Alat	59
4.4.3. Prosedur	60
4.5. Uji Aktivitas Antimikroba dan Pemilihan Varian Bioaktif	61
4.5.1. Tempat dan Waktu Kegiatan	61
4.5.2. Bahan dan Alat	61
4.5.3. Prosedur	61
4.6. Identifikasi Komponen Kimia Varian Bioaktif Terbaik	65
4.6.1. Tempat dan Waktu Kegiatan	65
4.6.2. Bahan dan Alat	65
4.6.3. Prosedur	66
4.7. Definisi Operasional.	67
BAB 5 HASIL PENELITIAN	70
5.1. <i>Sampling</i> dan Preparasi Sampel	70
5.2. Pemilihan Metode Ekstraksi Senyawa Bioaktif	71
5.2.1. Optimasi Parameter Ekstraksi Maserasi	71
5.2.2. Optimasi Parameter Ekstraksi Refluks	74
5.2.3. Optimasi Parameter Ekstraksi Berbantuan Gelombang Mikro	77
5.2.4. Perbandingan Metode Ekstraksi	81
5.3. Fraksinasi Ekstrak Etanol Propolis	81
5.3.1. Fraksinasi Berbasis Perbedaan pH	81
5.3.2. Fraksinasi Berbasis Perbedaan Polaritas Pelarut Pengekstrak	84
5.4. Uji Aktivitas Antimikroba dan Pemilihan Varian Fraksi Bioaktif	86
5.5. Uji <i>Adherence</i> Pertumbuhan <i>S. mutans</i>	87
5.6. Identifikasi Kimia Varians Fraksi Bioaktif Terpilih	88
BAB 6 PEMBAHASAN	92
6.1. Pemilihan Metode Ekstraksi Senyawa Bioaktif	92
6.1.1. Optimasi Parameter Ekstraksi Maserasi	92
6.1.2. Optimasi Parameter Ekstraksi Refluks	94
6.1.3. Optimasi Parameter Ekstraksi Berbantuan Gelombang Mikro	94
6.1.4. Perbandingan Metode Ekstraksi	95
6.2. Fraksinasi Ekstrak Etanol Propolis	96
6.2.1. Fraksinasi Berbasis Perbedaan pH	96
6.2.2. Fraksinasi Berbasis Perbedaan Polaritas Pelarut	97
6.3. Uji Aktivitas Antimikroba dan Pemilihan Varian Fraksi Bioaktif	99
6.4. Uji <i>Adherence</i> Pertumbuhan <i>S. mutans</i>	99

6.5. Identifikasi Kimia Varians Fraksi Bioaktif Terpilih	100
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	102
7.1. Kesimpulan	102
7.2. Saran	103
RINGKASAN	104
SUMMARY	123
DAFTAR PUSTAKA	140

DAFTAR GAMBAR

	Hal.
Gambar 2.1	16
Ilustrasi skematik pembentukan biofilm kariogenik dengan adanya sukrosa dan polisakarida ekstraselluler (<i>EPS</i>) yang dihasilkan, memperkuat potensi kariogenik biofilm	
Gambar 2.2a	20
Skema pelekatan awal <i>S. mutans</i>	
Gambar 2.2b	21
Skema akumulasi pada permukaan gigi dengan adanya sukrosa	
Gambar 2.2c	22
Produksi asam oleh <i>S. mutans</i>	
Gambar 2.3	24
Propolis lebah <i>Trigona</i> spp. (Banten)	
Gambar 2.4	38
Alat refluks	
Gambar 2.5	38
Alat Soxhlet	
Gambar 2.6	39
Kelenjar <i>mint</i> (A) sebelum dan (B) setelah irradiasi gelombang mikro	
Gambar 2.7	41
Blok diagram alir proses ekstraksi fluida superkritis sederhana: dengan proses pemisahan melalui perubahan tekanan (a) dan perubahan suhu (b)	
Gambar 2.8	44
Kerangka teori	
Gambar 3.1	45
Kerangka konsep untuk memperoleh ekstrak bioaktif optimal dari propolis <i>Trigona</i> spp	
Gambar 3.2	45
Kerangka konsep untuk memperoleh agen antikaries terstandar dari ekstrak bioaktif propolis <i>Trigona</i> spp	
Gambar 4.1	48
Diagram alir penelitian	
Gambar 4.2	50
Ekstraksi dengan metode maserasi	
Gambar 4.3	50
Sentrifugasi ekstrak	
Gambar 4.4	51
Ekstraksi dengan metode refluks	
Gambar 4.5	52
Ekstraksi berbantuan gelombang mikro	
Gambar 4.6	53
Larutan standar (asam galat) untuk penetapan kandungan Total fenolik dalam ekstrak etanol propolis	
Gambar 4.7	53
Larutan sampel ekstrak etanol propolis (a) dan larutan standar (quercetin) untuk penetapan kandungan flavonoid (b)	
Gambar 4.8	54
Pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer	
Gambar 4.9	54
Pengukuran kandungan total fenolik dan flavonoid dengan spektrofotometer <i>UV-VIS</i>	
Gambar 4.10	57
Pengukuran Ph dari larutan yang akan diekstraksi. (a) kalibrasi Ph meter, (b) larutan suasana asam (Ph 1 dan 4) dan © larutan netral sampai basa (Ph 7 dan 10)	
Gambar 4.11	58
Diagram alir fraksinasi ekstrak etanol berbasis perbedaan Ph	
Gambar 4.12	59
Proses penguapan pelarut dengan rotaevaporator (a) dan hasil Penguapan pelarut (b)	
Gambar 4.13	60
Piranti <i>HPLC</i>	
Gambar 4.14	62
Inokulasi <i>S.mutans</i> pada media agar <i>BHI</i>	
Gambar 4.15	62
Penyusunan sampel uji zona hambat untuk diinkubasi	
Gambar 4.16	63
Sampel dalam xiiactorial	
Gambar 4.17	63
Proses uji <i>adherence</i> (a) tabung uji (kemiringan 30°) dalam <i>an-</i>	

	<i>aerobic jar</i> (b) <i>anaerobic jar</i> dalam xiiiactorial (c) sentrifugasi untuk menghilangkan media kultur coklat dan (d) ultrasonikasi untuk merontokkan sel yang melekat pada dinding tabung. .	65
Gambar 5.1	Bahan baku propolis <i>Trigona spp</i>	70
Gambar 5.2	Sampel propolis yang telah mengalami pendinginan -20°C (a), preparat propolis (b)	70
Gambar 5.3	Plot permukaan respon dan kontur dari pengaruh xiiiactoria Bebas terhadap total fenolik (a) dan flavonoid (b) dengan metode maserasi	73
Gambar 5.4	Plot permukaan respon dan kontur dari pengaruh xiiiactoria Bebas terhadap total fenolik (a) dan flavonoid (b) dengan metode refluks	76
Gambar 5.5	Plot permukaan respon dan kontur dari pengaruh xiiiactoria bebas terhadap total fenolik dengan metode <i>MAE</i>	79
Gambar 5.6	Plot permukaan respon dan kontur dari pengaruh xiiiactoria bebas terhadap flavonoid dengan metode <i>MAE</i>	80
Gambar 5.7	Kromatogram <i>HPLC</i> dari EEP (a) fraksi Ph 1(b) fraksi Ph 4 © fraksi Ph 7 (d), dan fraksi Ph 10 (e)	83
Gambar 5.8	Kromatogram <i>HPLC</i> dari EEP (a), fraksi etilasetat (b), fraksi air xiiiactor air-etilasetat ©, fraksi kloroform (d) dan fraksi air xiiiactor air-kloroform (e)	85
Gambar 5.9	Karakteristik <i>adherence S.mutans</i> (%) dalam media <i>BHI</i> yang mengandung 1% sukrosa (M), dalam media + fraksi kloroform 50µg/MI (MS), dan media + pelarut sebagai blanko (MB) . . .	88
Gambar 5.10	Profil <i>LC-MS</i> fraksi kloroform dari EEP	89

DAFTAR TABEL

	Hal.
Tabel 2.1 Senyawa yang bertanggungjawab pada aktivitas biologi dari berbagai jenis propolis	28
Tabel 4.1 Kisaran dan level xivactoria bebas dalam optimasi ekstraksi dengan metode maserasi dan refluks	55
Tabel 4.2 Kisaran dan level xivactoria bebas dalam optimasi ekstraksi dengan metode berbantuan gelombang mikro	55
Tabel 5.1 Matriks rancangan <i>central composite</i> ekstraksi secara maserasi dan respon eksperimental.	71
Tabel 5.2 ANOVA untuk optimasi teknik maserasi terhadap respon . . .	72
Tabel 5.3 Matriks rancangan <i>central composite</i> ekstraksi secara refluks dan respon eksperimental.	74
Tabel 5.4 ANOVA untuk optimasi teknik refluks terhadap respon . . .	75
Tabel 5.5 Matriks rancangan xivactorial lengkap dari MAE dan respon eksperimental.	77
Tabel 5.6 ANOVA untuk optimasi teknik MAE terhadap respon . . .	78
Tabel 5.7 Rekapitulasi kadar flavonoid dan total fenolik pada kondisi optimal dari metode ekstraksi maserasi, refluks dan MAE . . .	81
Tabel 5.8 Rataan (n=4) zona inhibisi pertumbuhan <i>S.mutans</i> oleh EEP dan berbagai fraksinya	86
Tabel 5.9 Nilai MIC dan MBC dari EEP dan berbagai fraksinya yang diperoleh dengan cara fraksinasi berbasis perbedaan kepolaran pelarut pengekstrak	87
Tabel 5.10 Komponen mayor fraksi kloroform dari EEP	89

DAFTAR SINGKATAN

<i>ANOVA</i>	<i>Analysis of Variance</i>
<i>Api</i>	<i>Apigenin</i>
<i>ATCC</i>	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>BHI</i>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>CAPE</i>	<i>Caffeic Acid Phenethyl Ester</i>
<i>DMFT</i>	<i>Decayed, Missing, Filled Permanent Teeth</i>
<i>DPPH</i>	<i>1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>
<i>EEP</i>	<i>Ekstrak Etanol Propolis</i>
<i>EPS</i>	<i>Extracellular Polysaccharide</i>
<i>Far</i>	<i>tt-Farnesol</i>
<i>FTFs</i>	<i>Fructosyltransferase</i>
<i>GBP</i>	<i>Glucan Binding Protein</i>
<i>GTFs</i>	<i>Glucosyltransferase</i>
<i>HPLC</i>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>IPS</i>	<i>Intracellular Polysaccharide</i>
<i>LC-MS</i>	<i>Liquid Chromatograph-Mass Spectrograph</i>
<i>MAE</i>	<i>Microwave-Assisted Extraction</i>
<i>MBC</i>	<i>Minimal Bactericidal Concentration</i>
<i>MIC</i>	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
<i>NCCLS</i>	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
<i>NOEL</i>	<i>No-Effect Level</i>
<i>RSM</i>	<i>Response Surface Methodology</i>
<i>S.sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>S.mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S.mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>UV-VIS</i>	<i>Ultra Violet – Visible</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
Lampiran 1. Surat keterangan Lolos Etik	160
Lampiran 2. Data Proses Respon Permukaan	161
Lampiran 3. Data Pengukuran Zona Hambat	171
Lampiran 4. Data Karakteristik <i>Adherence</i>	172
Lampiran 5. Spektrum Massa Konstituen Mayor Fraksi Kloroform	174
Lampiran 6. Publikasi (journal of Natural Products, ISSN: 0974-5211). .	183

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Karies adalah penyakit infeksi yang masih merupakan masalah kesehatan mulut utama di negara industri, ditemukan 60-90% pada anak usia sekolah dan sebagian besar orang dewasa, dan juga merupakan penyakit mulut yang lazim di negara Asia dan Amerika Latin. Distribusi dan tingkat keparahannya bervariasi di berbagai belahan dunia, dan dalam wilayah dan negara yang sama.¹ Prevalensi karies aktif di Indonesia juga cukup tinggi, menurut Riset Kesehatan Dasar Nasional 2007 adalah 43,4%. Sebanyak 14 provinsi memiliki prevalensi aktif di atas prevalensi nasional, yaitu: Riau, Jambi, Sumatra Selatan, Bangka Belitung, Daerah Istimewa Yogyakarta, Jawa Timur, Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur, Sulawesi Utara, Sulawesi Tengah, Sulawesi Tenggara, dan Maluku.²

Indikator pencapaian pelayanan kesehatan gigi nasional, mengacu pada pedoman yang telah ditentukan WHO, antara lain adalah anak usia 5 tahun 90% bebas karies, anak usia 12 tahun mempunyai tingkat keparahan kerusakan gigi (Indeks *DMF-T*) sebesar satu gigi, penduduk usia 18 tahun bebas gigi yang dicabut (komponen $M = 0$), 90% penduduk usia 35-44 tahun memiliki minimal 20 gigi berfungsi dan penduduk usia 35- 44 tahun tanpa gigi (edentulous) $\leq 2\%$, penduduk usia 65 tahun ke atas masih mempunyai gigi berfungsi sebesar 75%, dan penduduk tanpa gigi $\leq 5\%$.³ Upaya pencegahan karies di Indonesia masih belum optimal dan agar penurunan indeks karies sesuai pedoman WHO dapat tercapai, maka perlu diupayakan pencegahan dari segala aspek penyebab karies. Karies merupakan penyakit kompleks yang disebabkan oleh ketidakseimbangan fisiologis antara mineral gigi dan fluida biofilm.^{4,5,6} Terjadinya karies adalah multifaktor yang saling berinteraksi, yakni: *host* (gigi dan saliva), mikroorganisme terutama bakteri, substrat dan waktu.^{7,8} Selain itu, juga

dipengaruhi oleh faktor pendidikan, status sosial, pola makan, pekerjaan, bahkan budaya manusia itu sendiri.^{9,10} Apakah lesi karies akan berkembang, tetap sama, atau berkurang ditentukan oleh keseimbangan antara faktor protektif dan faktor patologis.⁴ Jika faktor protektif mendominasi, maka karies dihentikan. Secara sederhana, faktor patologis adalah bakteri kariogenik, disfungsi saliva, dan frekuensi konsumsi karbohidrat terfermentasi. Pada saat faktor patologis mendominasi, maka bakteri kariogenik sangat sulit dikendalikan. Faktor protektif meliputi sebagian besar komponen dalam saliva seperti kalsium, fosfat, fluor, protein pelindung yang membentuk *pellicle*, protein yang mempertahankan supersaturasi mineral dan plak, dan zat antibakteri alami dalam saliva atau dari sumber ekstrinsik (misalnya, klorheksidin), fluorida dari sumber eksternal, dan zat (misalnya, permen karet) yang merangsang fungsi saliva. Dalam hal fungsi saliva berkurang, maka faktor protektif yang tersedia oleh saliva akan turun, dan kemampuan saliva untuk meningkatkan remineralisasi, menghilangkan atau menginhibisi aksi bakteri juga berkurang. Morfologi gigi juga berkontribusi pada kerentanan karies berdasarkan kemudahan kolonisasi bakteri dan aksesibilitas terhadap saliva.¹¹

Salah satu spesies bakteri yang dominan dalam mulut dan merupakan penyebab utama timbulnya karies gigi yaitu *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Berbagai penelitian membuktikan adanya korelasi positif antara jumlah bakteri *S. mutans* pada plak gigi dengan prevalensi karies.^{12,13,14,15}

S. mutans dipandang sebagai mikroorganisme yang paling kariogenik pada biofilm gigi. Hal ini disebabkan oleh kapasitasnya menggunakan karbohidrat dalam diet, seperti sukrosa, untuk mensintesis polisakarida ekstraseluler (glukan) dan karena sifat asidogenik serta asiduriknya.¹⁶ Polisakarida ekstraseluler merupakan faktor virulensi yang penting dari *S. mutans* karena polisakarida ini mempromosikan perlekatan bakterial pada permukaan gigi,^{17,18} memberi kontribusi terhadap integritas struktural biofilm,^{19,20} mengubah porositas biofilm²¹ sehingga karbohidrat dalam diet dapat masuk ke bagian dalamnya hingga mencapai antar muka biofilm-enamel dan akibatnya meningkatkan demineralisasi

enamel.²² Oleh karena itu, bakteri ini menjadi target utama dalam upaya mencegah terjadinya karies gigi.^{23,24} Selain itu *S. mutans* juga digunakan untuk mengevaluasi sifat kariogenik yang disebabkan oleh sulitnya pengembangan studi *in vivo* dalam mengontrol situasi kariogenik.²⁵

Ccahuana-Vásquez dan Cury (2010) telah memvalidasi *S. mutans* sebagai model untuk mengevaluasi agen antimikroba dan demineralisasi enamel dengan cara mensimulasi berbagai episode (*feast-famine*) paparan sukrosa. Sebagai agen antimikroba yang dicobakan adalah diglukonat klorheksidin dan NaF dengan konsentrasi yang memberi efek antikaries yang diakui. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa *S. mutans* dapat digunakan sebagai model untuk menguji pengaruh agen antimikroba terhadap pertumbuhan biofilm dan demineralisasi enamel.²⁶

Klorheksidin dan triklosan adalah agen kimia sintetik yang merupakan material representatif untuk perawatan mulut saat ini. Meskipun kedua agen tersebut memiliki karakteristik antibakteri yang kuat dan dengan spektrum yang luas^{27,28}, namun juga memiliki efek samping jangka panjang, seperti menimbulkan pewarnaan intraoral, mempengaruhi persepsi rasa, iritasi mukosa mulut, dan gangguan pada ekologi bakteri rongga mulut.^{29,30} Koo et al. (2003) menunjukkan bahwa penggunaan klorheksidin dengan konsentrasi 1,33 mM untuk satu menit dan dua kali sehari, mempengaruhi secara dramatis viabilitas *S. mutans*.³¹ Gejala yang paling sering dilaporkan, berdasarkan laporan pasca pemasaran produk obat kumur klorheksidin glukonat, adalah *stomatitis*, *gingivitis*, *glossitis*, *ulcer*, mulut kering, *hypesthesia*, *glossal edema*, dan *paresthesia*.³² Oleh karena itu diperlukan penemuan senyawa baru tanpa efek samping selama penggunaan jangka panjang.

Saat ini pendekatan yang banyak diteliti para ahli adalah pencegahan pembentukan biofilm tanpa mengeliminasi mikroorganisme dari dalam rongga mulut di antaranya dengan pemanfaatan obat tradisional yang berasal dari tanaman atau bahan alam sebagai salah satu alternatif di bidang kedokteran gigi pencegahan. Pendekatan ini merupakan strategi yang diharapkan dapat melindungi gigi dari proses karies melalui intervensi terhadap interaksi bakteri

dengan permukaan gigi.^{33,34} Beberapa bahan alam dari tanaman obat diyakini dapat mencegah karies dengan efek samping lebih ringan, walaupun hal tersebut masih memerlukan pembuktian ilmiah.

Penggunaan obat tradisional merupakan bagian dari budaya bangsa dan telah dimanfaatkan oleh masyarakat sejak berabad-abad yang lalu, namun masih perlu didukung oleh berbagai penelitian terutama menyangkut efektifitas dan keamanannya. Hal ini sesuai dengan Kebijakan Obat Tradisional Nasional 2007 bahwa pengembangan dan peningkatan obat tradisional ditujukan agar diperoleh obat tradisional yang bermutu tinggi, aman, dan memiliki khasiat nyata yang teruji secara ilmiah.³⁵

Industri kesehatan biasanya menggunakan produk alami sebagai alternatif untuk formulasi konvensional *allopatic* dalam rangka pengobatan berbagai penyakit. Salah satu bahan alam yang diyakini secara empiris mempunyai banyak khasiat dan relatif aman adalah propolis. Propolis adalah bahan alami tidak beracun dikumpulkan oleh lebah dari berbagai sumber tanaman telah digunakan sejak dahulu kala, di antaranya sebagai obat tradisional, biokosmetik, dan makanan kesehatan.^{36,37,38} Propolis memiliki aktivitas biologis dengan spektrum yang sangat luas, meliputi: antibakteri, antijamur, antivirus, antiprotozoa, antioksidan, antikanker, antiinflamasi, imunomodulator, agen antitumor, promotor penyembuhan luka dan sebagai agen anestesi.^{39,40,41,42,43,44} Propolis dapat menyembuhkan lesi kecil di mulut, angina, serta infeksi kulit, terapi mastitis yang disebabkan oleh mikroorganisme resisten terhadap antibiotik.⁴⁵ Komposisi kimia propolis sangat kompleks; flavonoid dan turunan (hidroksil) asam sinamat dan berbagai senyawa aromatik lainnya telah dianggap sebagai senyawa biologis aktif utama.⁴⁶ Sifat antibakteri propolis disebabkan oleh adanya flavonoida dan senyawa aromatik seperti asam kafeat.⁴⁷ Flavonoid telah dikenal sebagai senyawa tumbuhan yang mempunyai khasiat sebagai antibakteri, antijamur, antivirus, antioksidan dan antiinflamasi. Karakter antioksidan dari propolis yang ditunjukkan melalui proteksi terhadap radiasi gamma menggambarkan kemampuan propolis sebagai *radical scavenging*⁴⁸ yang lebih baik dibanding

karakter antioksidan dari vitamin C.⁴⁹ Sifat anti-inflamasi dari propolis disebabkan oleh adanya ester fenetil asam kafeat (*CAPE*) dalam propolis.⁵⁰

Propolis berkhasiat sangat efektif terhadap bakteri gram positif⁵¹, terutama terhadap *Staphylococcus aureus*⁴⁹ dan terhadap bakteri gram negatif.⁵² Penelitian *in-vitro* menunjukkan bahwa propolis menghambat pertumbuhan *S. mutans*,^{53,54} yang merupakan agen etiologi utama karies gigi pada hewan dan manusia.^{16,55,56} Selanjutnya, penggunaan propolis dalam air minum atau dioleskan dapat mengurangi insidensi karies gigi pada tikus.⁵⁷

Mekanisme kerja propolis sebagai antimikroba adalah kompleks, dapat disebabkan oleh sinergisme antara fenolik dan senyawa lainnya.^{58,59} Propolis menghambat pertumbuhan bakteri melalui pencegahan pembelahan sel, sehingga mengakibatkan terbentuknya *Streptococcus* pseudo-multisel. Selain itu, propolis menyebabkan membran sitoplasmik dan dinding sel tidak beraturan, akibat bakteriolisis parsial dan penghambatan sintesis protein. Hal ini membuktikan bahwa mekanisme aksi propolis pada sel bakteri adalah kompleks dan tidak dapat dibuat analogi sederhana seperti cara kerja dari setiap antibiotik klasik.⁴⁵

Komposisi kimia propolis tergantung pada kekhususan flora lokal di lokasi pengumpulan, dengan demikian tergantung pada karakteristik geografi dan iklim dari lokasi tersebut. Komposisi kuantitatif dan kualitatif propolis memainkan peranan penting dalam aktivitas biologisnya. Sebagai ilustrasi, sampai saat ini terdapat dua belas jenis propolis Brazil yang berbeda secara kimia telah dikarakterisasi.⁶⁰ Dua jenis di antaranya (satu dari Brazil tenggara, tipe 12, dan yang lainnya dari Brazil selatan, tipe 3) merupakan jenis yang kaya akan flavonoid dan asam sinamat dan menunjukkan daya hambat yang luar biasa terhadap aktivitas glukosiltransferase yang telah dimurnikan (*GTFs*) secara *in vitro*.²⁴ *GTFs* memegang peranan penting dalam interaksi perekatan dengan *S. mutans* dan ekspresi virulensi oleh mikroorganisme ini.^{18,61,62,63} Glukan disintesis oleh *GTFs* tidak hanya mempromosikan akumulasi streptococci kariogenik pada permukaan gigi, tapi juga memberikan kontribusi yang signifikan terhadap pembentukan plak gigi.^{64,65} *S. mutans* menghasilkan setidaknya tiga *GTFs* yakni *GTF B*, yang mengkatalisis sintesis sebagian besar glukan terikat

α 1-3 yang tidak larut air; *GTF C*, yang mengkatalisis sintesis campuran glukosa terikat α 1-6 yang tidak larut dan larut; dan *GTF D*, yang mengkatalisis sintesis glukosa terlarut. *GTFs B* dan *C* tampaknya merupakan *GTFs* paling penting terkait dengan karies gigi.⁶³ Di lain pihak, flavonoida maupun turunan asam sinamat tidak terdeteksi pada jenis yang diklasifikasikan sebagai tipe 6 (dari Brazil Timur Laut, hutan Atlantik, negara bagian Bahia).⁶⁶ Namun, ekstrak etanol propolis tipe 6 (EEP) menunjukkan aktivitas antimikroba yang luar biasa terhadap mikroorganisme patogen mulut, termasuk *S. mutans*.⁶⁷

Toksisitas, ulserasi mukosa, dan pengembangan strain bakteri resisten adalah masalah yang ditemukan pada penggunaan beberapa agen antibakteri sintetik. Adanya efek-efek yang merugikan ini memotivasi dokter gigi untuk menggunakan obat alami konvensional untuk penyakit karies dan rongga mulut.⁶⁸ Hal tersebut mendorong penelitian terhadap studi agen antimikroba yang berbasis bahan alam. Kajian terhadap propolis Indonesia, terutama yang berhubungan dengan aktivitas anti karies relatif masih kurang. Sabir (2005) telah meneliti aktivitas antibakteri dari fraksi flavonoida propolis *Trigona* spp. yang berasal dari kabupaten Bulukumba-Sulawesi Selatan dan menunjukkan bahwa fraksi flavonoid tersebut mampu menghambat pertumbuhan *S. mutans* secara *in-vitro*.⁶⁹ Ekstrak etanol propolis *Apis mellifera* L dari berbagai daerah di Jawa (Sukabumi, Batang dan Lawang) menunjukkan perbedaan dalam komposisi kimia dan tingkat aktivitas sitotoksik terhadap *tumor cell lines* (*T47D*, *MCF-7*, *Hela*, *Myeloma* dan *Vero*).⁷⁰ Walaupun dalam kedua penelitian ini tidak menunjukkan komponen spesifik atau senyawa aktif prinsipal yang bertanggungjawab terhadap aktivitas biologis yang ditelitinya, namun penelitian ini membuka perspektif baru untuk penelitian selanjutnya. Identifikasi senyawa aktif prinsipal merupakan hal fundamental dalam rangka standarisasi propolis.⁷¹ Trusheva et al. (2011) telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi 11 senyawa dari propolis yang berasal dari Jawa Timur: empat alk(en)il resorsinol, empat prenilflavanon dan tiga triterpen jenis sikloartan. Keempat prenilflavanon menunjukkan aktivitas *scavenging* radikal yang signifikan dan satu dari keempat senyawa tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap *Staphylococcus aureus*.⁷²

Pada penelitian ini dilakukan investigasi terhadap propolis Indonesia yaitu propolis *Trigona* spp. yang berasal dari Banten. Beberapa aspek yang dikaji meliputi pemilihan metode ekstraksi bahan aktif agar diperoleh ekstrak yang dapat menggambarkan daya kerja bioaktif dan informasi molekuler yang optimal dari golongan senyawa berkhasiat sebagai agen antikaries; penentuan daya hambat terhadap *S.mutans* dari ekstrak bioaktif dan berbagai fraksinya yang diikuti dengan analisis kimia dan uji aktivitas *adherence* terhadap fraksi yang mempunyai kemampuan daya hambat yang paling optimal. Dari data kajian tersebut diperoleh agen antikaries yang potensial dan terkarakterisasi.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka beberapa hal penting dapat direkapitulasi sebagai berikut:

- Pencegahan karies di Indonesia masih perlu dioptimalkan, dan agar penurunan indeks karies sesuai pedoman *WHO* dapat tercapai, maka perlu diupayakan pencegahan dari berbagai aspek penyebab karies. Suatu alternatif terhadap upaya ini adalah penelusuran bahan alami yang efektif mencegah terjadinya karies. Salah satu bahan alami yang potensial untuk ditelusuri secara komprehensif adalah propolis.
- Perbedaan komposisi kimia propolis dari asal-usul yang berbeda mengarah pada harapan bahwa jenis propolis yang berbeda akan memberikan sifat biologis yang berbeda. Namun, dalam banyak kasus, hal ini tidak demikian. Pada dasarnya, propolis adalah pertahanan lebah melawan infeksi, dan dengan demikian tidaklah mengherankan bahwa aktivitas antibakteri dan antijamur selalu dijumpai karena sangat penting sebagai agen antimikroba, terlepas dari daerah mana propolis diproduksi. Kesamaan dalam berbagai keaktifan kurang jelas tetapi adalah sebuah fakta. Tentu saja, senyawa yang bertanggung jawab berbeda. Indonesia kaya akan keanekaragaman hayati yang merupakan sumber yang beragam bagi bahan baku pembentuk propolis oleh lebah. Di lain pihak data menyangkut propolis Indonesia masih sangat minim. Dengan demikian, propolis Indonesia perlu dieksplorasi terutama menyangkut senyawa penyusunnya sehubungan dengan aplikasinya sebagai

antikaries. Selain itu penemuan senyawa bioaktif baru berbasis propolis Indonesia adalah memungkinkan.

- Propolis memiliki aktivitas biologis dengan spektrum yang sangat luas, meliputi: antibakteri, antijamur, antivirus, antiprotozoa, anti-oksidan, anti kanker, anti-inflamasi, imunomodulator, agen antitumor, promotor penyembuhan luka dan sebagai agen anestesi. Propolis dapat menyembuhkan lesi kecil di mulut, angina, serta infeksi kulit, terapi mastitis yang disebabkan oleh mikroorganisme resisten terhadap antibiotik. Banyak studi telah melaporkan aplikasi potensinya dalam pengendalian karies gigi. Beberapa penyelidikan dilakukan dengan *crude extract*, fraksi terisolasi, dan senyawa dimurnikan dari propolis menunjukkan adanya penurunan jumlah *S. mutans* dan mengganggu kapasitas adhesi serta aktifitas glukosiltransferase, yang dipandang sebagai faktor utama dalam terjadinya proses kariogenik. Data dari penelitian *in vivo* telah menunjukkan penurunan jumlah *S. mutans* dalam saliva, indeks plak, dan pembentukan polisakarida tidak larut air. Temuan ini menunjukkan bahwa propolis dan atau senyawa-senyawanya adalah agen kariostatik yang menjanjikan. Namun, variasi dalam komposisi kimia propolis karena distribusi geografis adalah suatu kelemahan yang signifikan untuk penggunaan rutin klinis dan terutama ketika propolis diinkorporasikan ke dalam produk-produk untuk kesehatan mulut. Dari permasalahan ini, maka informasi molekuler yang khas menyangkut aktivitas antikaries khususnya yang dapat menginhibisi pertumbuhan *S. mutans* perlu diperoleh. Mekanisme kerja antimikroba adalah kompleks dan tidak dapat dibuat analogi sederhana seperti cara kerja dari setiap antibiotik klasik. Selain itu, aktivitas antimikroba ini dapat disebabkan oleh sinergisme antara berbagai senyawa penyusunnya. Sinergisme antar senyawa pada dasarnya dapat ditelusuri melalui sistem fraksi terisolasi atau kombinasi antara fraksi terisolasi. Diperolehnya informasi sinergisme molekuler dapat memberi masukan bagi penelitian yang menyangkut elucidasi mekanisme aktivitas antimikroba.
- Banyak faktor yang terlibat sehubungan dengan aktivitas anti karies dari propolis seperti asal geografis, spesies lebah dan preparasi ekstrak. Dari

sisi preparasi ekstrak, maka metode preparasi ekstrak yang optimal perlu ditentukan dan merupakan hal yang pertama harus dilakukan sebelum mengeksplorasi efek lanjut lainnya.

Dengan demikian dapat dirumuskan permasalahan dalam bentuk pertanyaan seperti berikut ini.

1.2.1. Pertanyaan Umum Penelitian:

Apakah terdapat komponen bioaktif dalam sampel propolis *Trigona* spp. (Banten) yang potensial sebagai agen antikaries?

1.2.2. Pertanyaan Khusus Penelitian:

- 1.2.2.1. Bagaimana teknik ekstraksi terbaik untuk memperoleh ekstrak bioaktif propolis?
- 1.2.2.2. Bagaimana profil senyawa bioaktif dalam sampel propolis *Trigona* spp. yang berasal dari Banten ?
- 1.2.2.3. Fraksi dari ekstrak bioaktif yang mana memiliki efek inhibisi terbaik terhadap bakteri penyebab karies (*S. mutans*) ?
- 1.2.2.4. Berapa nilai *MIC*, *MBC* dan bagaimana karakteristik *adherence* dari fraksi terbaik terhadap *S. mutans*. ?
- 1.2.2.5. Apakah fraksi terbaik dari ekstrak bioaktif memberi efek yang lebih baik dibanding agen antikaries yang dianggap standar saat ini (klorheksidin) ?
- 1.2.2.6. Bagaimana identitas kimia fraksi terbaik dari ekstrak bioaktif ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Secara umum, penelitian ini bertujuan untuk memperoleh ekstrak bioaktif propolis *Trigona* spp. asli Indonesia yang dapat digunakan sebagai agen anti karies gigi.

1.3.2. Tujuan Khusus

- 1.3.2.1. Menetapkan cara ekstraksi bahan aktif biologis yang optimal dari propolis, khususnya dari matriks sampel propolis *Trigona* spp. asal

Banten.

- 1.3.2.2. Menganalisis profil senyawa dalam ekstrak bioaktif dan fraksinya
- 1.3.2.3. Menetapkan fraksi yang terbaik dari ekstrak bioaktif sebagai agen antikaries
- 1.3.2.4. Menetapkan nilai *MIC*, *MBC* dan karakteristik *adherence* dari fraksi ekstrak bioaktif yang terbaik terhadap *S.mutans*
- 1.3.2.5. Menganalisis sensitivitas antibakteri dari fraksi ekstrak bioaktif yang terbaik terhadap *S.mutans*
- 1.3.2.6. Mengidentifikasi komponen kimia dari fraksi ekstrak bioaktif yang terbaik sebagai agen anti karies

1.4. Manfaat Penelitian

- 1.4.1. Memperkaya khasanah penelitian di kedokteran gigi menyangkut penelusuran bahan bioaktif alami untuk keperluan pencegahan karies gigi melalui pendekatan yang berdasarkan bioassay dipandu oleh analisis kimia
- 1.4.2. Memperkaya bank data obat asli indonesia khususnya dalam pencegahan karies gigi
- 1.4.3. Memperoleh fraksi atau kombinasi fraksi propolis *Trigona* spp. yang terbaik dan aman untuk mencegah karies gigi yang pada akhirnya untuk mengatasi salah satu masalah kesehatan gigi di Indonesia
- 1.4.4. Memberi alternatif cara pencegahan karies gigi melalui penggunaan substansi alami yang diperoleh dari propolis, khususnya dalam menekan penggunaan bahan sintetik yang dapat memberi efek samping yang tidak diinginkan atau penggunaan antibiotik yang dapat menyebabkan resistensi. Selain itu, juga mengurangi ketergantungan terhadap bahan sintetik yang merupakan produk import.
- 1.4.5. Memberi peluang untuk pengembangan budidaya propolis asli Indonesia, yang pada akhirnya memberi nilai tambah ekonomi nasional. Selain itu, agen antikaries berbasis propolis dapat juga diaplikasikan dalam berbagai bentuk produk seperti pasta gigi, obat

kumur dan berbagai keperluan lainnya serta memiliki peran yang menjanjikan dalam pengobatan di masa depan.

1.5. Kebaruan Penelitian

Berdasarkan penelusuran informasi ilmiah tentang penelitian propolis, maka beberapa aspek kebaruan dari penelitian yang dilakukan ini, yakni:

- 1.5.1. Penelitian ini merupakan yang pertama tentang ekstraksi, fraksinasi dan evaluasi komponen bioaktif sebagai agen antikaries dari propolis asli Indonesia, khususnya yang berasal dari Banten. Selain itu, hasil penelitian juga memberi perspektif tentang potensi komponen bioaktif dalam propolis asal Banten sebagai antioksidan dan pemanfaatannya dalam bidang pengobatan lainnya.
- 1.5.2. Ditemukannya potensi agen antikaries dalam fraksi klorofom yang didominasi oleh senyawa bernitrogen merupakan hal yang spektakuler dan sejauh penelusuran yang dilakukan terhadap komponen bioaktif yang ditemukan pada propolis yang berasal dari berbagai belahan dunia, tidak pernah menyinggung tentang senyawa bernitrogen. Sebagai tambahan, klorheksidin yang saat ini dianggap sebagai *gold standard* agen antikaries juga merupakan senyawa bernitrogen, sehingga sangat memungkinkan adanya satu atau lebih senyawa dalam fraksi kloroform tersebut mempunyai aktivitas setara atau lebih baik dibanding klorheksidin.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Plak Gigi dan Karies

Plak adalah suatu biofilm yang terkonstruksi secara alami dengan ketebalan dapat mencapai 300-500 sel pada permukaan gigi dan terdiri dari sel bakteri (60-70% volume plak), polimer saliva, dan produk ekstraseluler bakteri.⁷³ Pembentukan plak melalui urutan peristiwa yang teratur, meliputi: pembentukan *pellicle* (lapisan tipis glikoprotein saliva) pada permukaan gigi; adhesi reversibel melibatkan interaksi fisiko-kimia antara permukaan sel dan *pellicle*, membentuk *adhesin-receptor* yang kuat untuk memediasi pelekatan; ko-adhesi antara koloni sel sekunder dengan sel yang telah melekat/terpasang; penggandaan dan pembentukan biofilm, termasuk sintesis eksopolisakarida (glukan) yang membentuk plak.⁷⁴ Proporsi akhir dari suatu spesies dalam kultur campuran biofilm seperti plak gigi akan tergantung pada kemampuan organisme untuk tumbuh dan berkompetisi.^{74,75}

Karies didefinisikan sebagai kerusakan terlokalisasi permukaan gigi yang diinisiasi dengan dekalsifikasi dari enamel diikuti oleh lisis enzimatik struktur organik dan menyebabkan terbentuknya kavitas. Jika dibiarkan, dapat menembus enamel dan dentin sehingga mencapai pulpa. Proses terjadinya karies adalah kompleks dan melibatkan multifaktor yang saling berinteraksi, yakni: host (gigi dan saliva), mikroorganisme terutama bakteri, substrat dan waktu.^{7,8} Tiga fenomena yang paling menonjol digunakan untuk menjelaskan etiologi penyakit ini adalah bahwa asam dihasilkan oleh bakteri mengakibatkan dekalsifikasi, bahwa mikroorganisme menghancurkan protein enamel, dan bahwa keratolitik mikroorganisme membentuk kelat dengan mineral enamel yang mengarah ke dekalsifikasi.⁷⁶

Pada awalnya terdapat dua pemikiran utama tentang peran bakteri plak dalam etiologi karies dan penyakit periodontal. Pemikiran pertama yakni “Hipotesis Plak Spesifik” menyatakan bahwa, dari sekian ragam organisme oral termasuk

mikroflora plak, hanya beberapa spesies secara aktif yang terlibat.⁷⁷ Hipotesis ini difokuskan pada pengendalian penyakit dengan menargetkan tindakan pencegahan dan pengobatan terhadap organisme dalam jumlah terbatas. Sebaliknya, “Hipotesis Plak Non-Spesifik” menyatakan bahwa karies dan penyakit periodontal adalah hasil dari aktivitas keseluruhan mikroflora plak.⁷⁸ Dengan cara ini, campuran heterogen mikroorganisme dapat memainkan peran dalam penyakit. Selanjutnya, suatu hipotesis alternatif telah diusulkan yakni “Hipotesis Ekologi Plak” yang menyatukan elemen-elemen kunci dari dua hipotesis sebelumnya, bahwa penyakit yang dimediasi oleh plak dipandang sebagai konsekuensi dari ketidakseimbangan mikroflora akibat dari peningkatan dalam komunitas mikroba oral patogen.⁷⁹ Bakteri kariogenik dapat ditemukan secara alami pada plak gigi, tetapi organisme ini mempunyai karakter kompetitif yang lemah pada pH netral, dan hadir sebagai bagian kecil dari total komunitas plak. Dalam situasi ini, tingkat bakteri yang berpotensi kariogenik tersebut tidak signifikan secara klinis, dan proses demineralisasi dan remineralisasi berada dalam kesetimbangan. Jika frekuensi asupan karbohidrat yang dapat terfermentasi ditingkatkan, maka plak dalam waktu lama berada di bawah pH kritis (sekitar pH 5,5) untuk demineralisasi enamel. Kondisi pH rendah mendukung proliferasi bakteri toleran asam (asidurik) dan asidogenik terutama *S. mutans* dan laktobasilus, mengganggu keseimbangan demineralisasi-remineralisasi dan mengarah terjadinya demineralisasi. Jika bakteri seperti *S. mutans* dan laktobasilus berada dalam jumlah yang besar pada plak, maka asam akan lebih banyak diproduksi dengan laju yang lebih cepat, sehingga demineralisasi berlangsung lebih luas. Bakteri lain juga bisa memproduksi asam pada kondisi yang sama, tetapi dengan laju yang lebih lambat.⁸⁰ Bakteri lain ini juga bertanggung jawab dalam beberapa tahap awal demineralisasi atau dapat menyebabkan lesi tanpa adanya spesies kariogenik lain pada host yang lebih rentan. Jika spesies *aciduric* (toleran asam) tidak ada pada awalnya, maka kondisi pH rendah yang berulang dipadu dengan penghambatan organisme pesaing akan meningkatkan kolonisasi *S. mutans*, atau laktobasilus. Urutan peristiwa ini menjelaskan kurangnya spesifisitas total dalam etiologi mikrobial karies dan menjelaskan pola suksesi bakteri yang teramati dalam banyak studi klinis.

Kunci dari hipotesis ekologi plak adalah bahwa (a) seleksi bakteri patogen secara langsung digabungkan dengan perubahan lingkungan, dan (b) penyakit tidak perlu memiliki etiologi yang spesifik; setiap spesies dengan ciri-ciri yang relevan dapat berkontribusi pada proses penyakit. Dengan demikian, *S. mutans* adalah salah satu organisme terbaik yang beradaptasi dengan lingkungan kariogenik (gula tinggi atau pH rendah), tetapi sifat-sifat tersebut tidak unik untuk bakteri ini. Strain dari spesies lain, seperti kelompok *S. mitis*, juga saling berbagi beberapa sifat dan karena itu akan memberikan kontribusi pada demineralisasi enamel.^{80,81,82} Unsur kunci dari hipotesis ekologis plak adalah bahwa penyakit dapat dicegah tidak hanya dengan secara langsung terhadap patogen putatif, misalnya dengan strategi anti-perekat antimikroba atau anti-perekatan, tetapi juga melibatkan penekanan faktor yang bertanggung jawab atas pengayaan patogen putatif tersebut.⁷⁹ Sejauh ini, hipotesis plak ekologi merupakan penjelasan terbaik bagi etiologi mikroba penyakit gigi.⁸³

Ditinjau dari segi peran karbohidrat diet, sukrosa dianggap yang paling kariogenik, karena terfermentasi, dan juga berfungsi sebagai substrat untuk sintesis polisakarida ekstraselular dan intraseluler dalam plak gigi.^{84,85} Fermentasi sukrosa menyebabkan pH rendah dan memicu pergeseran keseimbangan mikroflora plak ke yang lebih kariogenik, sesuai hipotesis plak ekologi.⁸⁶ Hipotesis ini didukung oleh konsumsi gula diet jangka panjang dan dalam studi eksperimental *in situ*.^{87,88,89,90,91} Selanjutnya, polisakarida ekstraselular terutama glukukan yang tidak larut mempromosikan pelekatan bakteri ke permukaan gigi^{17,18} dan memberikan kontribusi bagi integritas struktur biofilm gigi. Glukan yang tak larut juga meningkatkan porositas biofilm yang terbentuk, memungkinkan gula untuk menyebar ke bagian terdalam dari biofilm²¹, yang akan menghasilkan nilai pH plak rendah, karena katabolisme mikroba.⁹² Terdapat bukti yang menunjukkan bahwa paparan sukrosa dan polisakarida ekstraselular yang tidak dapat larut berkaitan dengan patogenesis karies gigi dan secara simultan ditunjukkan bahwa sukrosa mengurangi konsentrasi kalsium, fosfor anorganik dan fluorida dalam biofilm.^{22,91,93,94,95,96,97} Oleh karena itu, jelas bahwa polisakarida ekstraselular merupakan faktor virulensi penting dalam biofilm gigi yang dibentuk dengan adanya sukrosa.⁸⁴

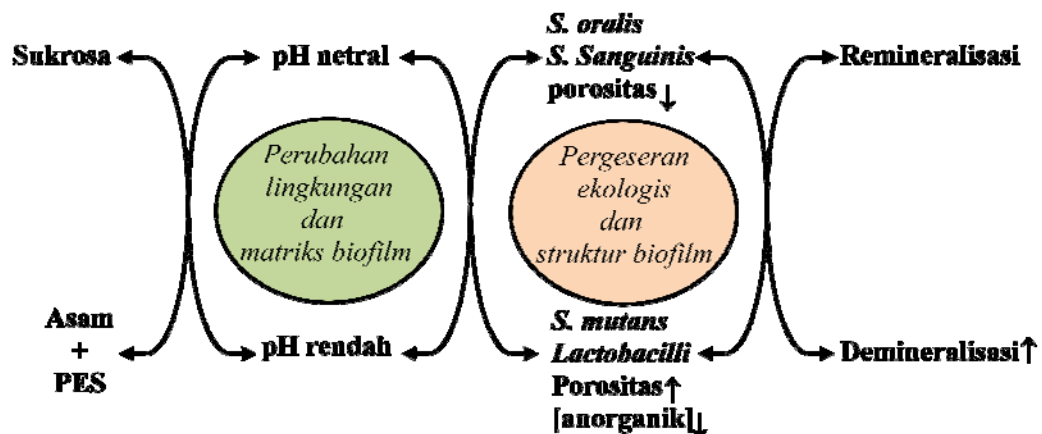
Ion kalsium, fosfor anorganik dan fluorida adalah ion yang penting dalam menjaga keseimbangan mineral antara gigi dan lingkungan oral.^{75,98} pH rendah dan konsentrasi ion ini merupakan faktor penting selama proses demineralisasi dan remineralisasi dalam lingkungan saliva-biofilm-gigi, dan penurunan ketersediaan ion dapat meningkatkan potensi kariogenik dari biofilm.⁹⁸ Namun, mekanisme yang tepat menyangkut penurunan kandungan anorganik dalam matriks biofilm tetap merupakan hal yang masih perlu dielusidasi.^{99,100,101}

Ada hubungan sebab-akibat yang jelas antara sukrosa dan karies gigi yang telah ditunjukkan dalam studi epidemiologi dan eksperimental.^{102,103,104} Sukrosa menyebabkan perubahan biokimia dan fisiologis selama proses pembentukan biofilm dan mempromosikan peningkatan proporsi mutans streptococci dan laktobasilus. Secara simultan juga menyebabkan penurunan tingkat *S. sanguinis* sebagai akibat dari penurunan pH selama fermentasi sukrosa.^{87,88,89,90} Pengamatan ini menunjukkan bahwa produksi asam dari metabolisme sukrosa mengganggu keseimbangan komunitas mikroba dan mendukung pertumbuhan spesies kariogenik.⁸⁶ Penelitian lainnya menunjukkan bahwa biofilm yang terbentuk oleh adanya sukrosa menunjukkan nilai akhir pH lebih rendah, jumlah mutans streptococci dan laktobasilus lebih tinggi, dan kariogenisitas meningkat dibanding yang dibentuk tanpa adanya gula.⁹¹ Selain itu, kariogenisitas sukrosa dikaitkan dengan frekuensi paparan dan konsentrasi. Peningkatan frekuensi paparan karbohidrat mengakibatkan plak mengalami waktu yang lama di bawah pH kritis untuk demineralisasi enamel, sedangkan penurunan pH yang lebih besar didapati pada konsentrasi sukrosa meningkat.^{105,106,107,108} Kondisi terakhir ini akan mendukung pertumbuhan dan seleksi bakteri kariogenik, sehingga mengkonversi biofilm yang sehat menjadi patogen, dan akibatnya meningkatkan demineralisasi.⁸⁶ Hal ini menggambarkan bahwa sukrosa bertindak sebagai sumber karbohidrat terfermentasi yang khas dibanding dengan karbohidrat lainnya, juga menunjukkan peningkatan kariogenisitas.^{22,102,103}

Dalam dua studi *in situ* berikut jelas menunjukkan bahwa sukrosa memiliki sifat tambahan yang meningkatkan potensi kariogenik dibandingkan dengan glukosa dan fruktosa atau pati.^{22,91} Sebagai contoh, sukrosa mempromosikan kehilangan

mineral enamel yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan campuran dengan konsentrasi ekimolar dari glukosa dan fruktosa.²² Sukrosa juga menyebabkan nilai pH yang lebih rendah, jumlah mutans streptococci lebih tinggi dalam biofilm, dan kehilangan mineral yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan pati saja. Memang, saat sukrosa dan pati digunakan dalam kombinasi, potensi kariogenik pati diperkuat.⁹¹ Dengan demikian, sukrosa merupakan karbohidrat kariogenik unik, karena terfermentasi dan juga berfungsi sebagai substrat untuk sintesis glukan ekstraseluler oleh glukosiltransferase dari mutans streptococci.^{84,85}

Beberapa studi telah menunjukkan hubungan langsung antara paparan sukrosa dan polisakarida ekstraselular, dan pengembangan karies (gambar 2.1).^{91,95,96}



Gambar 2.1 Ilustrasi skematik pembentukan biofilm kariogenik dengan adanya sukrosa dan polisakarida ekstraseluler (EPS) yang dihasilkan, memperkuat potensi kariogenik biofilm (diadopsi dari Mars, 1994)

Polisakarida dalam biofilm dapat dibagi menjadi dua kategori: (1) polisakarida ekstraselular, yang mempromosikan akumulasi bakteri ke permukaan gigi, dan mempengaruhi sifat fisik dan biokimia biofilm, dan (2) polisakarida intraseluler, yang berfungsi sebagai sumber karbohidrat endogen yang dapat dimetabolisme untuk menghasilkan asam selama periode keterbatasan nutrient.^{109,110} Polisakarida ekstraselular dan polisakarida intraseluler memiliki peran penting dalam kariogenisitas biofilm, seperti dibahas di bawah ini.

Polisakarida ekstraselular umumnya disintesis oleh glukosiltransferase bakterial terutama menggunakan sukrosa sebagai substrat. Polisakarida ekstraselular sebagian besar disintesis oleh glukosiltransferase bakteri (*GTFs*) membentuk glukukan, dan sisanya oleh fruktosiltransferase (*FTFs*) membentuk fruktan.^{61,84} *GTFs* dari *S. mutans* mensintesis campuran glukukan terikat α (1 \rightarrow 3) yang tidak dapat larut dan glukukan terikat α (1 \rightarrow 6) yang dapat larut, sedangkan *FTFs* memproduksi fruktan terikat α (2 \rightarrow 6). Polisakarida ekstraselular umumnya tidak larut, memiliki struktur yang kompleks, dan meningkatkan pelekatan secara selektif^{18,111,112} serta meningkatkan akumulasi dari sejumlah besar streptococci kariogenik pada gigi manusia^{17,96,97} dan hewan percobaan.^{95,113,114} Selanjutnya, polisakarida ekstraselular meningkatkan massa dan porositas matriks plak gigi, sehingga memungkinkan substrat lebih banyak berdifusi ke permukaan enamel.²¹ Sebagai akibat dari peningkatan difusibilitas substrat, maka lapisan yang lebih dalam dari plak gigi mempunyai nilai pH lebih rendah, karena metabolisme gula oleh mikroorganisme asidogenik, dan dengan demikian meningkatkan perkembangan karies gigi.^{22,94,96,115}

Hubungan antara paparan sukrosa, polisakarida ekstraselular, dan perkembangan karies telah dibuktikan dalam beberapa penelitian. Dalam studi *in situ* telah ditunjukkan bahwa konsentrasi dan frekuensi paparan sukrosa yang tinggi akan meningkatkan konsentrasi polisakarida ekstraseluler dalam matriks biofilm dan demineralisasi enamel bila dibandingkan dengan biofilm yang terbentuk karena tidak adanya sukrosa.^{22,91,93,94} Studi klinis juga menunjukkan bahwa sintesis polisakarida ekstraselular berhubungan dengan aktivitas karies.^{96,97} Hal ini membuktikan bahwa sukrosa dan *GTFs* adalah faktor kunci yang terlibat dalam sintesis polisakarida kompleks ini.

Jelas bahwa polisakarida ekstraseluler memainkan peran utama dalam patogenesis karies gigi, dengan mempromosikan perubahan biokimia dan fisiologi dalam matriks biofilm, meliputi: (i) meningkatkan pelekatan bakterial dan akumulasi organisme lebih lanjut, (ii) menyediakan integritas struktural dan massa untuk biofilm, dan (iii) meningkatkan asidogenisitas dari matriks biofilm.

Polisakarida intraseluler adalah polimer cadangan yang dapat termetabolisme seperti glikogen dengan ikatan $\alpha(1\rightarrow4)$ dan $\alpha(1\rightarrow6)$ yang menghubungkan antar unit monomernya. Polisakarida intraseluler merupakan sumber karbohidrat endogen yang disediakan selama periode keterbatasan nutrisi dalam rongga mulut. Akibatnya, polisakarida intraseluler dapat mempromosikan pembentukan karies gigi dengan memperpanjang paparan asam organik pada permukaan gigi dan mempertahankan pH yang rendah pada saat puasa dalam matriks plak.^{109,115}

Pentingnya polisakarida intraseluler untuk virulensi *S. mutans* mendukung laporan dalam literatur sebelumnya yang menunjukkan suatu asosiasi dari polisakarida cadangan ini dengan karies gigi pada hewan dan manusia.^{109,116,117,118} Selain itu, dalam studi *in situ* telah ditunjukkan bahwa produksi asam oleh *S. mutans* dari substrat endogen menyebabkan penguatan dan perpanjangan penurunan pH, mengakibatkan peningkatan demineralisasi enamel.¹¹⁰ Biofilm yang terbentuk secara *in situ* dengan adanya sukrosa 20% (atau lebih tinggi) menunjukkan pH jauh lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif, dan ini dapat dihubungkan dengan metabolisme polisakarida intraseluler.^{91,93}

Selain itu, biofilm terbentuk secara *in situ* dengan adanya glukosa + fruktosa dan sukrosa menampilkan polisakarida intraseluler dengan konsentrasi yang lebih tinggi daripada yang dibentuk karena tidak adanya karbohidrat ini. Menariknya, perbedaan dalam konsentrasi polisakarida intraseluler tidak hanya dipertahankan selama 3, 7, dan 14 hari pembentukan biofilm, tetapi juga meningkat dari waktu ke waktu. Dengan demikian, metabolisme polisakarida intraseluler dapat menjelaskan fenomena pH rendah pada saat puasa yang diamati pada biofilm yang mengakibatkan peningkatan kariogenisitas biofilm ini. Secara kolektif, pengamatan ini menunjukkan bahwa metabolisme substrat endogen adalah sifat yang signifikan dalam patogenesis karies gigi dengan mempengaruhi asidogenisitas dan *resting pH* biofilm gigi.¹¹⁹

Dari hal tersebut di atas, jelas bahwa polisakarida ekstraseluler dan polisakarida intraseluler mempengaruhi kariogenisitas biofilm gigi melalui paling sedikit dua jalur: (1) polisakarida ekstraseluler mempromosikan perlekatan dan akumulasi bakterial pada permukaan gigi, dan menyebabkan perubahan biokimia dan

struktural dalam matriks biofilm, dan (2) polisakarida intraselluler mempromosikan pH rendah selama periode kekurangan nutrisi, yang dapat mengakibatkan seleksi mikroorganisme kariogenik dan perkembangan karies. Agen terapeutik yang mengurangi konsentrasi polisakarida ekstraselluler dan polisakarida intraselluler dalam biofilm juga mengurangi perkembangan karies gigi pada tikus, menegaskan pentingnya polisakarida ini terhadap kariogenisitas *S. mutans*.^{31,120}

2.2. *Streptococcus mutans* sebagai Agen Kausatif Utama Karies.

Streptococcus mutans (*S. mutans*) adalah bakteri gram positif, bersifat anaerob fakultatif yang lazim ditemukan dalam rongga mulut dan agen kausatif utama karies.¹²¹ *S. mutans* merupakan flora oral normal, namun dapat menjadi patogen pada kondisi asam yang sering dan berkepanjangan. Potensi kariogenik dari bakteri ini dimanifestasikan oleh kemampuannya untuk memfermentasi berbagai karbohidrat, menghasilkan sejumlah besar asam, dan kemampuannya berpartisipasi dalam pembentukan plak gigi.⁷³

S. mutans memiliki sejumlah sifat fisiologis dan biokimia yang dilibatkan dalam inisiasi karies gigi, yakni:¹²²

- a. *S. mutans* merupakan komponen reguler dari flora normal rongga mulut manusia yang jumlahnya relatif besar. *S. mutans* mudah berkolonisasi pada permukaan gigi; komponen saliva (glikoprotein) membentuk lapisan tipis pada gigi yang disebut enamel *pellicle*. Glikoprotein yang terserap diperkirakan berfungsi sebagai reseptor molekuler bagi ligan pada permukaan sel bakteri.
- b. *S. mutans* mengandung enzim glikosiltransferase yang mungkin berfungsi sebagai ligan bakterial untuk pelekatan, di samping itu mempolimerisasi glukosa yang diperoleh dari diet sukrosa membentuk glukukan yang mengarah langsung ke pembentukan plak.
- c. *S. mutans* memproduksi asam organik (asam propionat, asam butirat, asam laktat) dari karbohidrat makanan yang mendemineralisasi enamel gigi.

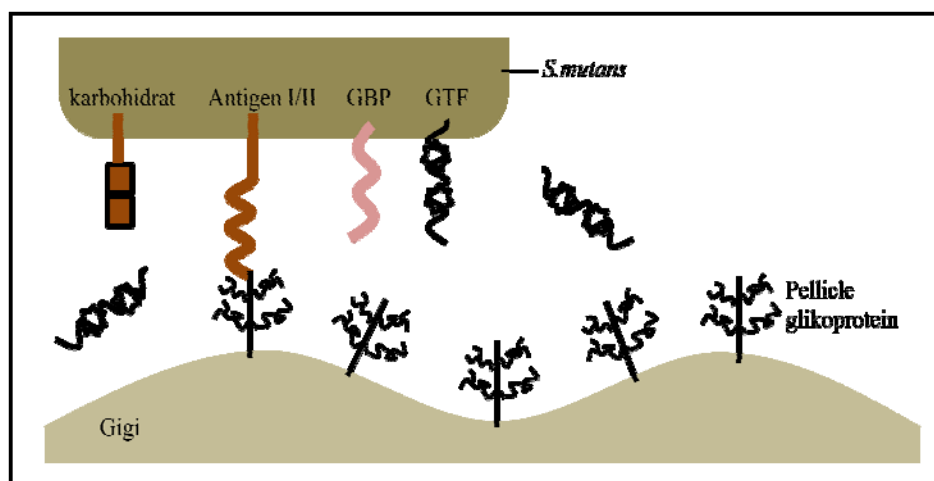
S. mutans dapat menghasilkan asam organik lebih banyak dan lebih toleran terhadap asam daripada streptococci lainnya.

S. mutans juga menyimpan polisakarida yang dibuat dari gula makanan yang dapat digunakan sebagai cadangan karbon dan sumber energi untuk produksi asam organik. Glukan ekstraseluler yang dibentuk oleh *S. mutans*, pada kenyataannya merupakan kapsul polisakarida bakterial yang berfungsi sebagai cadangan karbohidrat. Organisme juga dapat membentuk polisakarida intraseluler dari gula yang disimpan dalam sel dan kemudian dimetabolisme menjadi asam organik.

Patogenesis molekuler karies yang berkaitan dengan *S. mutans* melibatkan 3 fase berikut.¹²³

a. Pelekatan awal *S. mutans* pada permukaan gigi (Gambar 2.2a)

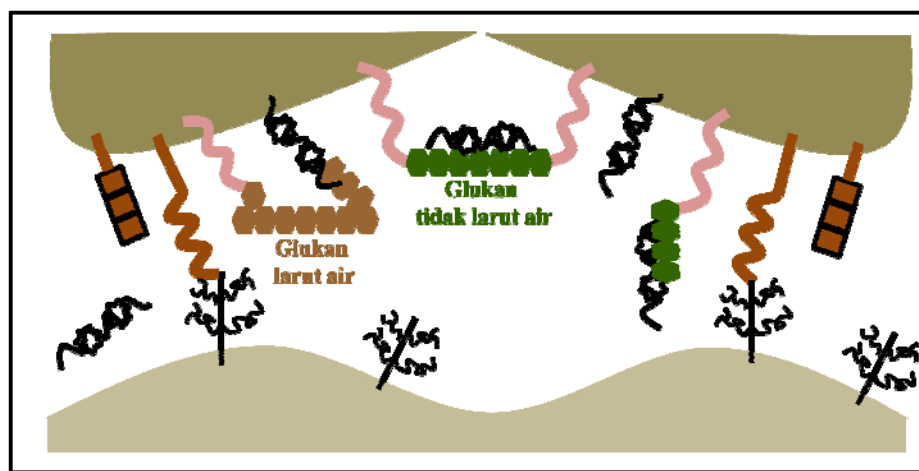
Pelekatan ini dianggap peristiwa pertama dalam pembentukan plak gigi. *Adhesin* *S. mutans* (dikenal sebagai antigen I / II) berinteraksi dengan α -galaktosida dalam konstituen saliva-glikoprotein dari *pellicle* gigi. Bagian lain di permukaan *S. mutans* meliputi protein pengikat glukan (*glucan-binding protein, GBP*), karbohidrat dan *GTFs*.



Gambar 2.2a. Skema pelekatan awal *S. mutans*
(Sumber: Taubman dan Nash, 2006)

b. Akumulasi *S.mutans* pada permukaan gigi dengan adanya sukrosa (Gambar 2.2b)

Adanya sukrosa, *GTFs* mensintesis glukukan ekstrasellular dari glukosa (setelah pemecahan sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa), dan ini dianggap peristiwa kedua dalam pembentukan plak gigi. Protein pada *GBP* adalah reseptor seperti protein yang berbeda dengan *GTFs*, dan secara khusus mengikat glukukan. *GTFs* sendiri juga memiliki domain pengikat glukukan dan karena itu juga dapat berfungsi sebagai reseptor untuk glukukan.

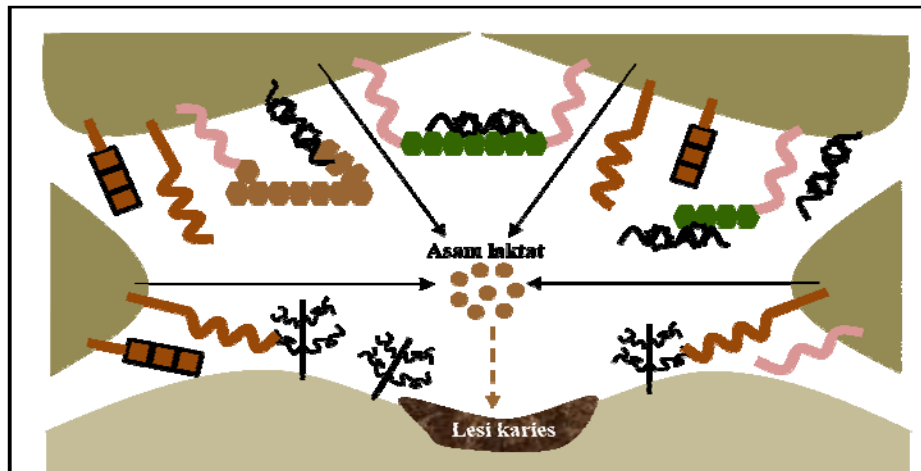


Gambar 2.2b Skema akumulasi pada permukaan gigi dengan adanya sukrosa (Sumber: Taubman dan Nash, 2006)

Jadi, *S. mutans* mengikat glukukan yang terbentuk melalui *GBP* dan *GTFs*, dan ini menimbulkan agregat mutans streptococci.

c. Produksi asam oleh *S. mutans* (Gambar 2.2c).

Metabolisme dari berbagai sakarida (termasuk glukosa dan fruktosa) dari hasil akumulasi bakteri biofilm bakteri menghasilkan dan mengsekresikan asam laktat sebagai produk akhir metabolisme, yang dapat menyebabkan demineralisasi struktur gigi ketika ada dalam jumlah yang cukup di dekat permukaan gigi. Hal ini dianggap sebagai peristiwa ketiga dalam pembentukan plak gigi, dan akhirnya menghasilkan lesi karies.



Gambar 2.2c Produksi asam oleh *S. mutans*
(Sumber: Taubman dan Nash, 2006)

S. mutans dipandang sebagai mikroorganisme yang paling kariogenik pada biofilm gigi. Hal ini disebabkan oleh kapasitasnya menggunakan *dietary* karbohidrat, seperti sukrosa, untuk mensintesis polisakarida ekstraseluler (glukan) dan karena sifat asidogenik serta asiduriknya.¹⁶ Polisakarida ekstraseluler merupakan faktor virulensi yang penting dari *S. mutans* karena polisakarida ini mempromosikan pelekatan bakterial pada permukaan gigi,^{17,18} memberi kontribusi terhadap integritas struktural biofilm,^{19,20} merubah porositas biofilm²¹ sehingga *dietary* karbohidrat dapat masuk ke bagian dalamnya hingga mencapai antar muka biofilm-enamel dan akibatnya meningkatkan demineralisasi enamel.²² Oleh karena itu, bakteri ini menjadi target utama dalam upaya mencegah terjadinya karies gigi.^{23,24} Selain itu *S. mutans* juga digunakan untuk mengevaluasi sifat kariogenik yang disebabkan oleh karena sulitnya pengembangan studi *in vivo* dalam mengontrol situasi kariogenik.²⁵

Namun demikian, *S. mutans* bukan merupakan satu-satunya penyebab kerusakan gigi. Setelah melemahnya enamel, berbagai bakteri dalam rongga mulut mendapatkan akses ke daerah interior gigi. *Lactobacillus*, *actinomyces*, dan bakteri proteolitik biasanya ditemukan pada karies dentin manusia dan sementum, yang menunjukkan bahwa mereka adalah koloni sekunder yang memberikan kontribusi pada perkembangan lesi.^{80,81,82}

2.3. Propolis

Propolis adalah bahan alami yang dihasilkan oleh lebah dan telah digunakan sejak peradaban Mesir dan Yunani kuno yang diakui kualitas penyembuhannya terhadap berbagai penyakit. Hippocrates, pendiri kedokteran modern, menggunakannya untuk penyembuhan luka dan bisul internal maupun eksternal.³⁸ Propolis berasal dari kata Yunani, yakni *pro* berarti pertahanan dan *polis* berarti kota, sehingga propolis bermakna pertahanan kota atau pertahanan sarang lebah. Propolis atau lem lebah adalah nama generik yang diberikan untuk bahan resin yang dikumpulkan oleh lebah dari berbagai jenis tumbuhan, terutama dari bagian kuncup dan daun tumbuhan tersebut. Lebah kemudian mencampur bahan resin ini dengan enzim yang disekresikan dari kelenjar saliva lebah, membentuk propolis.^{36,39}

Ada berbagai jenis lebah yang dijumpai di Indonesia. Jenis *Trigona* (Gambar 2.3) merupakan salah satu lebah tidak menyengat, jumlah madu yang dihasilkan lebih sedikit namun jumlah propolis yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan jenis lebah lainnya. *Trigona* diklasifikasikan sebagai berikut:¹²⁴

Divisi	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Arthropoda</i>
Kelas	: <i>Insecta</i>
Order	: <i>Hymenoptera</i>
Subordo	: <i>Apocrita</i>
Superfamili	: <i>Apoidea</i>
Famili	: <i>Apidae</i>
Subfamili	: <i>Apinae</i>
Suku	: <i>Meliponini</i>
Genus	: <i>Trigona</i>



Gambar 2.3. Propolis lebah *Trigona* spp. (Banten)

Propolis pada suhu kamar berupa zat lengket, namun menjadi keras dan rapuh pada suhu rendah. Lebah menggunakan propolis sebagai: 1) memperkuat sarang lebah; 2) bahan pelapis untuk melindungi sarangnya dari faktor pengganggu dari luar, seperti serangga, kumbang atau tikus; 3) meratakan dinding sarang lebah; 4) bahan pengisi lubang atau celah dan perekat keretakan yang terdapat pada sarang lebah; 5) melindungi sel sarang tempat ratu lebah menetas telurnya sehingga larva lebah terlindungi dari penyakit dan 6) biosida.^{125,126}

Umumnya propolis berwarna kuning sampai coklat tua tergantung pada asal bahan baku pembuatannya. Juga telah ditemukan propolis transparan seperti yang dilaporkan oleh Cogshall dan Morse (1984).¹²⁷ Pada suhu 25-45 °C, propolis adalah berupa zat yang lunak, lentur dan sangat lengket, kurang dari 15 °C, dan terutama ketika beku atau di dekat titik beku, ia menjadi keras dan rapuh, di atas 45 °C, akan semakin lengket dan bergetah. Biasanya propolis akan menjadi cair pada 60-70 °C, tetapi untuk beberapa sampel titik lebur mungkin setinggi 100°C. Pelarut yang paling umum digunakan untuk ekstraksi komersial adalah etanol, eter, glikol dan air. Untuk analisis kimia, berbagai macam pelarut dapat digunakan untuk mengekstrak berbagai fraksi. Banyak komponen bakterisida yang larut dalam air atau alkohol.¹²⁸

2.3.1. Komposisi Kimia dan Senyawa Bioaktif Propolis

Komposisi propolis bervariasi dari sarang ke sarang, dari daerah ke daerah, dan dari musim ke musim. Untuk memahami apa yang menyebabkan perbedaan dalam komposisi kimia, maka hal yang perlu untuk diingat adalah asal tanaman yang merupakan bahan baku pembuatan propolis. Untuk produksi propolis, lebah menggunakan bahan-bahan yang dihasilkan dari berbagai proses botani di berbagai bagian tanaman, seperti zat aktif yang disekresikan oleh tanaman serta zat yang dieksudasi dari luka pada tanaman seperti bahan lipofilik pada daun dan tunas, getah, damar, dan sebagainya.¹²⁵ Asal tanaman sebagai bahan baku propolis menentukan keragaman kimianya. Komposisi kimia propolis tergantung pada kekhususan flora lokal di lokasi pengumpulan dan dengan demikian pada karakteristik geografi dan iklim dari lokasi ini. Hasil ini merupakan fakta dalam keragaman yang mencolok dari komposisi kimia propolis, khususnya propolis berasal dari daerah tropis.

Dewasa ini, telah didokumentasikan dengan baik bahwa dalam zona sedang di seluruh dunia, sumber utama propolis adalah eksudat resin dari tunas pohon poplar, terutama poplar hitam, *Populus nigra*.³⁶ Untuk alasan ini, propolis Eropa mengandung fenolik khas tunas poplar, yakni aglikon flavonoid (flavon dan flavanon), asam fenolat dan esternya.¹²⁹ Pohon Poplar umumnya dijumpai hanya dalam zona sedang, mereka tidak dapat tumbuh di daerah tropis dan subtropis. Untuk alasan ini, dalam habitat demikian (tropis dan subtropis), lebah harus mencari sumber tanaman lain sebagai bahan baku dalam pembuatan propolis. Akibatnya, propolis dari daerah tropis memiliki komposisi kimia yang berbeda dari tipe propolis poplar. Dalam dekade terakhir, propolis Brasil menarik perhatian, baik kepentingan komersial dan ilmiah. Sampai saat ini terdapat dua belas jenis propolis Brasil yang berbeda secara kimia telah dikarakterisasi.⁶⁰ Dua jenis di antaranya (satu dari Brazil Tenggara, tipe 12, dan yang lainnya dari Brazil Selatan, tipe 3) merupakan jenis yang kaya akan flavonoid dan asam sinamat dan menunjukkan kemampuan daya hambat yang tinggi terhadap aktivitas beberapa glukosiltransferase yang telah dimurnikan secara *in vitro*.²⁴

Jenis baru propolis dilaporkan dan diklasifikasikan sebagai tipe 6 (dari Brazil Timur Laut, hutan Atlantik, negara bagian Bahia), menunjukkan bahwa flavonoid maupun turunan asam sinamat tidak terdeteksi.⁶⁶ Namun, ekstrak etanol propolis (EEP) tipe 6 menunjukkan aktivitas antimikroba yang luar biasa terhadap mikroorganisme patogen mulut, termasuk mutans streptococci. Efek inhibitorynya lebih menonjol dibandingkan dengan propolis Brasil lainnya.⁶⁷ Sumber utama propolis Brasil ternyata dari bahan resin daun *dracunculifolia* *Baccharis*.^{13,130} Di antara kelas senyawa utama yang ditemukan dalam propolis Brazil adalah turunan terprenilasi dari asam p-kumarat dan asetofenon.

Selain itu, kimia propolis Kuba menarik perhatian para ilmuwan. Komponen utamanya adalah *polyisoprenylated benzophenones*, membuat propolis Kuba berbeda dari propolis Eropa dan Brasil. Sumber tanaman dari jenis propolis ini terdeteksi dari resin bunga *Clusia rosea*, yang merupakan asal dari benzophenones terprenilasi.¹³¹ Tidak ada keraguan bahwa propolis, sumber tanaman propolis, dan komposisi kimia propolis dalam ekosistem lainnya akan terus mengejutkan para ilmuwan.

Trusheva et al. (2011) telah mengisolasi dan mengidentifikasi 11 senyawa dari ekstrak etanol propolis Indonesia dari Jawa Timur : empat alk(en)il resorsinol (diperoleh sebagai campuran tak terpisahkan) diisolasi untuk pertama kalinya dari propolis, empat prenilflavanon dan tiga triterpen jenis sikloartan. Struktur dari komponen-komponen tersebut telah ditetapkan berdasarkan karakteristik spektroskopinya. Semua prenilflavanon menunjukkan aktivitas *scavenging* radikal yang signifikan terhadap radikal difenilpikrilhidrazil, dan satu senyawa diantaranya menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap *Staphylococcus aureus*. *Macaranga tanarius* L. dan *Mangifera indica* L. ditunjukkan sebagai sumber tanaman dari sampel propolis Indonesia yang ditelitinya.⁷²

Fraksi flavonoid dari propolis *Trigona* spp. asal kabupaten Bulukumba-Sulawesi Selatan menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans*.⁶⁹ Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari berbagai konsentrasi flavonoid yang diujikan selama masa inkubasi 24 jam, konsentrasi yang paling efektif adalah 0,1% dan sebanding

dengan povidone iodine 10% sebagai kontrol positif. Sementara itu, untuk masa inkubasi 48 jam, konsentrasi yang paling efektif adalah 0,5% dan lebih baik dibanding povidin iodine 10%. Waktu kontak dan difusi senyawa aktif pada media agar merupakan parameter yang digunakan oleh peneliti untuk menerangkan perbedaan konsentrasi daya hambat efektif tersebut.⁶⁹

Komposisi kimia dan aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol propolis *Apis mellifera* L dari berbagai daerah di Jawa (Sukabumi, Batang dan Lawang) telah diteliti oleh Syamsudin et al. (2009).⁷⁰ Komposisi kimia diinvestigasi dengan GC-MS setelah silisasi dan menunjukkan perbedaan ketiga sampel propolis tersebut. Peneliti juga menyatakan bahwa terdapat tujuh senyawa yang pertama kali ditemukan dalam propolis, yakni: asam dofuranuronat (sampel Sukabumi), asam D-glukofuranuronat, asam 4-okso-2-tiokso-3-tiozolidinepropionat, *patchoulene*, 3,4-dimetiltiokinolin (sampel Lawang), 1,3-bis(trimetilsiloksi)-5,5-propilbenzena, dan 3-kinolinkarboksamin (sampel Batang). Dalam hal aktivitas sitotoksik, ekstrak propolis dari Batang menunjukkan aktivitas paling kuat terhadap *cell lines T47D* dan *MCF-7* dan ekstrak propolis dari Sukabumi paling kuat terhadap sel Hela. Namun, semua ekstrak yang ditelitinya tidak menunjukkan aktivitas terhadap sel *Myeloma* dan *Vero*.⁷⁰

Walaupun terdapat perbedaan komposisi kimia dari propolis dengan asal usul berbeda, namun kesemuanya menunjukkan aktivitas antibakteri dan antijamur. Kesamaan dalam berbagai keaktifan kurang jelas tetapi adalah sebuah fakta. Tentu saja, senyawa yang bertanggung jawab berbeda, seperti terlihat pada tabel 2.1 terutama flavanon, flavon, asam fenolat dan esternya dalam jenis propolis poplar (Eropa); asam *p*-kumarat terprenilasi dan diterpena dalam propolis jenis *Baccharis* (Brasil); benzofenon terprenilasi dalam propolis merah Kuba, dan sebagainya.

Fakta bahwa komposisi kimia yang berbeda memberikan aktivitas yang sama dan bahkan dalam beberapa kasus menunjukkan besaran tingkat aktivitas yang sama besarnya adalah merupakan hal yang luar biasa. Meskipun demikian, adalah penting untuk memiliki data perbandingan yang handal dan rinci pada setiap jenis

Tabel 2.1. Senyawa yang bertanggung jawab pada aktivitas biologi dari berbagai jenis propolis

Jenis Propolis	Antibakteri	Antiinflamasi	Antitumor	Hepatoprotektif	Antioksidan
Eropa (poplar)	Flavanon, flavon, asam fenolat dan esternya	Flavanon, flavon, asam fenolat dan esternya	Asam kafeat, fenetil ester asam kafeat	Asam kafeat, asam ferulat, ester asam kafeat	Flavonoid, fenolat dan esternya
Brazilia (Baccharis)	Asam <i>p</i> -kumarat terprenilasi, diterpena labdan	Tidak teridentifikasi	Asam <i>p</i> -kumarat terprenilasi, Klerodan, diterpen, benzofuran	Asam <i>p</i> -kumarat terprenilasi, flavonoid, lignin, asam kafeoilkuinat	Asam <i>p</i> -kumarat terprenilasi, flavonoid
Cuba	Benzofenon terprenilasi	Tidak diuji	Benzofenon terprenilasi	Tidak teridentifikasi	Benzofenon terprenilasi
Taiwan	Tidak diuji	Tidak diuji	Flavanon terprenilasi	Tidak diuji	

(Sumber: Bankova, V. 2005)¹³²

aktivitas biologis, dikombinasikan dengan data kimia, dalam rangka untuk memutuskan atau merumuskan aplikasi jenis propolis tertentu dalam beberapa bidang spesifik dengan lebih baik. Pengujian biologis dilengkapi dengan karakteristik kimia yang jelas harus dilakukan dengan baik dan jika mungkin, propolis yang terstandar secara kimia. Investigasi perbandingan rinci yang demikian adalah tantangan bagi peneliti propolis. Perkembangan baru-baru ini yang paling penting dalam penelitian propolis adalah ditujukan untuk memenuhi atau memadukan tantangan tertentu tersebut.

Jenis senyawa kimia yang terdapat pada propolis sangat kompleks. Umumnya propolis terdiri dari campuran resin dan getah, flavonoid, polifenol, polisakarida, lilin, minyak atsiri, pollen, asam amino, mineral, vitamin A, vitamin B kompleks, vitamin E dan senyawa biokimia yang sangat aktif seperti bioflavonoid, fenol dan senyawa aromatik.⁶⁶

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar dan terdapat hampir di semua spesies bunga. Kandungan kimia flavonoid dalam propolis sedikit berbeda dengan flavonoid dari bunga karena adanya suatu proses yang

dilakukan oleh lebah. Flavonoid dan turunan (hidroksil) asam sinamat telah dianggap sebagai senyawa biologis aktif utama.⁴⁶ Jenis flavonoid yang terpenting dalam propolis adalah pinocembrin dan galangin. Kelompok senyawa kimia utama yang terdapat dalam propolis adalah flavonoid, chrysin, flavanon, asam sinamat, fenolat termasuk *caffeic acid phenylethylester (CAPE)* dan berbagai senyawa aromatik lainnya. Flavonoid telah dikenal sebagai senyawa tumbuhan yang mempunyai khasiat sebagai antibakteri, antijamur, antivirus, antioksidan, antiinflamasi dan kariostatik. Flavonoid, yang merupakan kandungan utama propolis memiliki aktivitas melawan mikroorganisme rongga mulut. Berdasarkan kandungan lainnya aktivitas biologis yang dimiliki propolis adalah sebagai anti radang, anestetik, dan sebagai pelindung sel mulut. Propolis memiliki kandungan bahan yang menunjukkan efek bakterisida terhadap bakteri pemicu terbentuknya karies. Komponen propolis yang bersifat antibakteri yaitu benzofenon terpoliisoprenilasi, galangin, pinobanksin, dan pinocembrin. Karakter antioksidan dari propolis yang ditunjukkan melalui proteksi terhadap radiasi gamma menggambarkan kemampuan propolis sebagai *radical scavenging* yang lebih baik dibanding karakter antioksidan dari vitamin C.^{48,49} Sifat antiinflamasi dari propolis disebabkan oleh adanya ester fenetil asam kafeat (*CAPE*) dalam propolis.⁵⁰ Sifat antibakteri propolis disebabkan oleh adanya flavonoid dan senyawa aromatik seperti asam kafeat.⁴⁷ Propolis merupakan bahan antimikroba alami yang diketahui dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh sehingga dapat mempercepat penyembuhan jaringan yang rusak atau luka seperti perdarahan pada gusi, luka pasca operasi atau penyembuhan pasca perawatan periodontal.¹³³

2.3.2 Propolis sebagai Agen Antikaries

Perkembangan resistensi bakteri terhadap antibiotik yang tersedia saat ini telah mengharuskan pencaharian agen antibakteri baru.¹³⁴ Bakteri adalah organisme yang sangat mudah beradaptasi karena waktu generasinya sangat singkat (15 sampai 20 menit untuk beberapa spesies dalam kondisi ideal) dan kecenderungannya untuk berbagi informasi genetik, bahkan di antara spesies yang berbeda dari bakteri. Kehadiran antibiotik dapat membunuh sebagian besar bakteri dalam suatu lingkungan tetapi yang tahan dan selamat akhirnya dapat kembali membangun dirinya dan menurunkan gen ketahanan mereka pada

generasi berikutnya dan sering untuk spesies bakteri lain. Penggunaan antibiotik untuk keperluan medis dan kedokteran hewan telah menyebabkan munculnya strain bakteri resisten. Bakteri resisten yang patogen terhadap manusia dapat menyebabkan penyakit yang sulit untuk dirawat; bahkan jika bakteri resisten yang tidak patogen terhadap manusia, mungkin masih berbahaya karena mereka dapat mentransfer gen antibiotik mereka ke bakteri lain yang bersifat patogen.^{135,136}

Penggunaan berlebihan antibiotik dalam pengobatan penyakit, dan munculnya strain bakteri *multi-drug resistant* (resisten terhadap dua atau lebih antibiotik), telah mendorong penelitian terhadap studi agen antimikroba yang berbasis bahan alam.^{137,138,139} Toksisitas, ulserasi mukosal, dan pengembangan strain bakteri resisten adalah efek yang tidak dikehendaki dari beberapa agen antibakteri dan hal ini memotivasi dokter gigi untuk menggunakan obat alami konvensional untuk penyakit karies dan rongga mulut.⁶⁸

Mulut mengandung berbagai bakteri, tetapi hanya beberapa spesies bakteri tertentu yang diyakini menyebabkan karies gigi, terutama *S. mutans*. Khusus untuk karies pada akar gigi, bakteri yang paling erat terkait yang sering teridentifikasi adalah *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, dan *S. mutans*. Terapi antimikroba dengan *S. mutans* sebagai organisme indikator, telah terbukti mengurangi aktivitas karies. Penerapan desinfektan seperti klorheksidin dan yodium langsung ke gigi mengurangi populasi *S. mutans* dalam plak untuk jangka waktu yang lama, sedangkan berkumur dengan klorheksidin dan terapi penisilin oral tampaknya tidak memiliki efek jangka panjang pada infeksi *S. mutans*.^{140,141} Saat ini, klorheksidin dianggap sebagai agen antikariogenik standar, namun penggunaan secara teratur produk perawatan oral yang mengandung bahan kimia ini sering dikaitkan dengan berbagai efek merugikan.^{142,143,144,145} Selain itu, klorheksidin tidak efektif dalam menekan pertumbuhan spesies *Lactobacillus*, yang sangat terkait dengan evolusi karies.¹⁴² Oleh karena itu, semua masalah ini, memperkuat pentingnya menemukan senyawa antikariogenik baru.

Propolis merupakan bahan multifungsi yang digunakan oleh lebah dalam membangun dan memelihara sarangnya. Pemanfaatan propolis oleh manusia memiliki sejarah panjang, didahului hanya dengan penemuan madu. Tidak seperti

banyak obat alami lainnya, terdapat *database* substantif terhadap aktivitas biologis dan toksisitas propolis yang menunjukkan bahwa propolis memiliki banyak sifat fungsional seperti antibiotik, antijamur, antivirus dan antitumor, selain atribut lainnya. Meskipun laporan tentang reaksi alergi adalah tidak biasa atau jarang, propolis relatif tidak beracun, dengan tanpa memberi pengaruh (*no-effect level*, *NOEL*) dalam studi terhadap 90 tikus dengan dosis 1400 mg / kg bobot badan/hari.⁴⁶

Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa propolis menghambat pertumbuhan mutans streptococci.^{53,54} Mikroorganisme ini, terutama *S. mutans*, terlibat sebagai agen etiologi utama dari karies gigi pada hewan dan manusia.^{16,55,56} Selanjutnya, propolis dalam air minum⁵³ atau dioleskan mengurangi insidensi karies gigi pada tikus.¹²⁰

Komposisi kimia propolis sangat bervariasi dan bergantung pada asal geografisnya.^{66,146,147} Sebagai ilustrasi, sampai saat ini terdapat dua belas jenis propolis Brasil yang berbeda secara kimia telah dikarakterisasi.⁶⁰ Dua jenis di antaranya (satu dari Brazil Tenggara, tipe 12, dan yang lainnya dari Brazil Selatan, tipe 3) merupakan jenis yang kaya akan flavonoid dan asam sinamat dan menunjukkan kemampuan inhibisi yang luar biasa terhadap aktivitas beberapa glukosiltransferase (*GTFs*) yang telah dimurnikan secara *in vitro*.²⁴ *GTFs* memegang peranan penting dalam interaksi perekatan dengan *S. mutans* dan sangat penting dalam ekspresi virulensi oleh mikroorganisme ini.^{18,61,62,148} Glukan disintesis oleh *GTFs* tidak hanya mempromosikan akumulasi streptococci kariogenik pada permukaan gigi, tapi juga memberikan kontribusi yang signifikan terhadap pembentukan plak gigi.^{64,65} *S. mutans* menghasilkan setidaknya tiga *GTFs* yakni *GTF B*, yang mensintesis sebagian besar glukan terikat α 1-3 yang tak larut air; *GTF C*, yang mensintesis campuran glukan terikat α 1-6 yang tidak larut dan larut; dan *GTF D*, yang mensintesis glukan terlarut. *GTFs B* dan *C* tampaknya merupakan *GTFs* paling penting terkait dengan karies gigi.¹⁴⁸ Dilain pihak, flavonoid maupun turunan asam sinamat tidak terdeteksi pada jenis yang diklasifikasikan sebagai tipe 6 (dari Brazil Timur Laut, hutan Atlantik, negara bagian Bahia).⁶⁶ Namun, ekstrak etanol propolis tipe 6 (EEP)

menunjukkan aktivitas antimikroba yang luar biasa terhadap mikroorganisme patogen mulut, termasuk *S. mutans*.⁶⁷

Tiga puluh jenis senyawa dari tiga kelompok kimia (flavonoid, turunan asam sinamat dan terpenoida) yang teridentifikasi dalam propolis telah diuji kemampuannya secara individu dalam menghambat aktivitas *GTFs* dan pertumbuhan *S. mutans* dan *S. sobrinus*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa dua agen yang potensial sebagai antikaries-antiplak, yakni apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon) dan *tt*-farnesol (seskiterpena), masing-masing dengan aktivitas biologis yang berbeda. Apigenin menunjukkan daya inhibisi yang sangat efektif terhadap *GTFs*, terutama terhadap *GTF B* dan *GTF C*, sedangkan *tt*-farnesol sangat efektif sebagai agen antibakteri yang dapat dengan cepat menurunkan populasi *S. mutans*.¹⁴⁹ Mekanisme yang pasti mengenai inhibisi dari apigenin terhadap *GTFs* belum diketahui, namun dari data penelitian ini memberi beberapa masukan menyangkut mode dari aksi inhibisinya. Ikatan ganda antara karbon C-2 dan C-3 dari apigenin diperlukan dalam aksi inhibisi yang dapat bertindak sebagai kedudukan untuk adisi nukleofilik oleh rantai samping asam amino dalam *GTFs*, terutama residu asam aspartat sehingga menyebabkan inhibisi *GTFs*. Di lain pihak, terpena seperti farnesol telah dilaporkan dapat merusak fungsi membran sel, sehingga mereduksi viabilitas sel.¹⁵⁰

Penelitian lebih lanjut mengkaji efektivitas kariostatik dari kombinasi fluorida apigenin dan *tt*-farnesol. Apigenin (Api) dan *tt*-farnesol (Far) adalah dua agen alami yang mempengaruhi perkembangan biofilm kariogenik. Fluorida (F) secara fisiko-kimia mengganggu perkembangan karies dan juga menunjukkan aktivitas antibakteri. Gabungan Api dan Far meningkatkan sifat anti-karies F melalui aksi kooperatif terhadap ekspresi virulensi *S. mutans*. Efek biologis dari masing-masing agen sangat ditingkatkan bila digunakan dalam kombinasi dengan F. Secara umum, biofilm diperlakukan dengan Api dan / atau Far dalam kombinasi dengan F menunjukkan pengurangan biomassa, glukosa tidak larut dan polisakarida iodofilik dibanding yang diperlakukan hanya dengan Far atau Api saja ($P < 0,05$). Kombinasi dari Far dan Api dengan F sangat efektif dalam mencegah perkembangan karies pada tikus, khususnya Api + Far + F, dan

hasilnya sebanding dengan yang diamati dengan klorheksidin + F (kontrol positif). Hasil dari studi ini menunjukkan bahwa apigenin dan *tt*-farnesol dapat meningkatkan efektivitas kariostatik fluorida.¹²⁰

Duarte et al. (2003) mengkaji pengaruh fraksi/kelompok senyawa dalam propolis Brazil yang secara kimia diklasifikasikan sebagai propolis tipe 6 terhadap aktivitas *GTFs* dan pertumbuhan mutans streptococci.¹⁵¹ Fraksi dibedakan berdasarkan kelarutannya dalam berbagai polaritas pelarut (heksana, kloroform, etil asetat dan etanol). Hasil kajian ini menunjukkan bahwa senyawa aktif antibakteri dari propolis tipe 6 mempunyai karakter nonpolar dan merupakan sumber yang berharga untuk eksplorasi senyawa bioaktif baru dalam propolis. Penelitian ini juga memberi informasi menyangkut pengaruh sinergisme antar senyawa aktif dalam propolis.

Propolis tampaknya menjadi sumber agen baru yang menjanjikan dalam mencegah karies gigi dan penyakit mulut lainnya. Kandungan propolis berupa benzofenon terpoliisoprenilasi, galangin, pinobanksin, dan pinocembrin dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen oral dengan menghalangi aktivitas enzim *GTFs* dari bakteri pembentuk plak, terutama *S. mutans*. *GTFs* mempermudah pembentukan ikatan α -glukan dari sukrosa yang secara signifikan akan membentuk komposisi matriks polisakarida. Kumpulan matriks polisakarida ini akan menyebabkan plak glukan tersebut menginisiasi perlekatan dan akumulasi *S. mutans* pada gigi.

Propolis berkhasiat sangat efektif terhadap bakteri Gram positif, terutama terhadap *Staphylococcus aureus* dan terhadap bakteri gram negatif.^{49,51,52} Pengaruh propolis terhadap pertumbuhan dan aktivitas glukosiltransferase dari *S. sorbinus*, *S. mutans* dan *S.circuits* telah diobservasi secara *in vitro* dan *in vivo*, dan menunjukkan bahwa sintesis glukan tidak larut dan aktivitas *GTFs* diinhibisi oleh aksi ganda dari propolis.⁵³

2.3.3. Perkembangan dan Tren Baru Penelitian Propolis

Kombinasi studi antimikroba dan studi biologi lainnya dengan analisis kimia dari sampel propolis cenderung semakin banyak dipublikasikan. Teknik yang paling sering digunakan untuk analisis kimia adalah kromatografi gas-spektrometer massa (*GC-MS*)^{34,39,152,153} dan kromatografi cair kinerja tinggi (*HPLC*).^{154,155,156} Dalam penelitian terbaru, umumnya melibatkan karakterisasi kimia (analisis kualitatif) dari sampel untuk pengujian aktivitas antibakteri, sedangkan kuantifikasi terfokus pada kelompok utama zat bioaktif dari sampel tersebut.¹⁵⁷ Penggunaan sampel propolis terkarakterisasi secara kimia untuk eksperimen biologis adalah satu-satunya cara yang bermakna untuk mempelajari aktivitas biologis dan farmakologi propolis pada awal milenium ketiga.

Studi berdasarkan *chemical analysis-guided bioassay* merupakan tren yang sangat menjanjikan dalam penelitian propolis. Dengan menggunakan pendekatan ini, Chen et al. (2003) mengisolasi dua prenilflavon sitotoksik baru dari propolis Taiwan.¹⁵⁸ Kedua senyawa menunjukkan sifat sitotoksik pada tiga jenis sel kanker dan juga menunjukkan sifat *radical scavengers* yang potensial terhadap 1,1 difenil-2-pikrilhidrazil (*DPPH*). Banskota et al. (2002) mengisolasi komponen aktif dari propolis asal Belanda dengan aktivitas antiproliferatif terhadap *cancer cell lines*: asam ester fenetil cafeat (*CAPE*) dan beberapa analognya, termasuk dua ester gliseril baru dari asam sinamat tersubstitusi.¹⁵⁹ Senyawa yang sama ditemukan oleh Nagaoka et al. (2003) dari propolis Belanda yang bertanggung jawab atas aktivitas inhibisi-oksida nitrat.¹⁶⁰ Usia et al. (2002) mengisolasi sejumlah senyawa dari propolis Cina dengan aktivitas antiproliferatif.¹⁶¹ Kebanyakan dari senyawa tersebut merupakan konstituen propolis poplar yang telah dikenal, namun di antara mereka dua flavonoid baru yakni *2-methylbutyrouylpinobanskin* dan *6-cinnamylchrysin*. Dari propolis Yunani, turunan baru flavanon *7-prenylpinocembrin* telah diisolasi, bersama-sama dengan totarol dan *7-prenylistrobinin*, sebagai antibakteri utama yang penting.¹⁶²

Banskota et al. (2001) mengkaji propolis Brasil dalam rangka untuk mengidentifikasi zat dengan aktivitas hepatoprotektif dan terhadap *Helicobacter pylori*.¹⁶³ Mereka menemukan bahwa keaktifan ini terutama disebabkan oleh

komponen fenolik, tetapi asam diterpenik juga memberikan kontribusi terhadap aktifitas hepatoprotektif. Beberapa senyawa anti-HIV, turunan asam moronat, dan triterpenoid baru yang disebut melliferon diisolasi dari propolis Brasil.¹⁶⁴ Komponen utama dari propolis merah Kuba, nemorosone benzofenon terpenilasi, ditemukan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap beberapa *tumor cell lines* dan memiliki kemampuan sebagai *radical scavenging*.¹³¹

Tren yang paling menarik dalam penelitian propolis adalah studi perbandingan sifat biologis propolis dari lokasi geografis yang berbeda dan komposisi kimia yang berbeda. Kujumgiev et al. (1999) membandingkan aktivitas antimikroba (antibakteri, antijamur dan antivirus) dan komposisi kimia propolis dari asal geografis beragam. Hasil yang disajikan memberi bukti yang jelas bahwa meskipun perbedaan besar dalam komposisi kimia propolis dari lokasi geografis yang berbeda, semua sampel menunjukkan aktivitas antibakteri dan antijamur (dan kebanyakan dari mereka antivirus) yang signifikan.¹⁶⁵

Penelitian ini dengan jelas menunjukkan bahwa dalam sampel yang berbeda, kombinasi zat yang berbeda adalah penting untuk aktivitas biologis propolis. Berdasarkan pendekatan perbandingan, Popova et al. (2004) mencari korelasi statistik yang signifikan antara aktivitas biologis dan asal geografis sampel propolis.¹⁶⁶ Analisis variansi digunakan untuk membandingkan aksi antibakteri dari tiga kelompok propolis Eropa, Brasil dan Amerika Tengah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa propolis dari Eropa dan Brasil memiliki aktifitas yang sama meskipun perbedaan drastis dalam komposisi kimia. Aktivitas antibakteri mereka secara signifikan lebih tinggi dari propolis Amerika Tengah. Analisis variansi juga digunakan untuk membandingkan toksisitas dari tiga kelompok propolis yang sama dengan *Artemia salina* (Crustaceae). Hasil yang diperoleh memperlihatkan tidak ada korelasi yang signifikan antara asal geografis dan potensi sitotoksitas. Hal ini menunjukkan bahwa pencarian senyawa sitotoksik baru yang menjanjikan dalam sumber-sumber propolis yang baru adalah wajar.

Aktivitas sitotoksik, hepatoprotektif dan *free radical scavenging* propolis dari Brasil, Peru, Belanda dan China dibandingkan oleh Banksota et al. (2000).¹⁶⁷ Mereka menemukan bahwa propolis dari Belanda dan Cina memiliki aktivitas

sitotoksik kuat, sedangkan hampir semua sampel memiliki aktivitas hepatoprotektif signifikan. Aktivitas *scavenging* terhadap radikal bebas DPPH dari seluruh sampel adalah serupa, hanya sampel Peru menunjukkan aktivitas *scavenging* yang lemah.

Sálomáo et al. (2004) membandingkan aktivitas mikobisidal dari propolis Brasil dengan Bulgaria dan komposisi kimianya dianalisis dengan *High Temperature – High Resolution Gas Chromatography – Mass Spectrometry (HT-HRGC-MS)*, dan menemukan bahwa meskipun komposisi mereka sama sekali berbeda, mereka aktif terhadap *Trypanosoma cruzi* dan beberapa jamur patogen.¹⁶⁸

Kumazawa et al. (2004) membandingkan aktivitas antioksidan propolis dari berbagai asal usul geografis (Argentina, Austria, Brazil, Bulgaria, Chile, Cina, Hongaria, Selandia Baru, Afrika Selatan, Thailand, Ukraina, Uruguay, Amerika Serikat dan Uzbekistan) dan data ini dikombinasikan dengan analisis kimia. Konstituen utama dari sampel yang diuji diidentifikasi menggunakan *HPLC* dengan deteksi *photo-diode array* dan *mass spectrometric*. Tujuh belas senyawa fenolik dalam 16 jenis propolis diidentifikasi dan dikuantifikasi dengan *HPLC*.¹⁶⁹ Propolis dengan aktivitas antioksidan yang kuat mengandung senyawa antioksidan seperti kaempferol dan fenetil kafeat. Dengan cara yang sama, aktivitas antioksidan dan kandungan kimia dari propolis dari berbagai daerah di Jepang dibandingkan oleh kelompok peneliti yang sama. Mereka menyimpulkan bahwa aktivitas antioksidan yang kuat berkorelasi dengan konsentrasi tinggi asam kafeat dan fenetil kafeat. Selain itu, propolis dari Okinawa ditemukan memiliki jenis antioksidan yang tidak sama dengan propolis dari daerah lain.

Mengikuti model yang sama, Chen et al. (2004) membandingkan aktivitas *radical scavenging*, efek sitotoksik dan induksi apoptosis pada sel melanoma propolis Taiwan dari berbagai lokasi.¹⁷⁰ Propolis (flavanon C-terprenilasi) dalam sampel dideteksi dengan *HPLC*, dan kandungan fenol total ditentukan dengan spektrofotometri. Konsentrasi tinggi propolis ditemukan menjadi penting untuk induksi apoptosis pada sel melanoma manusia dan sifat antiradikal.

2.3.4 Teknik Ekstraksi Bahan Bioaktif Propolis

Secara umum, ekstraksi adalah pemisahan yang didasarkan pada distribusi komponen sampel ke dalam dua sistem/fase yang tidak bercampur (cair-cair atau cair padat). Dengan demikian, ekstraksi bahan bioaktif propolis adalah pemisahan komponen bioaktif dari sampel propolis menggunakan pelarut selektif (bahan bioaktif terlarut dalam pelarut dan meninggalkan residu jaringan seluler tak larut). Dalam hal propolis, pelarut yang paling sering digunakan adalah etanol dengan berbagai konsentrasi. Bankova et al.(1992) menunjukkan bahwa etanol 70% dapat mengekstrak sebagian besar komponen aktif propolis tanpa adanya wax.¹⁷² Propolis umumnya mengandung wax hingga 20-30% dan pelarut ini telah diterapkan dalam banyak studi. Berbagai teknik ekstraksi digunakan untuk memperoleh komponen bioaktif propolis, mulai dari teknik konvensional (maserasi, soxhletasi, refluks) hingga ke teknik yang lebih maju/modern (ekstraksi berbantuan gelombang mikro, ekstraksi ultrasonik, ekstraksi fluida superkritis).

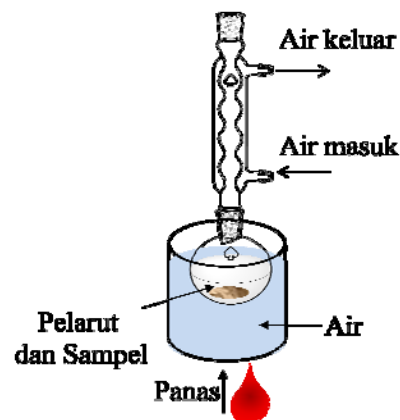
2.3.4.1 Maserasi^{171,172}

Prinsip dan mekanisme umum yang terlibat dalam maserasi, yakni ekstraksi konstituen terlarut dari bahan padat menggunakan pelarut, dan secara umum disebut sebagai *leaching* (pencucian). Proses leaching pada dasarnya melibatkan pelarutan/dissolusi fisik sederhana. Proses ekstraksi dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti laju perpindahan pelarut ke dalam massa sampel, laju solubilisasi dari konstituen terlarut oleh pelarut, dan laju perpindahan larutan (pelarut + zat terlarut) keluar dari material tak larut.

Prosedur umum maserasi terdiri dari menempatkan sampel dalam bentuk potongan-potongan yang sesuai atau dalam bentuk bubuk agak kasar dalam wadah tertutup dan ditambahkan pelarut selektif. Sistem dibiarkan selama ≥ 2 hari, bergantung matriks sampel, dengan sewaktu-waktu dikocok. Pada akhir proses maserasi, bila kesetimbangan telah tercapai, cairan dipisahkan dari residu padat dengan penyaringan. Terhadap residu dicuci 2 sampai 3 kali dengan pelarut yang sama, disaring dan digabung dengan cairan akhir proses maserasi.

2.3.4.2 Refluks ¹⁷¹

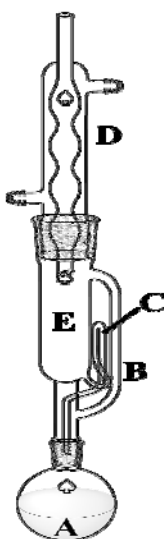
Prinsip dan mekanisme refluks yakni dissolusi fisik sederhana (leaching) dengan pemanasan dan pendinginan kontinu selama jangka waktu tertentu. Prosedur refluks meliputi pencampuran sampel dengan pelarut selektif, pemanasan larutan sampel, kondensasi uap ke dalam campuran/larutan panas dan kedua proses pemanasan dan pendinginan/kondensasi berlangsung berulang. Pemanasan dalam hal ini dikendalikan pada suhu tertentu sesuai kebutuhan. Pada dasarnya teknik ini digunakan untuk ekstraksi komponen yang termostabil.



Gambar 2.4 Alat refluks (Sumber Handa et al, 2008)

2.3.4.3 Ekstraksi Kontinu dengan Pemanasan Menggunakan Soxhlet ¹⁷¹

Prinsipnya serupa dengan refluks, hanya dalam hal ini sampel dan pelarut berada dalam ruang terpisah.



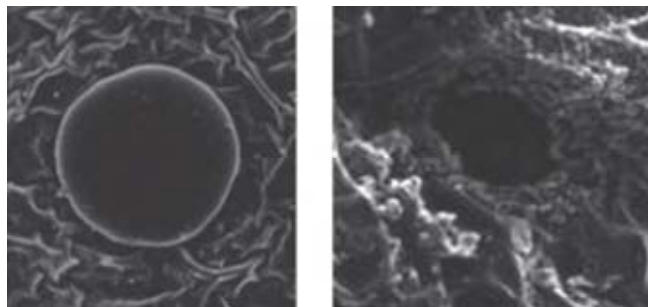
Dengan teknik ini, sampel dimasukkan ke dalam wadah berpori (thimble) yang terbuat dari kertas saring dan diletakkan dalam ruang E pada alat soxhlet (gambar 2.5). Pelarut pengeksrak dipanaskan dalam labu A, uapnya akan terkondensasi pada kondensor D, masuk ke dalam ruang sampel E dan mengekstrak sampel. Ketika cairan dalam ruang E mencapai puncak pada tabung siphon C, cairan akan tersedot ke labu A. Proses ini berlangsung berulang hingga semua komponen terlarut keluar dari matriks sampel.

Gambar 2.5 Alat Soxhlet (Sumber Handa et al, 2008)

2.3.4.4 Ekstraksi Berbantuan Gelombang Mikro^{171,172}

Ekstraksi berbantuan gelombang mikro adalah proses menggunakan energi gelombang mikro untuk memanaskan pelarut yang berada dalam kontak dengan sampel dan mengakibatkan beberapa komponen kimia terpartisi dari matriks sampel ke dalam pelarut.

Secara garis besarnya Mekanisme ekstraksi dengan metode ini adalah panas dari irradiasi gelombang mikro ditransfer ke sistem ekstraksi secara intens, menyebabkan pemanasan seketika dan menciptakan tekanan uap tinggi. Tekanan uap yang tinggi ini akan memecah matriks sampel dan mengeluarkan kandungan yang ada di dalamnya. Sebagai ilustrasi, irradiasi gelombang mikro pada kelenjar tanaman mint mengakibatkan pemecahan kelenjar mint dan melepaskan minyak yang terjebak di dalamnya (gambar 2.6).



Gambar 2.6 Kelenjar *mint* (A) sebelum dan (B) setelah irradiasi gelombang mikro (Sumber Handa et al, 2008)

Ekstraksi berbantuan gelombang mikro merupakan teknik ekstraksi yang tercepat diantara teknik ekstraksi lainnya saat ini dengan rendemen ekstraksi yang tinggi. Namun, selektivitasnya rendah seperti yang ditunjukkan dalam ekstraksi konstituen bioaktif propolis. Dalam hal ini, wax yang tidak diinginkan juga terikut dalam cairan pengekstrak. Selain itu, perpanjangan waktu iradiasi mengakibatkan penurunan persentase komponen aktif yang terekstraksi, mungkin karena proses degradasi.

2.3.4.5 Ekstraksi Berbantuan Gelombang Ultrasonik (Sonikasi) ^{171,172}

Prosedur ekstraksi melibatkan penggunaan gelombang ultrasonik (frekuensi 20 kHz sampai 2000 kHz); Proses ini meningkatkan permeabilitas sel dinding dan menghasilkan kavitasi. Teknik ini jauh lebih cepat dibanding metode maserasi konvensional dan kurang cepat dibanding teknik ekstraksi berbantuan gelombang mikro. Meskipun proses ini berguna dalam beberapa kasus, namun aplikasinya dalam skala besar terbatas karena biaya yang lebih tinggi. Salah satu kelemahan dari teknik ini adalah adanya efek merusak dari energi ultrasonik (lebih dari 20 kHz) terhadap komponen bioaktif melalui pembentukan radikal bebas.

2.3.4.6 Ekstraksi Fluida Superkritis (EFS) ¹⁷¹

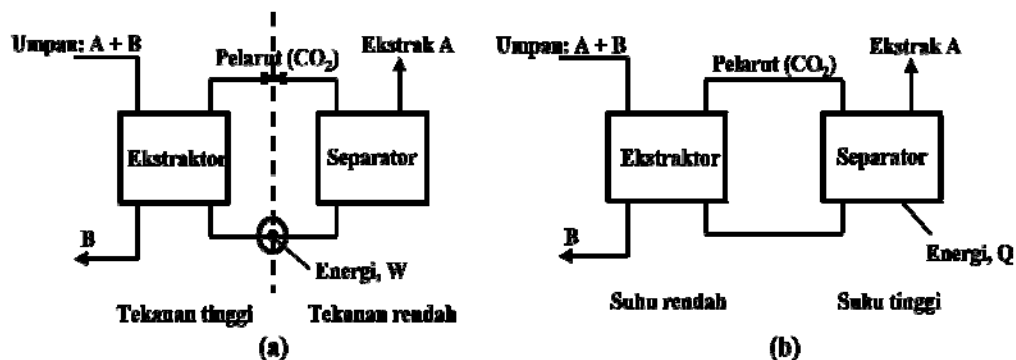
Fluida superkritis merupakan pelarut alternatif untuk ekstraksi molekul bioaktif dari bahan alam. Alasan utama penggunaan ekstraksi fluida superkritis adalah kemungkinan melakukan ekstraksi pada suhu sekitar suhu ruang, sehingga mencegah substansi yang diinginkan tidak mengalami degradasi termal.

Pada kondisi yang sesuai, fluida apapun dapat mencapai keadaan superkritisnya. Namun, hanya fluida yang memiliki temperatur kritis tidak jauh dari suhu ruang lebih dipilih untuk digunakan sebagai pelarut alternatif untuk ekstraksi komponen bioaktif bahan alam. Karbon dioksida (CO₂), dengan $T_C = 31,06^\circ \text{C}$ dan $P_C = 73,81 \text{ bar}$, adalah pelarut yang paling menarik, karena sifatnya yang ditinjau dari segi toksisitas, *flammability* dan biaya. Disamping itu produk ekstraksi yang diperoleh bebas dari pelarut organik.

Proses ekstraksi fluida superkritis pada dasarnya terdiri dari dua bagian utama (Gambar 2.7a) yakni perangkat ekstraktor dan perangkat pemisahan (separator). Umpan (sampel) yang mengandung substansi yang diinginkan (A), mengadakan kontak dengan fluida superkritis pada suhu dan tekanan yang sesuai, dalam perangkat ekstraksi. Dalam skema sederhana ini, komponen A secara selektif diekstraksi dan harus diperoleh kembali dari larutan superkritis pada bagian perangkat pemisahan yang suhu dan tekanannya dapat disesuaikan agar jumlah A yang dihasilkan optimal. Setelah produk yang diinginkan diperoleh, pelarut didaur ulang dan dipompa kembali ke ekstraktor untuk meminimisasi biaya operasional.

Jika suhu dijaga konstan, pemisahan produk dicapai melalui *depressurization* (gambar 2.7a), dan energi mekanik harus diberikan ke sistem untuk meningkatkan tekanan CO₂ dari separator ke kondisi ekstraktor. Disisi lain, produk ekstraksi dapat juga dipisahkan dari CO₂ dengan meningkatkan suhu, dan dalam hal ini energi termal harus diberikan (gambar 2.7b). Sirkulasi pelarut dapat dilakukan pada kondisi hampir isobarik. Tentu saja, cara pemisahan produk dari CO₂ dicapai dapat lebih kompleks; misalnya, baik suhu dan tekanan dapat divariasikan ketika melewati dari sektor ekstraktor ke sektor separator.

Aplikasi teknik ekstraksi fluida superkritis pada propolis, umumnya mengarah pada ekstraksi selektif kelompok senyawa tertentu.^{173,174,175} Ekstraksi Fluida superkritik adalah sebuah proses yang menarik untuk produksi ekstrak alami karena merupakan proses yang bersih. Fraksinasi ekstrak etanol propolis kering dengan teknik ini adalah penting untuk mengeksplorasi potensi aplikasi dan sifat biologis fraksinya.



Gambar 2.7 Blok diagram alir proses ekstraksi fluida superkritis sederhana: dengan proses pemisahan melalui perubahan tekanan (a) dan perubahan suhu (b) (Sumber Handa et al, 2008)

2.4. Kerangka Teori

Proses terjadinya karies adalah multifaktor yang saling berinteraksi, yakni host (gigi dan saliva), mikroorganisme terutama bakteri, substrat dan waktu. Faktor lain yang turut mempengaruhi adalah faktor pendidikan, status sosial, pola makan, pekerjaan, bahkan budaya manusia itu sendiri. Salah satu spesies bakteri

yang dominan dalam mulut dan merupakan penyebab utama timbulnya karies gigi yaitu *S. mutans*.

Berbagai penelitian membuktikan adanya korelasi positif antara jumlah bakteri *S. mutans* pada plak gigi dengan prevalensi karies. *S. mutans* mampu mensintesis polisakarida ekstraseluler (glukan) dari sukrosa. Glukan dapat mempromosikan akumulasi *Streptococci* kariogenik pada permukaan gigi dan memberikan kontribusi yang signifikan terhadap pembentukan biofilm. Selanjutnya diikuti dengan proses homofermentasi menghasilkan asam laktat yang menyebabkan terjadinya proses demineralisasi jaringan keras gigi. *S. mutans* juga telah divalidasi sebagai model untuk menguji pengaruh agen antimikroba terhadap pertumbuhan biofilm dan demineralisasi enamel. Oleh karena itu bakteri ini menjadi target utama dalam upaya mencegah terjadinya karies.

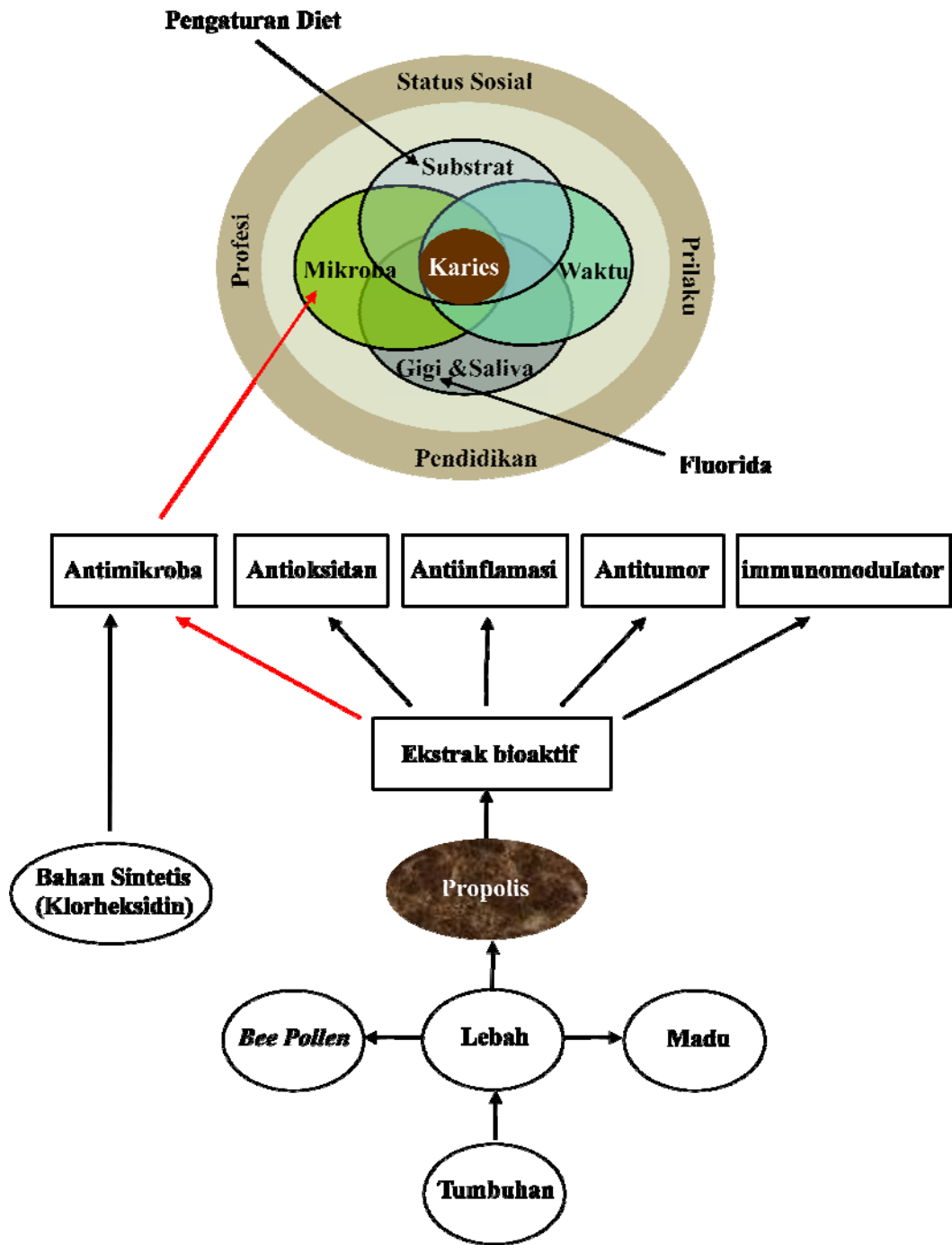
Berbagai macam tindakan pencegahan telah dikembangkan di antaranya penyuluhan tentang kesehatan gigi dan mulut, aplikasi fluor, dan penggunaan bahan antimikroba. Agen antimikroba, telah terbukti mengurangi aktivitas karies. Saat ini, klorheksidin dianggap sebagai agen antikariogenik standar, namun penggunaan secara teratur produk perawatan oral yang mengandung bahan kimia ini sering dikaitkan dengan berbagai efek merugikan dalam jangka waktu yang lama. Para ilmuwan masih terus mencari agen terapeutik baru untuk pencegahan dan pengobatan. Toksisitas, ulserasi mukosa, dan pengembangan strain bakteri resisten adalah efek samping yang ditemukan dengan beberapa agen antibakteri. Adanya efek-efek yang merugikan dari bahan sintetik pencegah karies gigi yang ada saat ini, memotivasi penggunaan obat dari bahan alami untuk penyakit karies. Hal ini memperkuat pentingnya menemukan bahan antikariogenik baru, di antaranya dengan pemanfaatan bahan alam sebagai salah satu alternatif di bidang kedokteran gigi pencegahan. Pendekatan ini merupakan strategi yang diharapkan dapat melindungi gigi dari proses karies melalui intervensi terhadap interaksi bakteri dengan permukaan gigi.

Propolis adalah bahan alami tidak beracun dikumpulkan oleh lebah dari berbagai sumber tanaman dan telah digunakan dalam pengobatan sejak ratusan tahun. Telah diketahui bahwa propolis menunjukkan beberapa aktivitas biologis.

Komposisi kimia propolis sangat kompleks; flavonoida dan turunan (hidroksil) asam sinamat telah dianggap sebagai senyawa biologis aktif utama. Flavonoida telah dikenal sebagai senyawa tumbuhan yang mempunyai khasiat sebagai antibakteri, antijamur, antivirus, antioksidan dan antiinflamasi. Salah satu propolis yang berasal dari Indonesia adalah jenis *Trigona* spp., namun belum diketahui golongan senyawa berkhasiat sebagai agen anti karies. Kajian terhadap propolis Indonesia, terutama yang berhubungan dengan aktivitas anti karies relatif masih kurang.

Dalam penelitian yang dilakukan, beberapa aspek yang dikaji meliputi penelusuran metode ekstraksi bahan aktif yang optimal, penentuan daya hambat terhadap *S.mutans* dari ekstrak bioaktif, berbagai fraksi dari ekstrak bioaktif yang diikuti dengan penetapan profil kimia melalui *HPLC*, uji aktivitas antimikroba dan pemilihan varian bioaktif terbaik, uji karakteristik *adherence* terhadap varian terpilih, dan identifikasi komponen kimia dari varian terpilih. Dari data kajian tersebut Dari data kajian tersebut diperoleh agen antikaries yang potensial dan terkarakterisasi. Diagram kerangka teori menyangkut pencegahan karies dengan berbagai agen antikaries disajikan dalam gambar 2.8.

Hingga kini penelitian tentang propolis Indonesia dalam aplikasinya sebagai agen antikaries masih terbatas. Sejauh penelusuran yang dilakukan, belum ditemukan kajian senyawa bioaktif secara rinci sampai ketinggian individu molekuler atau komponen prinsipal menyangkut anti karies. Keanekaragaman sumber daya hayati Indonesia sebagai sumber bahan baku produksi propolis oleh lebah, memberi peluang yang menantang untuk mengkaji khasiat propolis Indonesia sebagai agen antikaries hingga ke tingkat molekuler. Propolis dapat diaplikasi dalam berbagai bentuk produk seperti pasta gigi, obat kumur, tablet, sabun dan telah digunakan untuk berbagai keperluan serta memiliki peran yang menjanjikan dalam pengobatan di masa depan.

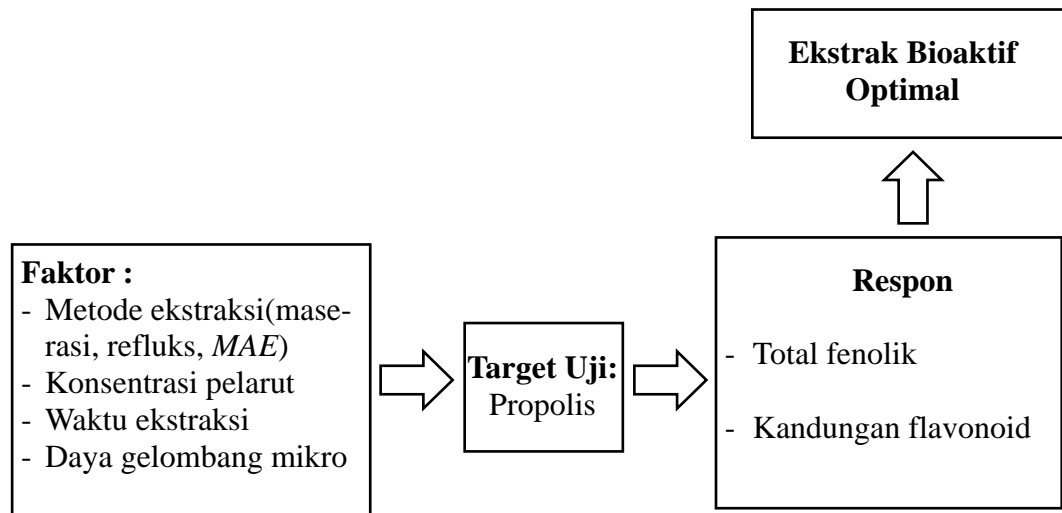


Gambar 2.8 Kerangka teori

BAB 3
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konsep

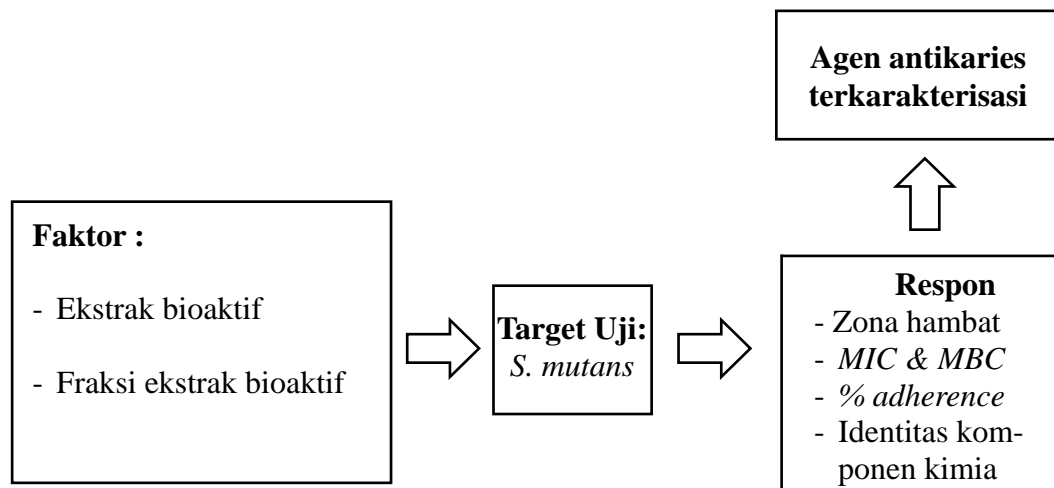
3.1.1. Propolis → Ekstrak bioaktif



MAE = ekstraksi berbantuan gelombang mikro

Gambar 3.1. Kerangka konsep untuk memperoleh *crude extract* bioaktif optimal dari propolis *Trigona* spp.

3.1.2. Ekstrak bioaktif → Agen anti karies terkarakterisasi



Gambar 3.2. Kerangka konsep untuk memperoleh agen antikaries terkarakterisasi dari ekstrak bioaktif propolis *Trigona* spp.

Dimulai dengan pemilihan metode ekstraksi agar diperoleh ekstrak yang dapat menggambarkan daya kerja bioaktif dan informasi molekuler yang optimal. Selanjutnya metode terpilih digunakan untuk memperoleh ekstrak bioaktif yang kemudian difraksinasi menghasilkan berbagai varian fraksi.

Terhadap ekstraksi bioaktif dan berbagai varian fraksinya dilakukan uji aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans* dan dievaluasi untuk memperoleh peringkat terbaik. Akhirnya terhadap varian peringkat terbaik dikarakterisasi melalui parameter: *MIC*, *MBC*, aktivitas *anti-adherence*, dan identitas kimia.

3.2. Hipotesis

3.2.1. Hipotesis Mayor:

Ekstrak bioaktif propolis *Trigona* spp. asal Banten yang mengandung komponen antikaries dapat ditetapkan

3.2.2. Hipotesis Minor:

Berbagai aspek yang dapat ditetapkan, meliputi:

3.2.2.1. Teknik ekstraksi terbaik untuk memperoleh ekstrak bioaktif dari propolis *Trigona* spp.

3.2.2.2. Profil senyawa dalam ekstrak bioaktif dan fraksinya

3.2.2.3. Fraksi ekstrak bioaktif propolis *Trigona* spp. yang memiliki efek antimikroba penyebab karies terbaik

3.2.2.4. Nilai *MIC*, *MBC* dan karakteristik *adherence* terhadap *S. mutans* dari ekstrak bioaktif dan fraksi ekstrak bioaktif terbaik

3.2.2.5. Sensitivitas relatif antibakteri terhadap *S. mutans* dari fraksi terbaik

3.2.2.6. Identitas komponen kimia dari fraksi ekstrak bioaktif terbaik

BAB 4

METODE PENELITIAN

Kajian senyawa bioaktif propolis *Trigona* spp sebagai agen antikaries dilakukan sesuai diagram alir yang disajikan pada gambar 4.1. Berdasarkan diagram alir ini, dapat dikelompokkan lima tahapan berikut:

- *Sampling* dan preparasi sampel propolis
- Pemilihan metode ekstraksi senyawa bioaktif dan aplikasi metode terpilih untuk memperoleh ekstrak bioaktif.
- Fraksinasi ekstrak bioaktif
- Uji aktivitas anti-mikroba dari ekstrak dan fraksinya serta pemilihan varian fraksi bioaktif terbaik
- Uji karakteristik *adherence* dan identifikasi komponen kimia varian bioaktif terbaik sebagai agen anti karies

4.1 *Sampling* dan Preparasi Sampel Propolis

4.1.1. Tempat dan Waktu Kegiatan

Tempat : - Provinsi Banten (*S* 6° 17' 61" dan *E* 106° 04' 27")

- Laboratorium Terpadu IPB

Waktu : Juni - Juli 2011

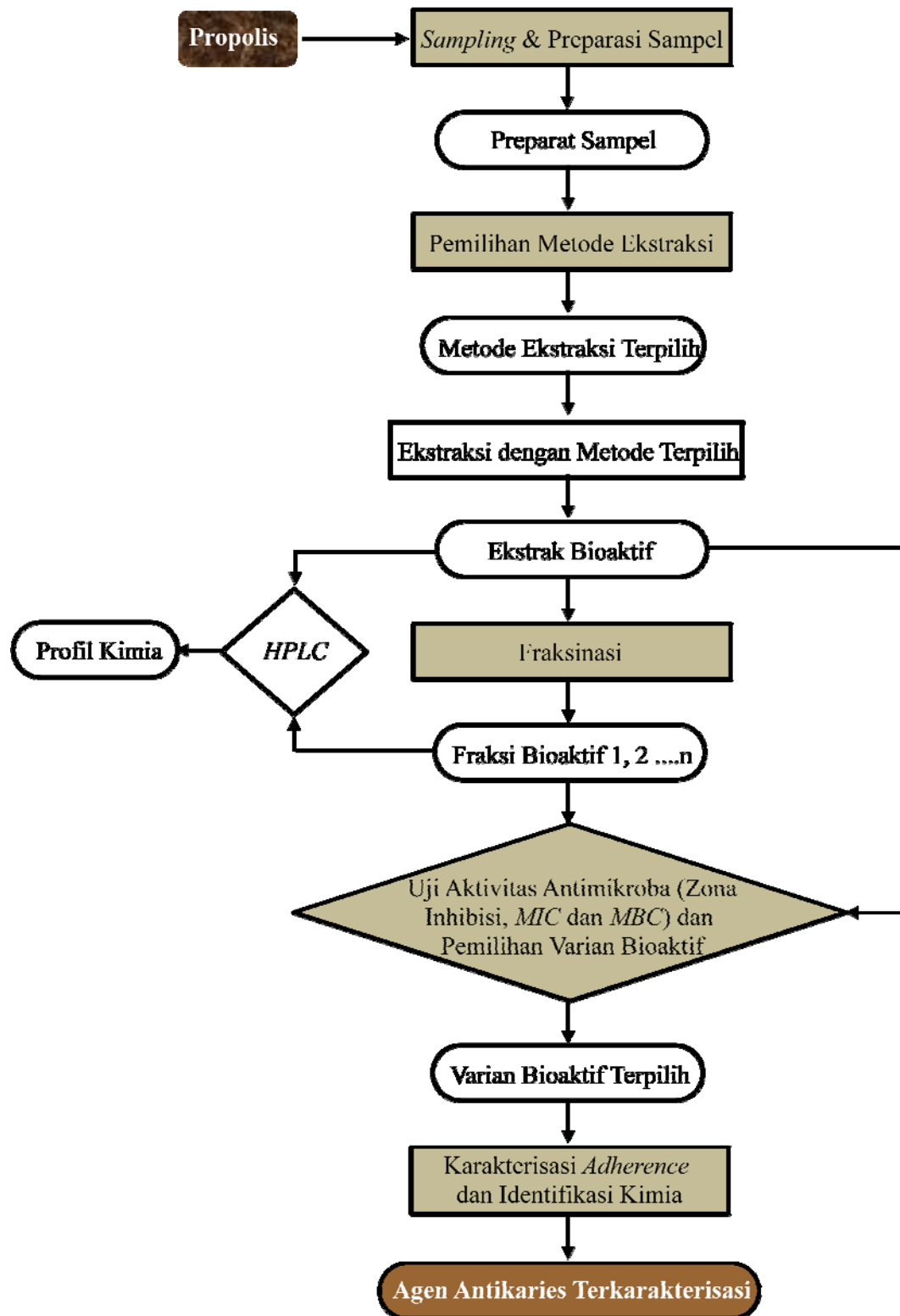
4.1.2. Bahan dan Alat

Bahan : - Sarang lebah *Trigona* spp

Alat : - Lemari pendingin (*General, Gensui*)

- *Waring blender* (*Waring 700G*)

- Wadah gelas tertutup



Gambar 4.1 Diagram Alir Penelitian

4.1.3. Prosedur

Propolis dipisahkan dari sarang lebah (*stingless Bees, Meliponini: Trigona*) yang di *sampling* secara acak di daerah Banten. Sampel propolis kemudian dimasukkan ke dalam wadah plastik dan disimpan dalam lemari pendingin ($- 20^{\circ}\text{C}$) selama 24 jam, selanjutnya digerus dengan *waring blender* hingga diperoleh preparat berbentuk bubuk (80-100 mesh). Preparat yang diperoleh kemudian disimpan kembali ke lemari pendingin untuk selanjutnya akan digunakan dalam tahapan penelitian berikutnya.

4.2 Pemilihan Teknik Ekstraksi Senyawa Bioaktif

4.2.1. Tempat dan Waktu Kegiatan

Tempat : Laboratorium Terpadu IPB

Waktu : Agustus-Oktober 2011

4.2.2. Bahan dan Alat

Bahan :

- Preparat sampel propolis
- Bahan kimiawi dengan spesifikasi *analytical grade* (Merck) seperti: etanol, kalium asetat, 2,4-dinitrofenilhidrazin, KOH, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, asam galat standar, quercetin standar, pereaksi Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3 dan aquadest

Alat :

- Perangkat refluks
- *Microwave* (Panasonic NN-S215, 800w) dilengkapi dengan kondensor
- *Shaker*
- Perangkat gelas (gelas piala, gelas ukur, Erlenmeyer, labu ukur, pipet ukur)
- Spektrofotometer *UV-Vis* (*Shimadzu Pharma Spec UV-1700*)
- Neraca analitik (Mettler AE 100)

4.2.3. Prosedur

Tiga teknik ekstraksi yang akan diuji, yakni: maserasi, refluks dan ekstraksi berbantuan gelombang mikro (*MAE*).

4.2.3.1 Teknik Maserasi

Maserasi dilakukan dengan mengacu ke metode Trusheva et al. (2007) dengan sedikit modifikasi.¹⁷²



Gambar 4.2. Ekstraksi dengan metode maserasi
(Foto di laboratorium Terpadu IPB)

5g bubuk propolis diekstraksi dengan 50 ml pelarut pengeksrak (etanol 55-85% v/v), dibiarkan dan dikocok secara berkala pada suhu ruang dengan variasi waktu 14-82 jam. Ekstrak dipisahkan dari residu dengan cara disentrifugasi (1500 g, 5 menit, suhu ruang). Residu dicuci dengan 2 x 10 ml pelarut pengeksrak , sentrifugasi dan cairan digabung dengan cairan ekstrak awal.



Gambar 4.3. Sentrifugasi ekstrak (Foto di laboratorium Terpadu IPB)

Cairan ekstrak selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin (5°C) untuk analisis lanjut.

4.2.3.2 Teknik Refluks

Ekstraksi dengan cara refluks mengacu ke metode yang digunakan oleh Park et al.(1995) dan Alencar et al., (2007) dengan sedikit modifikasi.^{176,177} 5g bubuk propolis ditambahkan dengan 50 ml pelarut pengeksrak (etanol 55-85% v/v) dan direfluks di penangas air (suhu 70°C) dengan variasi waktu 10-140 menit .



Gambar 4.4. Ekstraksi dengan metode refluks (Foto di laboratorium Terpadu IPB)

Ekstrak dipisahkan dari residu dengan cara sentrifugasi. Residu dicuci dengan 2 x 10 ml larutan pengeksrak , sentrifugasi (1500 g, 5 menit, suhu ruang) dan cairan digabung dengan cairan ekstrak awal. Cairan ekstrak selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin (5°C) untuk analisis lanjut.

4.2.3.3 Teknik Ekstraksi Berbantuan Gelombang Mikro (MAE)

Ekstraksi berbantuan gelombang mikro dilakukan dengan mengacu ke metode Trusheva et al. (2007).¹⁷²



Gambar 4.5. Ekstraksi berbantuan gelombang mikro
(Foto di laboratorium Terpadu IPB)

5g bubuk propolis ditambahkan 50 ml pelarut pengeksrak (etanol 55-85% v/v) dalam wadah gelas diirradiasi dengan gelombang mikro menggunakan perangkat gelombang mikro Panasonic NN-S215WF, 800 w dengan variasi waktu 6-34 menit. Ekstrak dipisahkan dari residu dengan cara sentrifugasi.

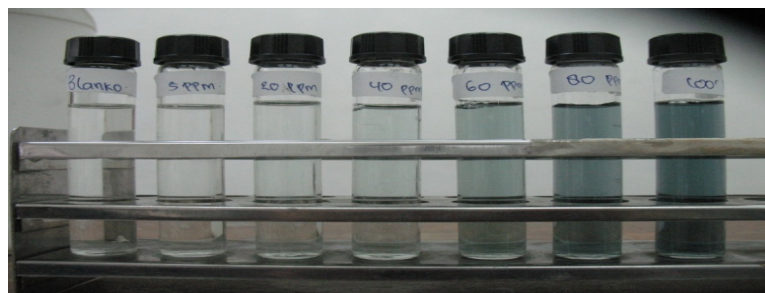
Residu dicuci dengan 2 x 10 ml larutan pengeksrak , sentrifugasi (1500 g, 5 menit, suhu ruang) dan cairan digabung dengan cairan ekstrak awal. Cairan ekstrak selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin (5°C) untuk analisis lanjut.

Masing-masing dari ketiga metode ekstraksi tersebut selanjutnya dioptimasi, melibatkan variabel waktu ekstraksi, konsentrasi pelarut pengeksrak (etanol) dan daya gelombang mikro dengan respon kandungan polifenol (total fenolik dan flavonoid). Data yang diperoleh diolah dengan metode respon permukaan¹⁷⁹ menggunakan perangkat lunak *Minitab-14* yang secara rinci disajikan pada paragraf rancangan percobaan dan analisis statistik. Dari ketiga metode yang optimal kemudian dipilih yang paling efektif mengeksraksi komponen bioaktif ditinjau dari waktu ekstraksi, konsumsi pelarut pengeksrak dan rendemen komponen bioaktif.

Penetapan kandungan polifenol dan flavonoid mengacu ke metode yang digunakan oleh Trusheva et al.(2007)¹⁷² .

4.2.3.4 Penetapan Kandungan Total Fenolik dan Flavonoida

Kandungan total fenolik dalam ekstrak etanol propolis ditentukan dengan metode kolorimetrik Folin-Ciocalteu (Singleton et al, 1999.)¹⁷⁹ dengan mencampur 0.5 mL alikuot (1:25) dengan 2.5 ml reagen Folin-Ciocalteu yang diencerkan menjadi 1:10 dan 2,0 mL Na₂CO₃ 4%.



Gambar 4.6. Larutan standar (asam galat) untuk penetapan kandungan total fenolik dalam ekstrak etanol propolis (Foto di laboratorium Terpadu IPB)

Absorbansi diukur pada 740 nm setelah dua jam diinkubasi dalam ruang gelap pada suhu kamar. Kandungan total fenolik dinyatakan sebagai setara asam galat (g asam galat/100g sampel).



Gambar 4.7 Larutan sampel ekstrak etanol propolis (a) dan larutan standar (quercetin) untuk penetapan kandungan flavonoid (b) (Foto di laboratorium Terpadu IPB)

Kandungan flavonoid total dalam ekstrak etanol propolis ditentukan sesuai dengan metode Park et al. (1995)¹⁷⁶, dengan beberapa modifikasi. 0,5 mL alikuot (1:10) dicampur dengan 4,3 mL etanol 80%, 0,1 mL $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 10% dan 0,1 mL kalium asetat 1M. Setelah 40 menit pada suhu ruang, absorbansi diukur pada 415 nm dengan spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu Pharma Spec UV-1700).



Gambar 4.8. Pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV-VIS (Foto di laboratorium Terpadu IPB)

Kandungan flavonoid dihitung sebagai setara quercetin (g quercetin / 100g sampel).



Gambar 4.9. Pengukuran kandungan total fenolik dan flavonoid dengan spektrofotometer UV-VIS (Foto di laboratorium Terpadu IPB)

4.2.4. Rancangan Percobaan dan Analisis Statistik

Optimasi parameter ekstraksi secara maserasi dan refluks dilakukan menggunakan *response surface methodology* dengan rancangan *central composite*.¹⁸⁴ Konsentrasi etanol sebagai pelarut dan waktu ekstraksi diambil sebagai variabel bebas. Kedua variabel yang dipilih tersebut dinyatakan sebagai x_1 dan x_2 , dan diformulakan ke dalam lima level, dikode dari yang tertinggi hingga terendah berturut-turut sebagai + 1.414, +1, 0, -1 dan -1.414. Kisaran dan level dari variable bebas dalam optimasi metode maserasi dan refluks disajikan pada Tabel 4.1. Respon yang digunakan untuk mengetahui pengaruh kedua variabel tersebut terhadap proses ekstraksi adalah rendemen total fenolik dan flavonoid dari ekstrak yang dihasilkan.

Tabel 4.1. Kisaran dan level variabel bebas dalam optimasi ekstraksi dengan metode maserasi dan refluks

Variabel bebas	Simbol	Level				
		-1.414	-1	0	+1	+1.414
Konsentrasi etanol (%)	x_1	56	60	70	80	84
Waktu , jam, (maserasi)	x_2	14	24	48	72	82
Waktu, menit, refluks	x_2	12	30	75	120	140

Dalam hal *MAE*, optimasi parameter ekstraksi dilakukan menggunakan rancangan faktorial lengkap dengan variable bebas berupa konsentrasi etanol (x_1), waktu ekstraksi (x_2), dan daya irradiasi gelombang mikro (x_3). Ketiga variabel tersebut diformulakan ke dalam tiga level, dikode +1, 0, -1 berturut-turut untuk nilai tertinggi, *intermediate* dan terendah. Kisaran dan level dari variable bebas dalam optimasi metode disajikan pada Tabel 4.2. Respon yang digunakan untuk mengetahui pengaruh ketiga faktor tersebut terhadap proses ekstraksi adalah rendemen total fenolik dan flavonoid dari ekstrak yang dihasilkan.

Tabel 4.2. Kisaran dan level variabel bebas dalam optimasi ekstraksi berbatuan gelombang mikro.

Variabel bebas	Simbol	Level		
		-1	0	+1
Etanol (%)	x_1	40	60	90
Waktu ekstraksi (menit)	x_2	5	15	30
Daya (watt)	x_3	360	480	600

Perangkat lunak *Minitab-14* digunakan untuk rancangan dan analisis data percobaan. Untuk memprediksi titik optimal, model polinomial orde kedua dipaskan dengan mengkorelasikan hubungan antara variabel bebas dan respon (rendemen total fenolik dan flavonoid) seperti yang ditunjukkan dalam persamaan berikut

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2$$

dengan Y adalah rendemen total fenolik atau flavonoid dan k adalah jumlah variabel ($k=2$ untuk metode maserasi dan refluks, dan $k=3$ untuk metode MAE). b_0 , b_i , b_{ij} dan b_{ii} berturut-turut adalah koefisien regresi dari variabel untuk intersep, linier, kuadratik dan interaksi antara variabel i dan j. x_i dan x_j adalah variabel bebas ($i \neq j$). Kualitas dari model yang dikembangkan ditentukan melalui koefisien determinasi (R^2), sedangkan signifikansi statistik dari model dievaluasi dengan menggunakan *analysis of variance (ANOVA)*. Model dan koefisien regresi dipandang signifikan jika *p-value* lebih kecil dari 0,05.

4.3 Fraksinasi Ekstrak Bioaktif

4.3.1. Tempat dan Waktu Kegiatan

Tempat : Laboratorium Terpadu IPB

Waktu : November 2011 – Januari 2012

4.3.2. Bahan dan Alat

Bahan :

- Ekstrak etanol propolis
- Bahan kimiawi seperti etanol, kloroform, etil asetat, HCl, amoniak, NaOH
- Aquadest

Alat:

- pH meter

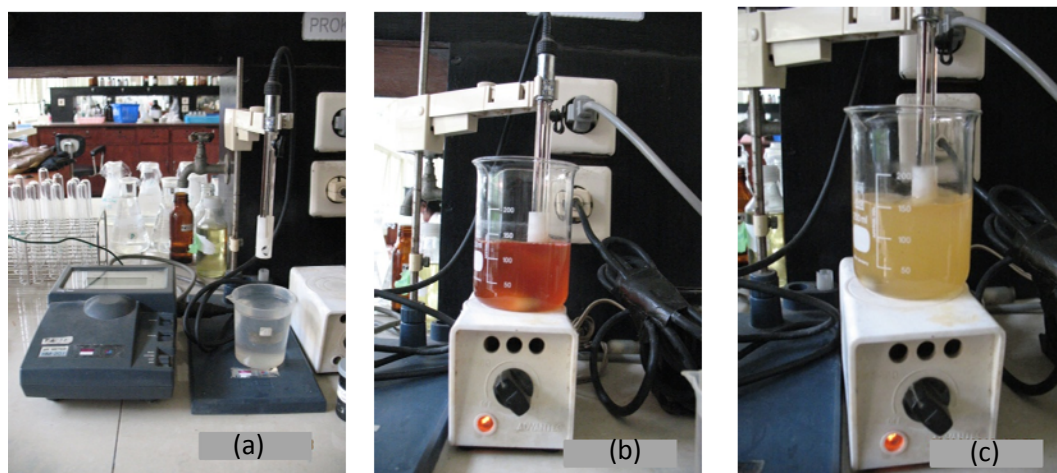
- *Magnetic stirrer*
- Perangkat rotarievaporator
- Perangkat gelas lainnya (labu pemisah, piala gelas, pipet tetes, gelas ukur)

4.3.3. Prosedur :

Terhadap ekstrak etanol dari tahapan 2.2 dilakukan fraksinasi dengan dua cara, yakni:

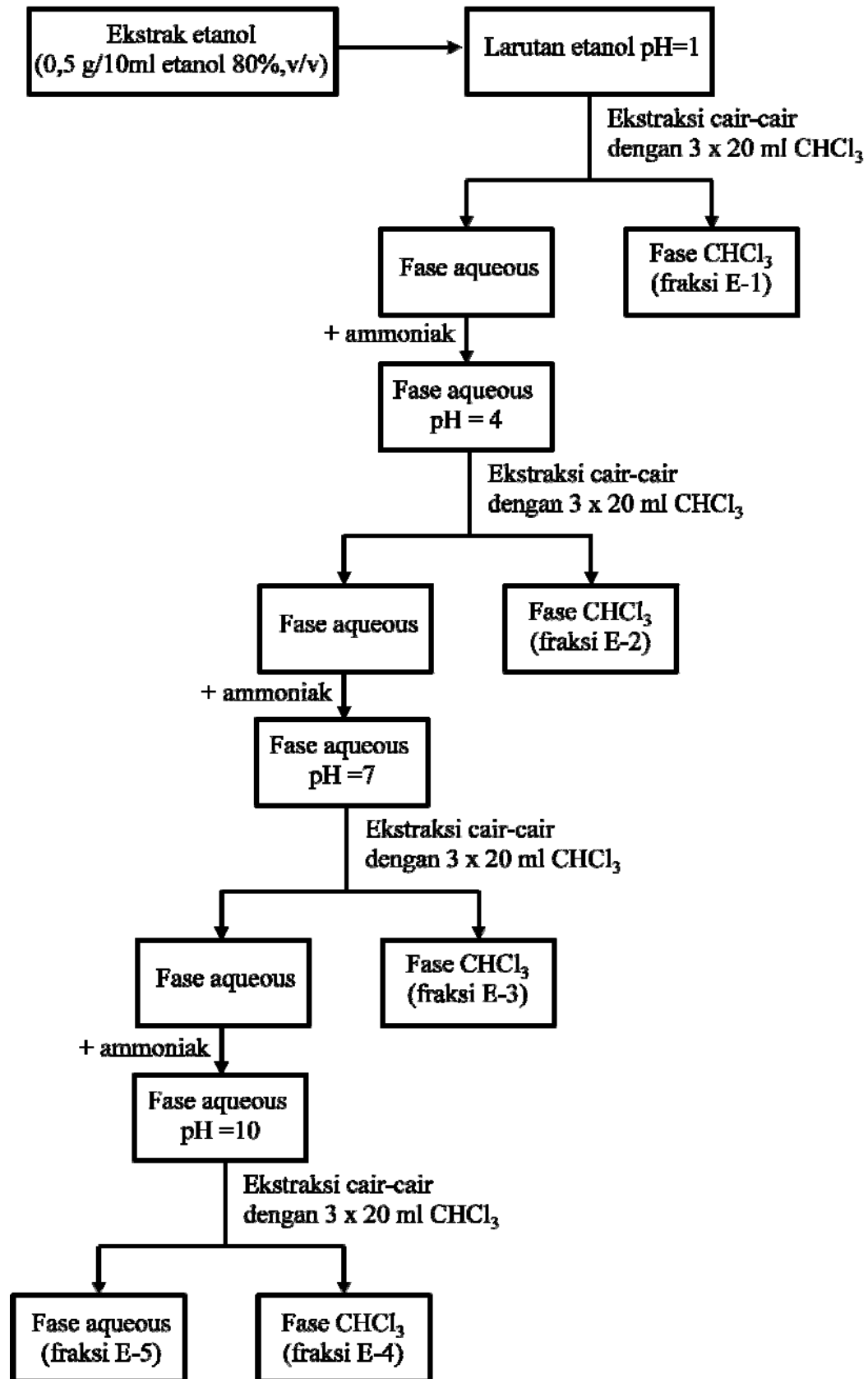
- berbasis perbedaan pH yang berlangsung secara berkesinambungan seperti yang disajikan dalam Gambar 4.2.
- berbasis perbedaan polaritas pelarut (sistem air-etilasetat dan sistem air-kloroform).

Kedua proses fraksinasi ini dilakukan dengan menggunakan teknik ekstraksi cair-cair.

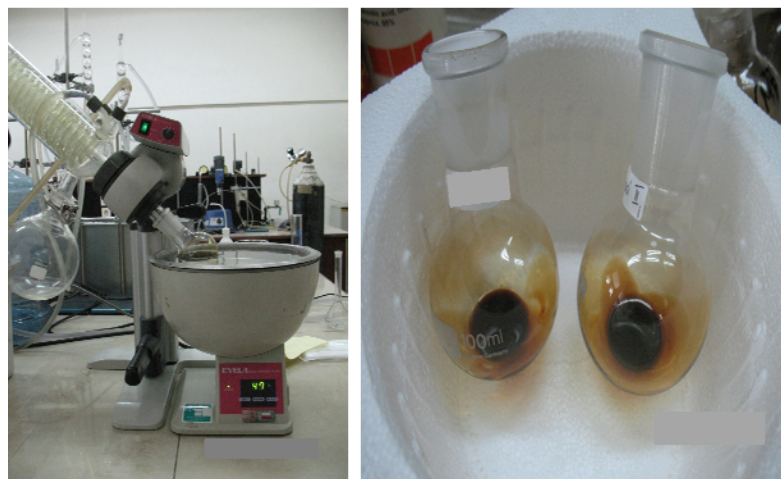


Gambar 4.10. Pengukuran pH dari larutan yang akan diekstraksi. (a) kalibrasi pH meter, (b) larutan suasana asam (pH 1 dan 4), dan (c) larutan netral sampai basa (pH 7 dan 10). (Foto di laboratorium Terpadu IPB)

Dalam hal fraksinasi berbasis perbedaan polaritas, ekstrak etanol terlebih dahulu diuapkan pelarutnya dengan menggunakan perangkat rotarievaporator dalam keadaan vakum pada suhu 50°C. Selanjutnya, ekstraksi dilakukan terhadap ekstrak yang telah dihilangkan pelarutnya melalui dua sistem ekstraksi, yakni sistem air-etilasetat (1:1) dan sistem air-kloroform (1:1).



Gambar 4.11 Diagram alir fraksinasi ekstrak etanol berbasis perbedaan pH



Gambar 4.12. Proses penguapan pelarut dengan rotarievaporator (a) dan hasil penguapan pelarut (b). (Foto di laboratorium Terpadu IPB)

4.4 Analisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC)

4.4.1. Tempat dan Waktu Kegiatan

Tempat : Laboratorium Terpadu IPB

Waktu : Januari – Februari 2012

4.4.2. Bahan dan Alat

Bahan :

- EEP dan berbagai fraksinya
- Metanol
- Aquadest
- Penyaring membran millipore-12:22

Alat:

- *High performace Liquid Chromatography (Shimadzu, UFCL system)* dilengkapi dengan detektor UV-Vis, *auto injector* 10AF, dan kolektor fraksi FRC-10A.
- Kolom C-18 ODS-2 Hypersil 150 mm x 4,6 mm, 5 μ (Thermo Sci.)
- Perangkat gelas (labu ukur, pipet ukur, gelas piala)
- Perangkat penyaring vakum

4.4.3. Prosedur

Analisis *HPLC* dalam penelitian ini dilakukan untuk memperoleh profil kimia dari ekstrak etanol propolis dan berbagai fraksinya.



Gambar 4.13. Piranti *HPLC* (Foto di laboratorium Terpadu IPB)

Untuk pengujian analitis, larutan encer sampel (1 mg/100 mL), disaring (Millipore - 12:22), dan 10 μ L larutan sampel disuntikkan ke dalam kolom C-18 ODS-2 Hypersil dengan dimensi 150 mm (panjang) x 4,6 mm (diameter dalam) dan ukuran partikel 5 μ . Sebagai fase gerak, digunakan air (pelarut A) dan metanol (pelarut B) dengan laju alir konstan 1 mL/menit dan suhu kolom 30°C. Sistem elusi gradien digunakan sebagai berikut

Waktu, menit	Larutan A,%	Larutan B, %
0	60	40
45	40	60
75	10	90
80	10	90
85	60	40

Deteksi dilakukan berbasis karakteristik spektrum UV pada panjang gelombang 260 nm.

4.5 Uji Aktivitas Antimikroba dan Pemilihan Varian Bioaktif

4.5.1. Tempat dan Waktu Kegiatan

Tempat : Laboratorium Terpadu IPB

Waktu : Februari – Mei 2012

4.5.2. Bahan dan Alat

Bahan :

- Mikroorganisme uji yakni *Streptococcus mutans*, ATCC 25175 (*MediMark Europe*)
- Bahan uji (EEP dan fraksinya)
- Media (*BHI broth*, *BHI agar*, *BHI agar+5% defibrinated sheep blood*) (Difco lab)
- CO₂
- Aquadest

Alat:

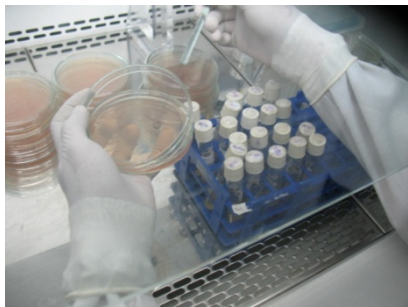
- *Autoclave*
- *Laminar air flow*
- Perangkat *anaerobic jar*
- Perangkat gelas (pipet ukur, gelas piala, cawan petri, tabung reaksi)
- Öse
- Alat ukur diameter zona hambat

4.5.3. Prosedur

Aktivitas antimikroba ditentukan melalui penetapan zona hambat, *minimal inhibitory concentration (MIC)* dan *minimal bactericidal concentration (MBC)*, sesuai dengan pedoman *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*^{180,181} dan Koo et al. (2000)¹⁶⁰.

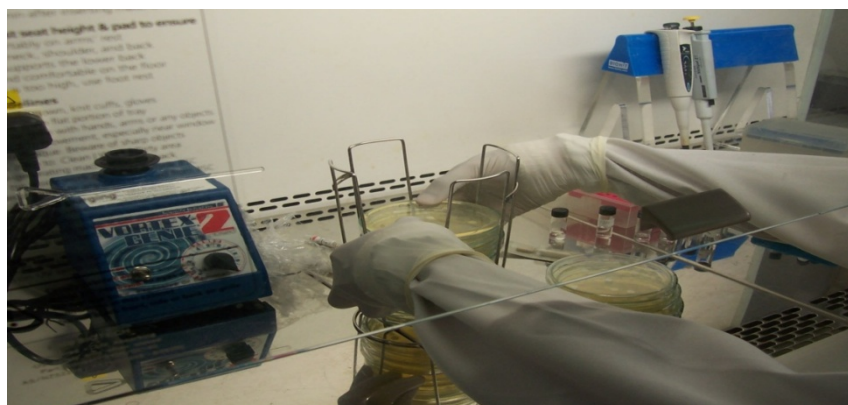
4.5.3.1. Penetapan Zona Hambat

S.mutans (5×10^5 CFU/ml) dari fase logaritma diinokulasikan ke cawan petri berisi media agar *BHI* (*brain heart infusion*).



Gambar 4.14 Inokulasi *S.mutans* pada media agar *BHI*
(Foto di laboratorium Terpadu IPB)

Lima kertas cakram steril (diameter 6 mm) diletakkan ke atas media yang terinokulasi tersebut. Sebanyak 40 μ L sampel uji (400 μ g/ml) diaplikasikan ke kertas cakram.



Gambar 4.15 Penyusunan sampel uji zona hambat untuk diinkubasi
(Foto di laboratorium Terpadu IPB)

Selanjutnya diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 10%. Sebagai kontrol digunakan 40 μ L cairan pengestrak, diperlakukan dengan cara yang sama dengan sampel uji.



Gambar 4.16 Sampel dalam inkubator (Foto di laboratorium Terpadu IPB)

Zona hambat pertumbuhan mikroba (zona bening) di sekitar kertas cakram diukur. Zona hambat dianggap jarak terpendek (mm) dari margin luar titik awal pertumbuhan mikroba. Tiga ulangan dibuat untuk setiap konsentrasi sampel uji.

4.5.3.2. Penetapan Konsentrasi Inhibisi Minimum (*MIC*)

Dalam penetapan *MIC*, inokulum awal yang digunakan adalah $1-2 \times 10^8$ CFU/ml dan kisaran konsentrasi extract adalah 12,5-1600 $\mu\text{g} / \text{ml}$ dalam tabung yang berisi media cair *BHI*. Etanol (konsentrasi akhir 0,6%) digunakan sebagai blanko dan klorheksidin sebagai kontrol positif. Proses inkubasi dilakukan dalam suasana CO_2 10% pada suhu 37°C selama 24 jam. *MIC* didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari ekstrak uji yang dapat menginhibisi pertumbuhan bakteri (secara visual tidak nampak pertumbuhan).

4.5.3.3. Penetapan Konsentrasi Bakterisida Minimum (*MBC*)

Untuk menentukan *MBC*, 50 μL aliquot dari seluruh tabung i dengan konsentrasi yang lebih tinggi daripada nilai *MIC* disubkulturkan pada agar *BHI* yang ditambahkan dengan darah domba terdefibrinasi 5%. *MBC* didefinisikan sebagai konsentrasi terendah yang memungkinkan tidak ada pertumbuhan terlihat pada agar. Tiga ulangan dibuat untuk setiap konsentrasi sampel uji.

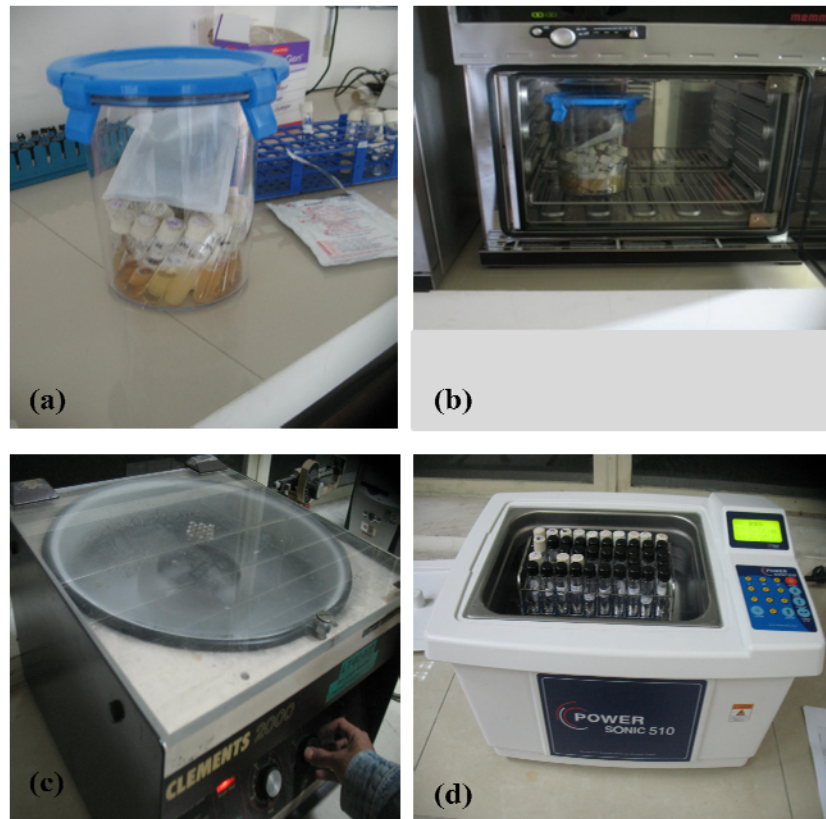
4.5.3.4. Uji Karakter *Adherence* dari Varian Bioaktif Terpilih

Penentuan karakter *adherence* dari varian bioaktif terpilih terhadap *S. Mutans* dilakukan dengan mengacu pada metode Koo et.al (2000) dan Hamada dan Torii. S.(1978).^{182,183} *S. mutans* diinokulasikan, masing-masing ke dalam tabung reaksi gelas (posisi dengan kemiringan 30°) yang berisi kaldu *BHI* + sukrosa 1% (b/v), kaldu *BHI* + sukrosa 1% (b/v) dan ekstrak uji dengan konsentrasi *sub-MIC*, dan kaldu *BHI* + sukrosa 1% (b/v) dan pelarut ekstrak uji (kontrol). Ketiga tabung tersebut diinkubasi dalam suasana CO₂ 10% pada 37 °C selama 18 jam. Setelah inkubasi, masing-masing tabung diperlakukan sebagai berikut:

Tabung dikocok perlahan-lahan dengan cara berputar, dan sel-sel yang terlepas dipindahkan ke tabung kedua. Sebanyak 3 ml buffer kalium fosfat (0,05 M, pH 6,8, *KPB*) dimasukkan tabung pertama, tabung diputar perlahan-lahan dan sel yang terlepas dipindahkan ke tabung ketiga. Tabung kedua dan ketiga disentrifugasi, dan supernatan dibuang untuk menghilangkan media kultur coklat. Kemudian *KPB* (3,0 ml) ditambahkan ke semua tabung, dan sel-sel disuspensikan secara ekstensif dengan osilator ultrasonik. Densitas optik dari suspensi dibaca pada 550 nm dan persentase *adherence* dihitung dengan menggunakan ungkapan berikut:

$$\% \text{ adherence} = [A_{550}(\text{tabung 1}) / A_{550} (\text{tabung 1} + 2 + 3)] 100$$

Tiga ulangan dilakukan dalam percobaan ini.



Gambar 4.17. Proses uji *adherense*. (a) Tabung uji (kemiringan 30°) dalam *anaerobic jar*, (b) *anaerobic jar* dalam inkubator, (c) sentrifugasi untuk menghilangkan media kultur coklat dan (d) ultrasonikasi untuk merontokkan sel yang melekat pada dinding tabung. (Foto di laboratorium Terpadu IPB)

4.6. Identifikasi Komponen Kimia Varian Bioaktif Terbaik

4.6.1. Tempat dan Waktu Kegiatan

Tempat : Laboratorium Analitik Pusat Pengkajian dan Penerapan Bioteknologi

BPPT, Serpong.

Waktu : Juni 2012

4.6.2. Bahan dan Alat

Bahan :

- Fraksi kloroform dari EEP
- Asam format

- Asetonitril
- Aquades

Alat:

- Perangkat *LC-MS* (Tandem *HPLC Alliance 2695* dengan *ESI-Tof-MS LCT Premier-XE*, Waters)
- Kolom *Symmetry C18*, 5 μ m, 150x4,6 mm

4.6.3. Prosedur

Sebanyak 10 μ L sampel diinjeksikan ke sektor *LC* dengan menggunakan fase gerak asam format 0,1% (pelarut A) dan campuran asetonitril + asam format 0,1% (pelarut B). Laju elusi 1 ml/menit dan dilakukan pada suhu ruang dengan mode gradien sebagai berikut:

Waktu, menit	%A	%B
0	30	70
20	0	100
23	0	100
24	30	70
30	30	70

Sektor *MS* dioperasikan dengan mode positif dan negatif dengan kondisi meliputi:

<i>Capillary voltage:</i>	2100 V
<i>Sample cone voltage:</i>	60 V
<i>Desolvation T:</i>	300 dC
<i>Source T:</i>	120 dC
<i>Desolvation gas:</i>	500 L/h
<i>Cone gas:</i>	10 L/h

Spektrum *LC-MS* diidentifikasi dengan cara perbandingan dengan bantuan *data base ChemSpider*.

4.7 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara ukur	Hasil ukur	Skala
Propolis	Bahan uji yang diambil dari sarang lebah <i>Trigona</i> spp. asal Banten	Neraca Teknis	Dipisahkan dari sarang lebah dan ditimbang	gram	Numerik
Ekstraksi	Metode pemisahan/ pemurnian suatu senyawa atau kelompok senyawa tertentu berdasar kan distribusi atau partisi pada dua fase yang berbeda.	-Perangkat maserasi -Perangkat refluks - Perangkat MAE - Labu pisah - <i>Spect. UV-Vis</i> -Neraca analitik	Penimbangan, pengukuran vol., pengukuran kadar	Persentase ekstrak	Numerik
Maserasi	Teknik ekstraksi dengan cara perendaman dengan pelarut dan diaduk secara periodik	-Perangkat Maserasi - Gelas ukur -Perangkat <i>Spect. UV-Vis</i> -Neraca analitik	Penimbangan, pengukuran vol., pengukuran kadar	Persentase ekstrak	Numerik
Refluks	Teknik ekstraksi berbantuan panas dengan menggunakan perangkat refluks	-Perangkat refluks - Gelas ukur -Perangkat <i>Spect. UV-Vis</i> -Neraca Analitik	Penimbangan, pengukuran vol., pengukuran kadar	Persentase ekstrak	Numerik
MAE	Teknik ekstraksi berbantuan gelombang mikro (MAE)	-Perangkat MAE - Gelas ukur -Perangkat <i>Spect. UV-Vis</i> -Neraca Analitik	Penimbangan, pengukuran vol., pengukuran kadar	Persentase ekstrak	Numerik
Extract	Hasil ekstraksi dengan teknik maserasi, refluks dan MAE	-Perangkat ekstraksi - Gelas ukur -Perangkat <i>Spect. UV-Vis</i> -Neraca Analitik	Penimbangan, pengukuran vol., pengukuran kadar	Persentase ekstrak	Numerik
Fraksinasi	Pemisahan	- Labu pisah	-pengukuran	- pola	Numerik

	ekstrak dalam bentuk fraksi/kelompok senyawa	-Perangkat <i>Spect. UV-Vis</i> -Perangkat <i>HPLC</i> -Perangkat <i>LC-MS</i> -Neraca Analitik	volume -Pengambilan Spektrum <i>UV-Vis</i> , kromatogram <i>HPLC</i> dan spektrum <i>LCMS</i>	kromatogram dan identitas kimia	dan nominal
<i>Bioassay</i>	Metode eksperimen saintifik yang dilakukan untuk mengukur pengaruh suatu substansi terhadap organisme hidup	-Penggaris ukur - neraca analitik - mikropipet -Perangkat <i>Spect. UV-Vis</i>	- Mengukur diameter zona inhibisi - Mengamati pertumbuhan bakteri - Mengukur absorbans	- mm - absorbans	Numerik dan nominal
<i>MIC</i>	Konsentrasi bahan uji terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri	Visual	Visual	$\mu\text{g/mL}$	numerik
<i>MBC</i>	Konsentrasi bahan uji terendah yang memungkinkan tidak ada pertumbuhan bakteri terlihat pada agar	Visual	Visual	$\mu\text{g/mL}$	numerik
Uji karakter <i>adherence</i>	Uji untuk menginvestigasi kemampuan bahan uji dalam menghambat pelekatan mikroorganisme pada permukaan kaca	- Perangkat <i>Spect. UV-Vis</i>	Mengukur absorbance pada 550 nm	% <i>adherence</i>	numerik
<i>Analisis HPLC</i>	Analisis kimia dengan bantuan perangkat <i>HPLC</i>	-Neraca analitik - Perangkat <i>HPLC</i>	Menganalisis kromatogram <i>HPLC</i>	Kromatogram	Nominal dan numerik
Analisis spektrofotometri	Analisis kimia dengan Spektrometer	-Neraca analitik - Perangkat <i>Spect. UV-Vis</i>	Mengukur absorbance	Konsentrasi senyawa (% atau ppm)	numerik

Analisis <i>LCMS</i>	Analisis kimia dengan perangkat <i>LC- MS</i>	Perangkat <i>LC- MS</i>	Menganalisi profil <i>LS-MS</i>	Spektrum <i>LC- MS</i>	Nominal dan numerik
-------------------------	---	-----------------------------	------------------------------------	----------------------------	---------------------------

BAB 5

HASIL PENELITIAN

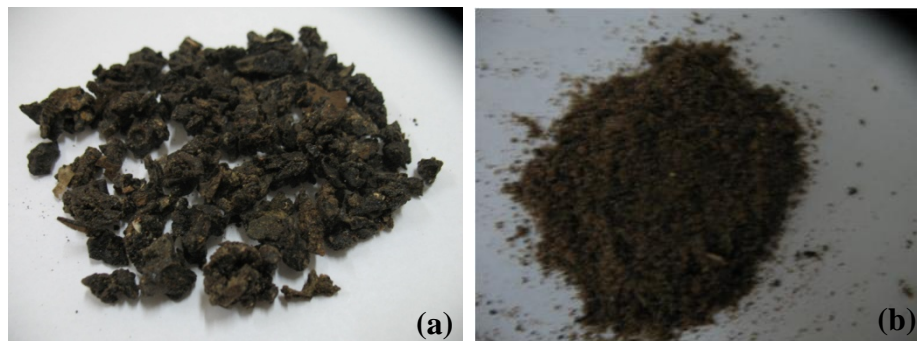
5.1. *Sampling* dan Preparasi Sample

Sampling propolis *Trigona* spp. dilakukan secara acak di daerah Banten, dengan radius 1 km di sekitar titik $S 6^{\circ}17'61''$ dan $E 106^{\circ}4'27''$. Sampel yang diperoleh bertekstur lengket dan berwarna coklat kehitaman seperti yang disajikan dalam Gambar 5.1.



Gambar 5.1. Bahan baku propolis *Trigona* spp.

Terhadap sampel ini, dipreparasi berturut-turut sebagai berikut: didinginkan pada suhu -20°C , dihaluskan dan diayak (80 - 100 mesh). Preparat yang diperoleh seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Sampel propolis yang telah mengalami pendinginan -20°C (a), preparat propolis (b).

5.2. Pemilihan Metode Ekstraksi Senyawa Bioaktif

Tiga metode ekstraksi yakni metode tanpa pemanasan (maserasi), dengan pemanasan (refluks) dan dengan gelombang mikro (*MAE*) dievaluasi, masing-masing pada kondisi optimalnya. Optimasi parameter atau variabel ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode respon permukaan dan parameter ekstraksi yang dipertimbangkan adalah konsentrasi pelarut (x_1), waktu ekstraksi (x_2) dan daya gelombang mikro (x_3). Rendemen total fenolik dan flavonoid digunakan sebagai respon. Sebelum pemilihan, dilakukan terlebih dahulu penetapan kondisi optimum setiap metode yang dievaluasi sebagai berikut.

5.2.1. Optimasi Parameter Ekstraksi Maserasi

Nilai respon yang diperoleh pada berbagai kombinasi eksperimental dari variabel disajikan dalam Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Matriks rancangan *central composite* ekstraksi secara maserasi dan respon eksperimental

No	Etanol,%,(kode)	Waktu,jam,(kode)	Respon eksperimental	
			Total fenolik,%	Flavonoid, %
1	56 (-1.414)	48 (0)	3.26	0.14
2	60 (-1)	24 (-1)	3.36	0.15
3	60 (-1)	72 (1)	3.83	0.15
4	70 (0)	14 (-1.414)	3.83	0.15
5	70 (0)	48 (0)	4.44	0.21
6	70 (0)	48 (0)	4.56	0.22
7	70 (1.414)	82 (1.414)	3.24	0.15
8	80 (1)	24 (-1)	3.20	0.16
9	80 (1)	72 (1)	3.86	0.18
10	84 (-1.414)	48 (0)	3.36	0.17

Kisaran rendemen total fenolik dari 3,20% sampai 4,56% dan flavonoid dari 0,14% sampai 0,22%. Dengan mengaplikasi analisis regresi ganda pada data eksperimental, respon (total fenolik, Y_1 , dan flavonoid, Y_2) terhadap variabel uji dihubungkan berturut-turut melalui persamaan polinomial orde kedua berikut:

$$Y_1 = 4.49 + 0.103x_1 + 0.06x_2 - 1.09x_1^2 - 1.10x_2^2 + 0.26x_1x_2 \quad (5.1)$$

$$Y_2 = 0.21 + 0.01x_1 + 0.01x_2 - 0.05x_1^2 - 0.06x_2^2 + 0.01x_1x_2 \quad (5.2)$$

Signifikansi dan kesesuaian dari model dievaluasi dengan menggunakan *analysis of variance (ANOVA)*. Hasil *ANOVA* (Tabel 5.2) menunjukkan bahwa model regresi adalah signifikan ($p < 0.05$). Koefisien determinasi (R^2) dan koefisien determinasi yang disesuaikan (*Adj. R²*) untuk total fenolik berturut-turut adalah 0.930 dan 0.843 dan untuk flavonoid masing-masing 0.952 dan 0.893, menunjukkan bahwa antara nilai-nilai diobservasi dan diprediksi mempunyai derajat korelasi yang tinggi. Selain itu, rendahnya nilai koefisien variasi ($CV < 10\%$) memberi gambaran bahwa model dipandang *reproducible*.

Tabel 5.2 *ANOVA* untuk optimasi teknik maserasi terhadap respon

Respon	Sumber	<i>Adj. Sum of Squares</i>	Derajat Kebebasan	<i>Adj. Mean Squares</i>	F	<i>P_{value}</i>
Total	Regresi	2.0573	5	0.4115	10.69	0.020
Fenolik	Linear	0.0600	2	0.0300	0.78	0.518
	Kuadratik	1.9292	2	0.9646	25.06	0.005
	Interaksi	0.0681	1	0.0681	1.77	0.254
	<i>Residual Error</i>	0.1540	4	0.0385		
	<i>Lack-of-Fit</i>	0.1474	3	0.0491	7.43	0.262
	<i>Pure Error</i>	0.0066	1	0.0066		
	Total		2.2113	9		
Flavonoid	Regresi	0.0058	5	0.0012	15.99	0.009
	Linear	0.0009	2	0.0005	6.34	0.058
	Kuadratik	0.0048	2	0.0024	32.89	0.003
	Interaksi	0.0001	1	0.0001	1.47	0.293
	<i>Residual Error</i>	0.0003	4	0.0001		
	<i>Lack-of-Fit</i>	0.0002	3	0.0001	0.97	0.615
	<i>Pure Error</i>	0.0001	1	0.0001		
Total		0.0061	9			

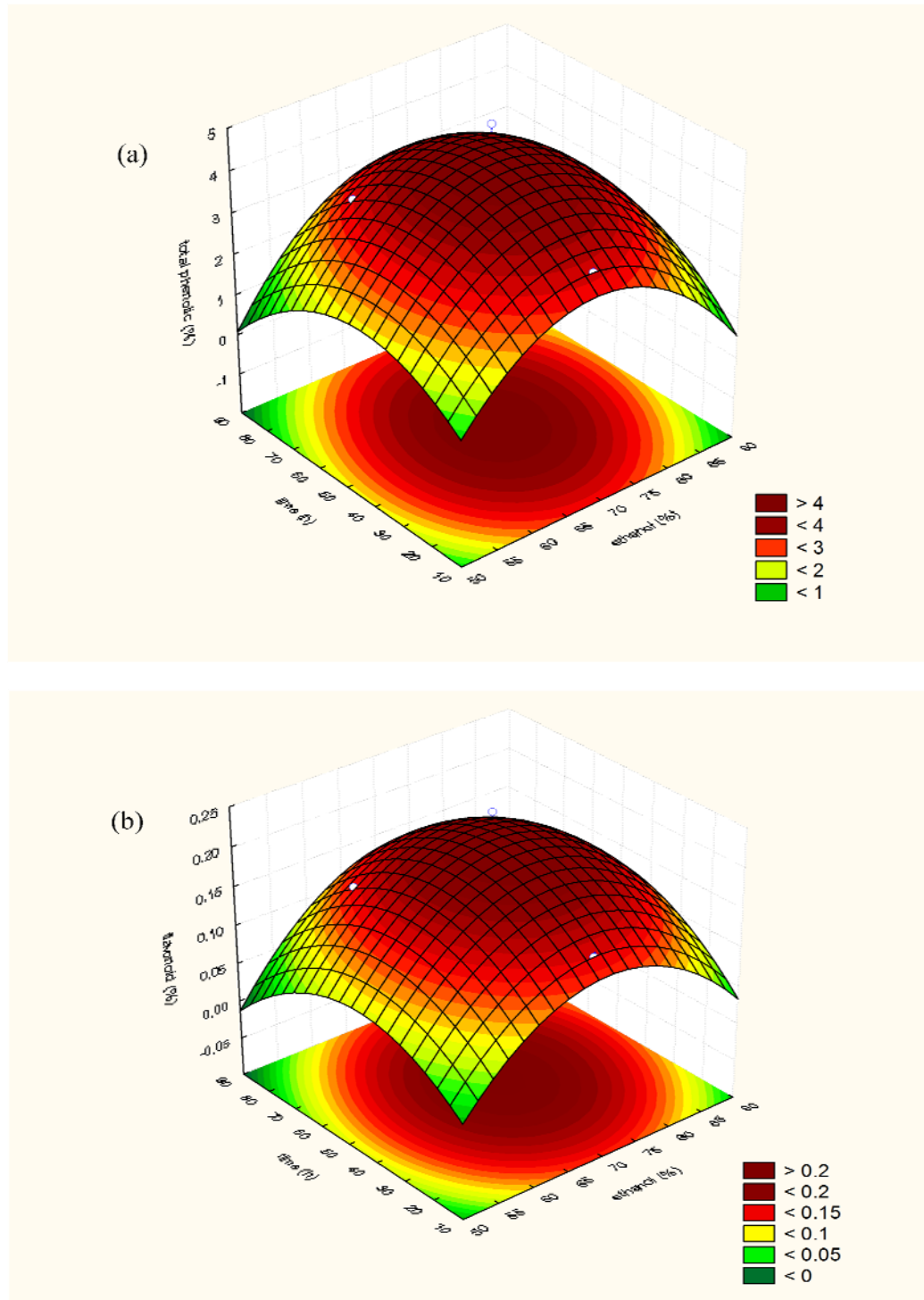
Total fenolik: $R^2 = 0.930$, *Adj. R²* = 0.843, $CV = 5.42\%$

Flavonoid : $R^2 = 0.952$, *Adj. R²* = 0.893, $CV = 5.10\%$

Sebagai tambahan, besarnya nilai P untuk *lack of fit* ($P > 0.05$) menyiratkan bahwa model korelasi antara variabel dan respon adalah signifikan.

Persamaan (5.1) dan (5.2) memungkinkan prediksi pengaruh konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi terhadap kandungan total fenolik dan flavonoid dalam ekstrak sampel propolis. Visualisasi pengaruh konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi

disajikan dalam plot permukaan respon (Gambar 5.3) yang mempunyai bentuk hampir simetris dengan kontur melingkar.



Gambar 5.3 Plot permukaan respon dan kontur dari pengaruh variable bebas terhadap total fenolik (a) dan flavonoid (b) dengan metode maserasi

Plot respon juga menunjukkan puncak yang jelas, menyiratkan kondisi optimum untuk nilai-nilai maksimum dari respon yang dikaitkan dengan konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi dalam ruang desain. Kondisi optimal ini juga dapat ditunjukkan melalui plot kontur, yakni pada pusat lingkaran kontur.

Berdasarkan desain ini, kondisi optimum untuk memperoleh total fenolik maksimum adalah konsentrasi etanol=70.72% dan waktu ekstraksi = 49.21 jam dengan kadar fenol prediksi sebesar 4.50%. Dalam hal parameter optimum untuk mendapatkan kadar flavonoid maksimal yaitu pada persentase etanol=71.99% dan waktu ekstraksi = 50.03 jam dengan kadar flavonoid prediksi sebesar 0.21%.

5.2.2. Optimasi parameter ekstraksi secara refluks

Data optimasasi parameter ekstraksi secara refluks dengan respon kadar fenol dan flavonoid disajikan pada Tabel 5.3. Persamaan regresi yang menghubungkan respon eksperimental (total fenolik, Y_1 , dan flavonoid, Y_2) dengan variabel uji adalah sebagai berikut:

$$Y_1 = 4.25 + 0.09x_1 + 0.04x_2 - 0.79x_1^2 - 0.86x_2^2 - 0.11x_1x_2 \quad (5.3)$$

$$Y_2 = 0.239 + 0.002x_1 + 0.006x_2 - 0.074x_1^2 - 0.074x_2^2 - 0.003x_1x_2 \quad (5.4)$$

Tabel 5.3 Matriks rancangan *central composite* ekstraksi secara refluks dan respon eksperimental

No	Etanol,%, (kode)	Waktu,menit,(kode)	Respon eksperimental	
			Total fenolik,%	Flavonoid, %
1	56 (-1.414)	75 (0)	3.29	0.16
2	60 (-1)	30 (-1)	3.28	0.15
3	60 (-1)	120 (1)	3.56	0.18
4	70 (0)	12 (-1.414)	3.31	0.16
5	70 (0)	75 (0)	4.30	0.23
6	70 (0)	75 (0)	4.20	0.25
7	70 (1.414)	140 (1.414)	3.31	0.16
8	80 (1)	30 (-1)	3.54	0.16
9	80 (1)	120 (1)	3.59	0.18
10	84 (-1.414)	75 (0)	3.46	0.16

Ringkasan *ANOVA* yang disajikan pada Tabel 5.4, menunjukkan bahwa model regresi adalah signifikan untuk total fenolik dan flavonoid ($P < 0.05$). Demikian

juga, nilai *lack of fit* ($P > 0.05$) menunjukkan bahwa model korelasi antara variabel dan respon adalah signifikan.

Koefisien determinasi (R^2) dan koefisien determinasi yang disesuaikan (*Adj R²*) untuk total fenolik berturut-turut adalah 0.949 dan 0.886 dan untuk flavonoid masing-masing 0.933 dan 0.849, menunjukkan derajat korelasi yang tinggi antara nilai-nilai diobservasi dan diprediksi. Selain itu, nilai *CV* yang lebih kecil dari 10% menyiratkan model dipandang *reproducible*.

Tabel 5.4. ANOVA untuk optimasi teknik refluks terhadap respon

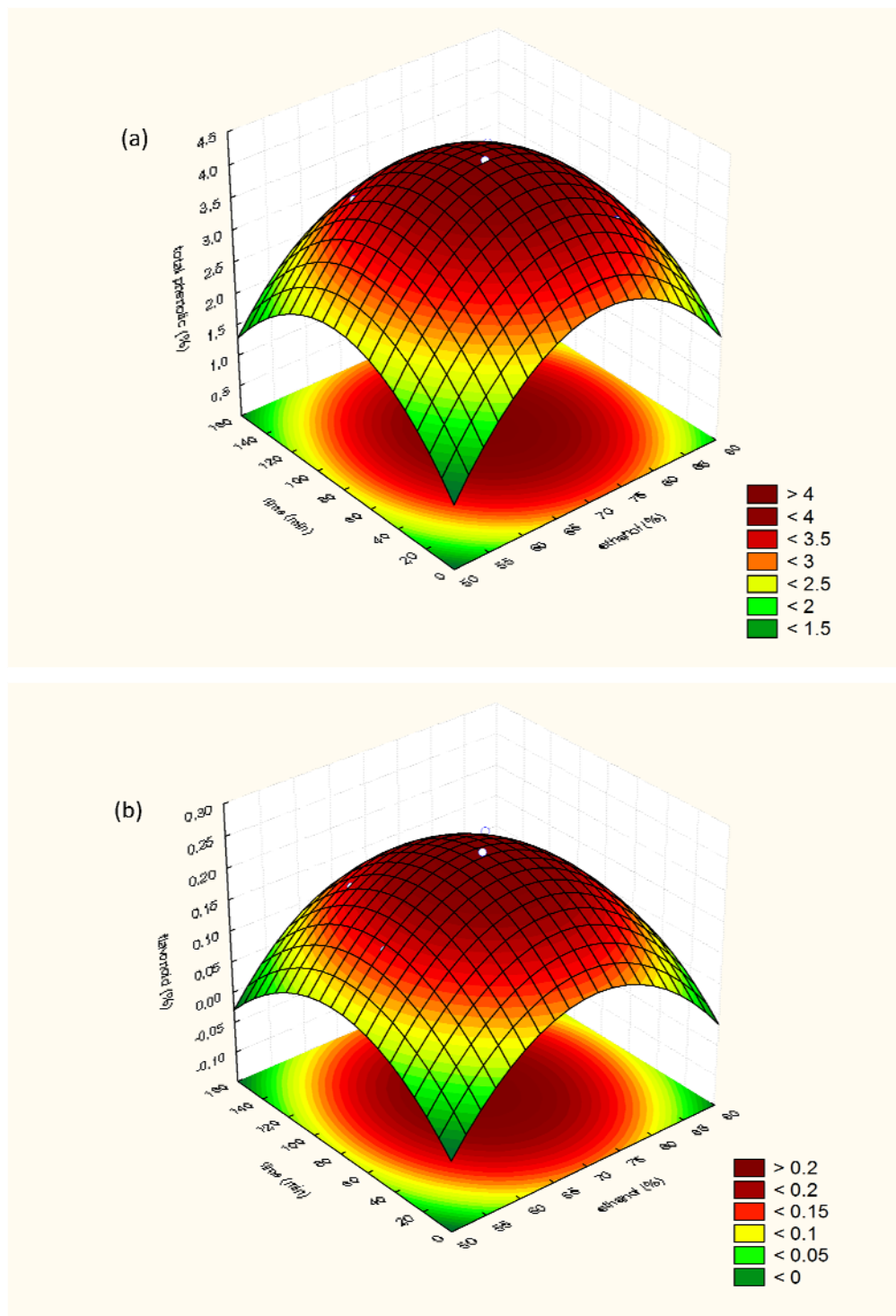
Respon	Sumber	Adj. Sum of Squares	Derajat Kebebasan	Adj. Mean Squares	F	P _{value}
Total Fenolik	Regresi	1.1740	5	0.2348	14.97	0.020
	Linear	0.0416	2	0.0208	1.33	0.518
	kuadratik	1.1132	2	0.5566	35.48	0.005
	Interaksi	0.0131	1	0.0131	0.84	0.254
	<i>Residual Error</i>	0.0627	4	0.0157		
	<i>Lack-of-Fit Pure Error</i>	0.0577	3	0.0192	3.85	0.355
		0.0050	1	0.0050		
	Total	1.2368	9			
Flavonoid	Regresi	0.0091	5	0.0018	11.15	0.018
	Linear	0.0002	2	0.0001	0.61	0.589
	kuadratik	0.0088	2	0.0044	27.05	0.005
	Interaksi	0.0001	1	0.0000	0.07	0.802
	<i>Residual Error</i>	0.0006	4	0.0002		
	<i>Lack-of-Fit Pure Error</i>	0.0004	3	0.0001	0.76	0.667
		0.0002	1	0.0002		
	Total	0.0098	9			

Total fenolik: $R^2 = 0.949$, $Adj.R^2 = 0.886$, $CV = 3.50\%$

Flavonoid : $R^2 = 0.933$, $Adj.R^2 = 0.849$, $CV = 7.13\%$

Untuk mengevaluasi interaksi antara variabel dan untuk menentukan nilai optimum dari setiap variabel, respon permukaan tiga dimensi dan grafik kontur diplot sesuai dengan persamaan (5.3) dan (5.4) dan disajikan dalam Gambar 5.4. Berdasarkan gambar 5.4 ini, peningkatan kandungan total fenolik dan flavonoid

terjadi dengan meningkatnya konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi sampai level ambang batas dan selanjutnya menurun lagi.



Gambar 5.4. Plot permukaan respon dan kontur dari pengaruh variable bebas terhadap total fenolik (a) dan flavonoid (b) dengan metode refluks

Kondisi optimum dari variable bebas untuk mendapatkan total fenolik maksimal, yaitu konsentrasi etanol=70.79% dan waktu ekstraksi = 77.37 menit dengan kadar fenol prediksi sebesar 4.25%. Dalam hal parameter optimum untuk mendapatkan flavonoid maksimal yaitu konsentrasi etanol=70.25% dan waktu ekstraksi = 78.76 menit dengan kadar flavonoid prediksi sebesar 0.24%.

5.2.3. Optimasi parameter ekstraksi berbantuan gelombang mikro

Tabel 5.5 menyajikan nilai respon pada berbagai kombinasi eksperimental dari parameter ekstraksi berbantuan gelombang mikro.

Tabel 5.5 Matriks rancangan faktorial lengkap dari *MAE* dan respon eksperimental

No	Etanol,%, (kode)	Waktu,menit, (kode)	Daya, watt, (kode)	Respon eksperimental	
				Total fenolik,%	Flavonoid, %
1	40 (-1)	5 (-1)	360 (1)	4.02	0.25
2	40 (-1)	15 (0)	360 (1)	4.64	0.28
3	40 (-1)	30 (1)	360 (1)	4.32	0.23
4	40 (-1)	5 (-1)	480 (1)	4.09	0.26
5	40 (-1)	15 (0)	480 (1)	4.20	0.23
6	40 (-1)	30 (1)	480 (1)	5.57	0.29
7	40 (-1)	5 (-1)	600 (1)	3.93	0.24
8	40 (-1)	15 (0)	600 (1)	4.00	0.23
9	40 (-1)	30 (1)	600 (1)	4.59	0.32
10	60 (0)	5 (-1)	360 (1)	4.80	0.29
11	60 (0)	15 (0)	360 (1)	5.95	0.37
12	60 (0)	30 (1)	360 (1)	5.29	0.36
13	60 (0)	5 (-1)	480 (1)	5.13	0.33
14	60 (0)	15 (0)	480 (1)	5.41	0.37
15	60 (0)	30 (1)	480 (1)	5.58	0.36
16	60 (0)	5 (-1)	600 (1)	4.68	0.31
17	60 (0)	15 (0)	600 (1)	5.17	0.33
18	60 (0)	30 (1)	600 (1)	5.92	0.34
19	90 (1)	5 (-1)	360 (1)	2.85	0.21
20	90 (1)	15 (0)	360 (1)	2.97	0.27
21	90 (1)	30 (1)	360 (1)	3.23	0.25
22	90 (1)	5 (-1)	480 (1)	3.27	0.25
23	90 (1)	15 (0)	480 (1)	3.89	0.28
24	90 (1)	30 (1)	480 (1)	3.94	0.22
25	90 (1)	5 (-1)	600 (1)	3.52	0.23
26	90 (1)	15 (0)	600 (1)	3.75	0.27
27	90 (1)	30 (1)	600 (1)	3.73	0.31

Persamaan regresi yang menghubungkan respon eksperimental (total fenolik, Y_1 , dan flavonoid, Y_2) dengan variabel uji yang diperoleh dari proses optimasi sebagai berikut:

$$Y_1 = 5.59 - 0.46x_1 + 0.32x_2 + 0.09x_3 - 1.37x_1^2 - 0.16x_2^2 - 0.27x_3^2 - 0.11x_1x_2 + 0.21x_1x_3 + 0.09x_2x_3 \quad (5.5)$$

$$Y_2 = -0.358 - 0.002x_1 + 0.017x_2 + 0.005x_3 - 0.086x_1^2 - 0.015x_2^2 - 0.005x_3^2 - 0.001x_1x_2 + 0.005x_1x_3 + 0.011x_2x_3 \quad (5.6)$$

Ringkasan *ANOVA* (Tabel 5.6) menunjukkan bahwa model regresi adalah signifikan untuk total fenolik dan flavonoid ($P < 0.05$). Selain itu, nilai-nilai diobservasi dan diprediksi mempunyai derajat korelasi yang tinggi seperti yang ditunjukkan oleh parameter R^2 dan *Adj. R²* (total fenolik: $R^2 = 0.917$, *Adj. R²* = 0.872 dan flavonoid: $R^2 = 0.789$, *Adj. R²* = 0.872). Sebagai tambahan, nilai *CV* < 10% menggambarkan bahwa model yang diperoleh adalah *reproducible*.

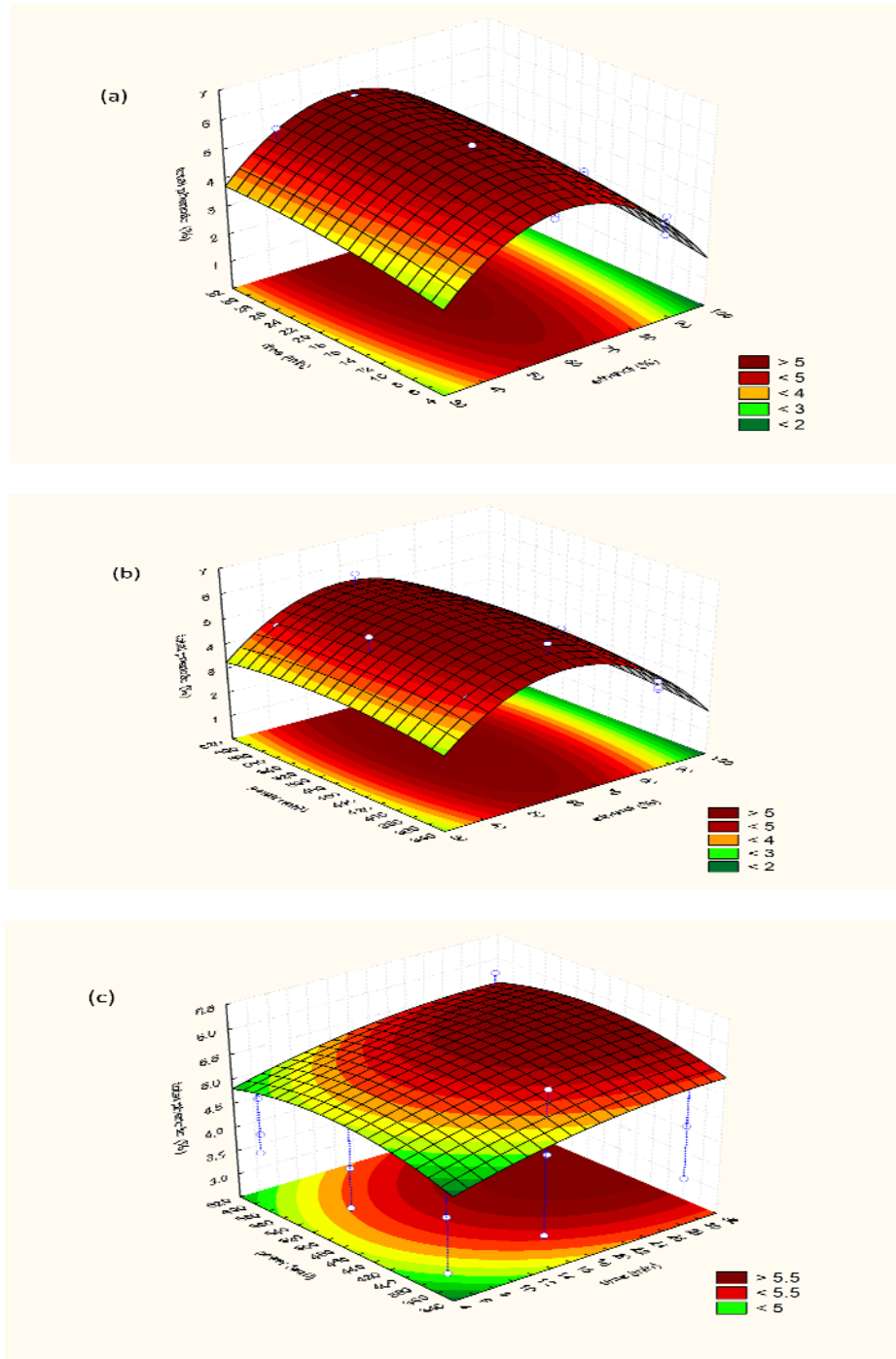
Tabel 5.6. *ANOVA* untuk optimasi metode *MAE* terhadap respon

Respon	Sumber	<i>Adj. Sum of Squares</i>	Derajat Kebebasan	<i>Adj. Mean Squares</i>	F	<i>P value</i>
Total Fenolik	Regresi	18.8656	9	2.0962	20.76	0.000
	Linear	5.8104	3	1.9368	19.18	0.000
	Kuadratik	10.8231	3	3.6077	35.73	0.000
	Interaksi	0.7843	3	0.2614	2.59	0.087
	<i>Residual Error</i>	1.7166	17	0.1010		
	Total	20.5822	26			
Flavonoid	Regresi	0.0491	9	0.0055	7.08	0.000
	Linear	0.0056	3	0.0018	2.41	0.103
	Kuadratik	0.0414	3	0.0138	17.92	0.000
	Interaksi	0.0017	3	0.0006	0.74	0.540
	<i>Residual Error</i>	0.0131	17	0.0008		
	Total	0.0622	26			

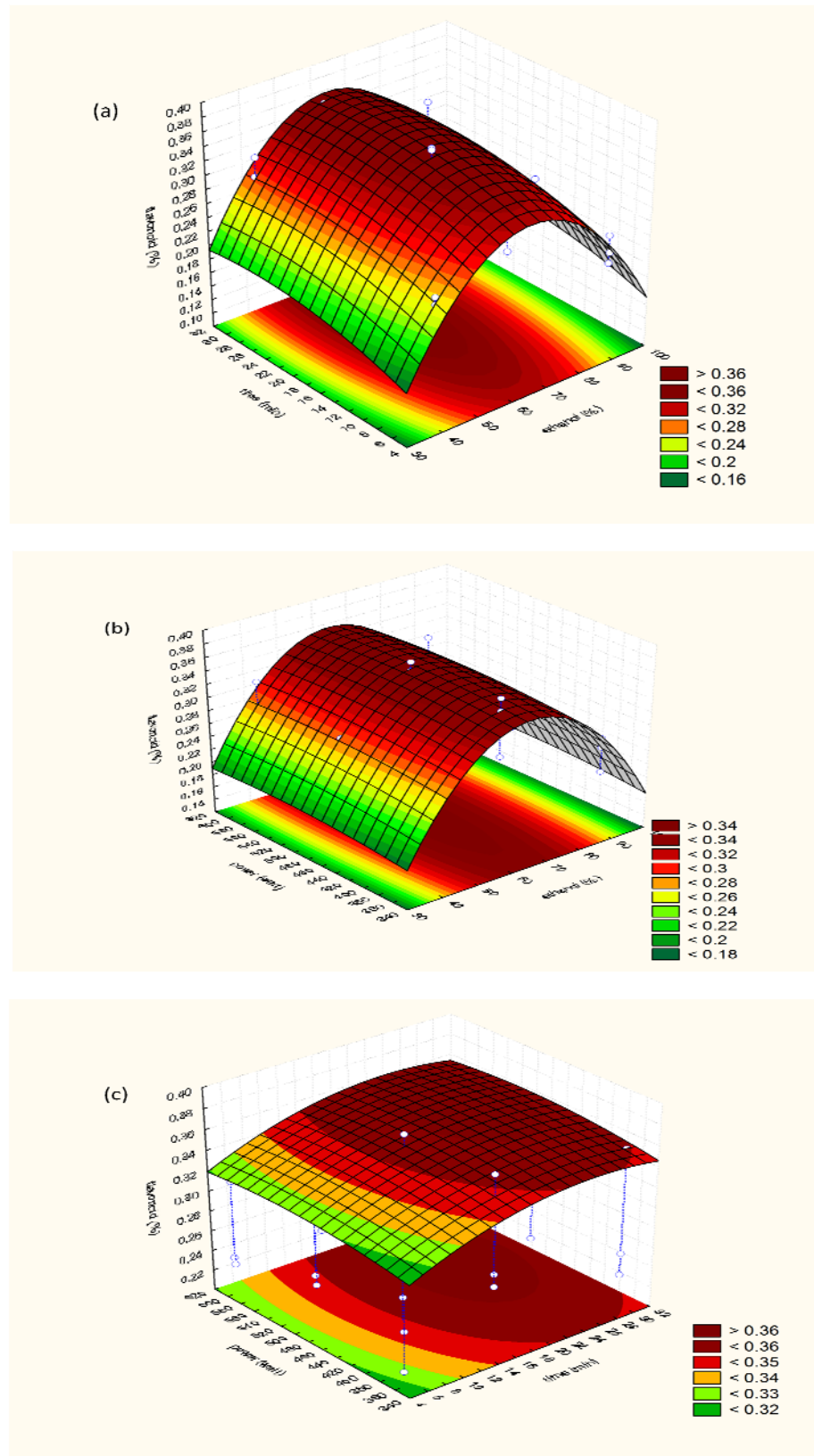
Total fenolik: $R^2 = 0.917$, *Adj. R²* = 0.872, *CV* = 7.24%

Flavonoid : $R^2 = 0.789$, *Adj. R²* = 0.678, *CV* = 9.73%

Visualisasi persamaan (5.5) dan (5.6) diberikan dalam bentuk respon permukaan tiga dimensi dan grafik kontur seperti yang disajikan dalam Gambar 5.5 dan 5.6. Setiap permukaan tiga dimensi melibatkan dua variabel dan satu variabel lainnya dijaga konstan pada level nol.



Gambar 5.5 Plot permukaan respon dan kontur dari pengaruh variable bebas terhadap total fenolik dengan metode *MAE*



Gambar 5.6 Plot permukaan respon dan kontur dari pengaruh variable bebas terhadap flavonoid dengan metode *MAE*

Parameter optimum dari variable bebas yang diperoleh untuk mendapatkan total fenolik maksimal, yaitu konsentrasi etanol=60,85%, waktu ekstraksi = 30,57 menit, Daya=495,4 watt dengan total fenolik prediksi sebesar 5,81%. Dalam hal parameter optimum untuk mendapatkan kadar flavonoid maksimal yaitu konsentrasi etanol=64,66%, waktu ekstraksi = 24,4 menit, daya =520,9 watt dengan kadar flavonoid prediksi sebesar 0.36%.

5.2.4 Perbandingan metode ekstraksi

Rekapitulasi kondisi optimal ketiga metode ekstraksi tersebut disajikan pada tabel 5.7. Pada kondisi optimal menunjukkan rendemen flavonoid dan total fenolik relatif sama untuk teknik maserasi dan refluks, yakni 0,2 % untuk flavonoid dan 4% untuk total fenolik. Peningkatan rendemen diamati pada teknik *MAE* yakni 0,4% dan 5,8% berturut-turut untuk flavonoid dan total fenolik.

Tabel 5.7. Rekapitulasi kadar flavonoid dan total fenolik pada kondisi optimal dari metode ekstraksi maserasi, refluks dan *MAE*

Metode	Waktu ekstraksi		[etanol],%		Daya (watt)		Flav. (%)	Fen. (%)
	Flav.	Fen.	Flav.	Fen.	Fen.	Fen.		
Maserasi	50,03j	49,21 j	71,99	70,72	-	-	0,21	4,50
Refluks	78,76m	77,37 m	70,25	70,79	-	-	0,24	4,25
<i>MAE</i>	24,42m	30,57 m	64,66	60,85	520,9	495,4	0,38	5,81

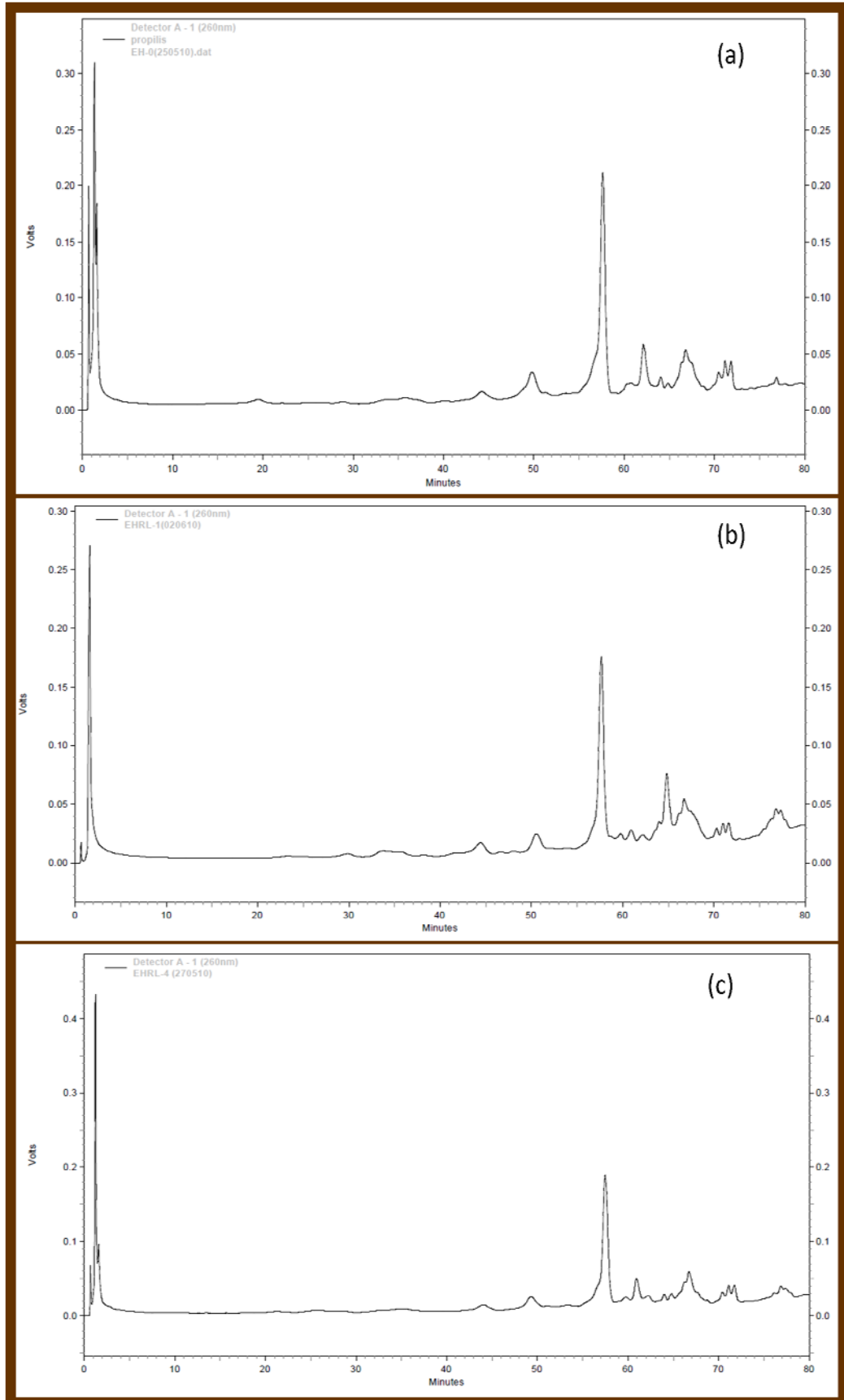
Flav: flavonoid, Fen: total fenolik, j: jam dan m: menit

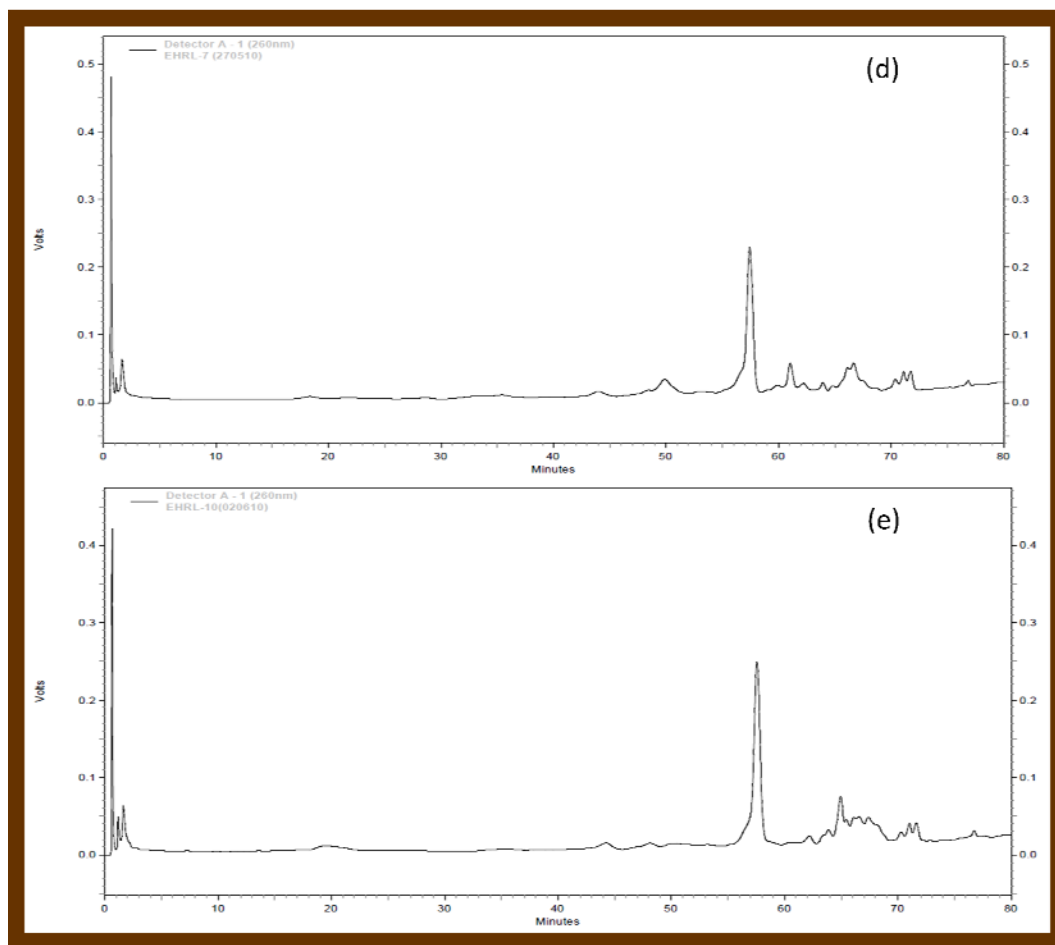
5.3 Fraksinasi Ekstrak Etanol Propolis

Ekstrak etanol propolis yang digunakan dalam proses fraksinasi ini diperoleh dari metode ekstraksi terbaik (ekstraksi berbantuan gelombang mikro). Fraksinasi dilakukan dengan dua cara, yakni berbasis perbedaan pH dan berbasis perbedaan polaritas pelarut pengekstrak.

5.3.1 Fraksinasi berbasis perbedaan pH

EEP diperlakukan pada berbagai pH (1 – 10) dalam rangkaian berkesinambungan, selanjutnya diekstraksi dengan kloroform. Hasil ekstraksi (fraksi kloroform) dipantau dengan teknik kromatografi cair kinerja tinggi (*HPLC*), seperti yang disajikan oleh kromatogram dalam gambar 5.7.





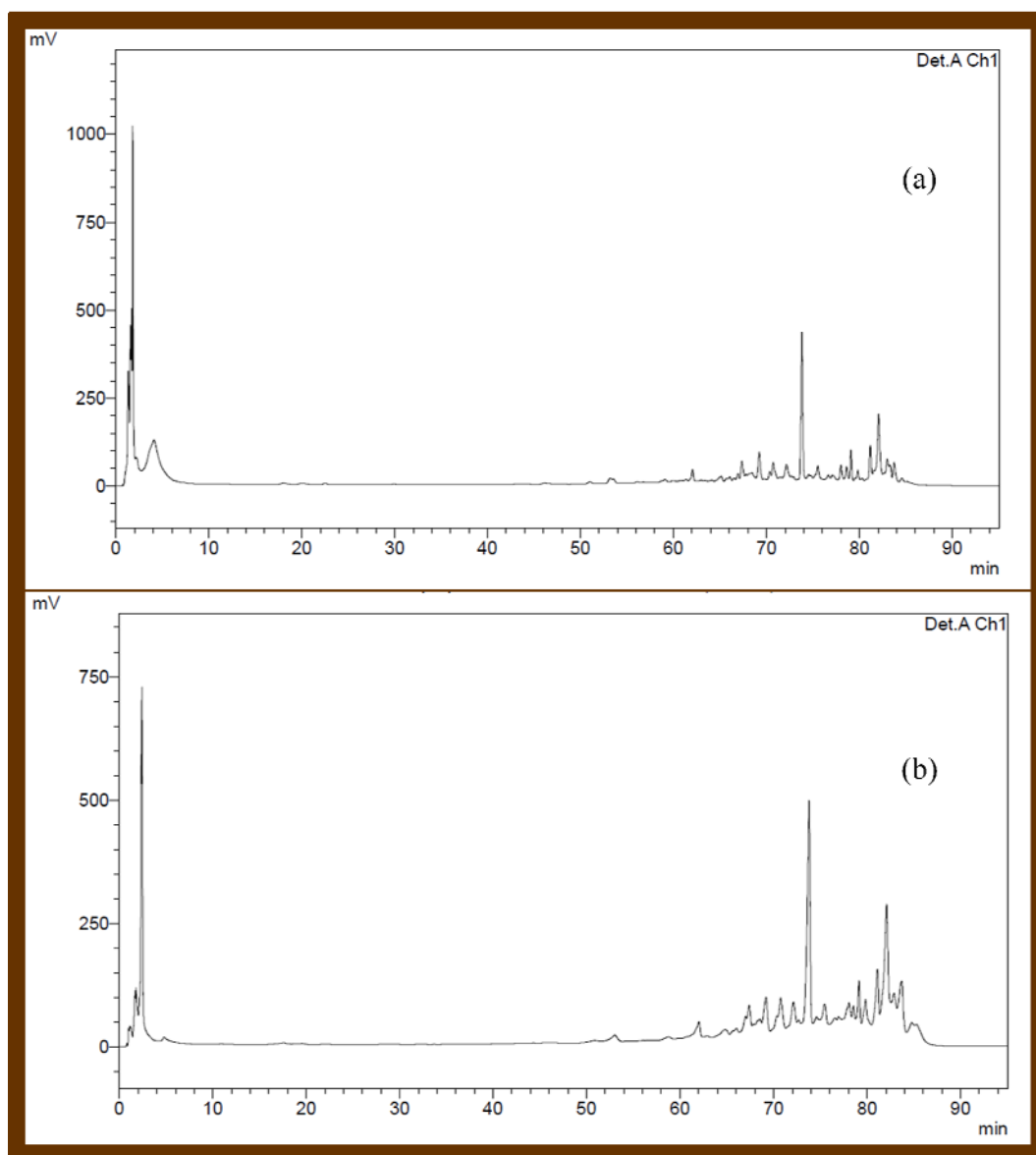
Gambar 5.7 Kromatogram *HPLC* dari EEP (a), fraksi pH1 (b), fraksi pH 4 (c), fraksi pH 7 (d) dan fraksi pH 10 (e)

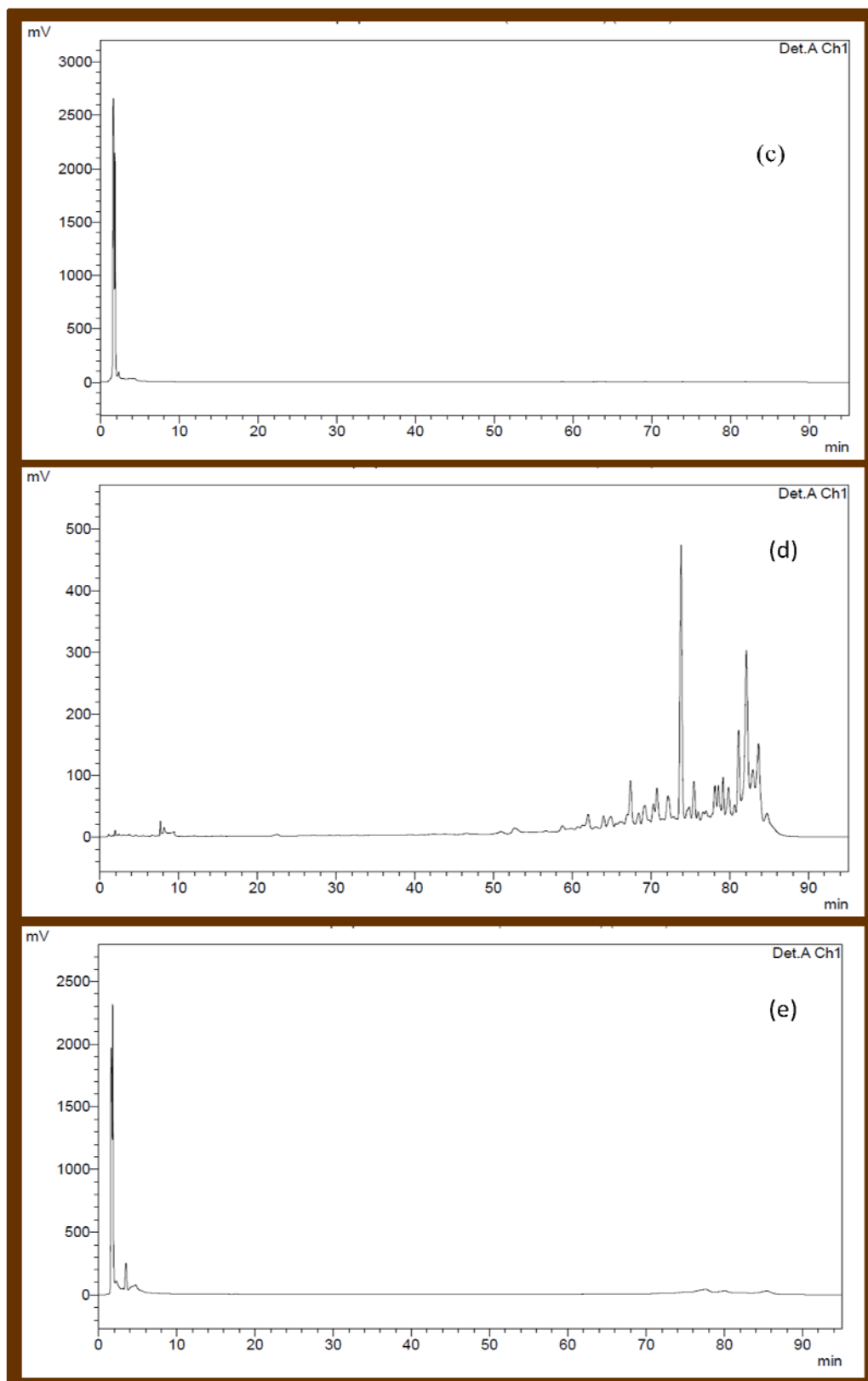
Profil kimia EEP dari sampel yang diteliti (Gambar 5.5a) menunjukkan komposisi kimia yang kompleks dengan berbagai puncak pada waktu retensi yang berbeda.

Perlakuan pH terhadap larutan EEP (Gambar 5b – 5e) hanya memberi respon perubahan profil yang signifikan pada daerah waktu retensi < 3 menit yang berhubungan dengan senyawa polaritas tinggi. Pada daerah ini (waktu retensi 0 – 3 menit), nampak bahwa jika pH ditingkatkan ekstrak semakin diperkaya oleh senyawa dengan waktu retensi yang lebih rendah.

5.3.2 Fraksinasi berbasis perbedaan polaritas pelarut pengekstrak

Dalam penelitian ini, fraksinasi dengan menggunakan tiga pelarut dengan kepolaran berbeda (air, etilasetat dan kloroform) dan dikelompokkan dalam dua sistem, yakni sistem air-etilasetat dan sistem air-kloroform, masing-masing sistem dengan perbandingan 1 : 1 (v/v). Dengan demikian, akan diperoleh 4 fraksi yakni: fraksi etil asetat, fraksi air dari etilasetat, fraksi kloroform dan fraksi air dari kloroform. Hasil fraksinasi dipantau dengan *HPLC* seperti yang disajikan oleh kromatogram pada Gambar 5.8





Gambar 5.8 Kromatogram *HPLC* dari EEP (a), fraksi etilasetat (b), fraksi air sistem air-etilasetat (c), fraksi kloroform(d) dan fraksi air sistem air-kloroform (e)

5.4. Uji Aktivitas Antimikroba dan Pemilihan Varian Fraksi Bioaktif.

Uji aktivitas antimikroba meliputi uji zona hambat, penentuan nilai *MIC* dan *MBC*. Rataan zona inhibisi pertumbuhan *S. mutans* dari EEP dan berbagai fraksinya, disajikan dalam Tabel 5.8. Di antara bahan uji yang dicobakan, hanya EEP, fraksi etilasetat dan fraksi kloroform yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans*. Sebaliknya, fraksi air (fraksi yang mengandung senyawa dengan kepolaran yang tinggi) tidak menunjukkan aktivitas anti bakteri. Selanjutnya, daya antibakteri dari EEP dan fraksinya masih lebih rendah dibanding klorheksidin yang digunakan sebagai kontrol positive. Sebagai kontrol negatif digunakan pelarut etanol 6,5% (konsentrasi akhir setelah pengenceran dalam bahan uji), tidak menunjukkan zona hambat terhadap *S. mutans*.

Tabel 5.8 Rataan (n=4) zona inhibisi pertumbuhan *S. mutans* oleh EEP dan berbagai fraksinya

Bahan Uji	Rataan (n=4) dari zona inhibisi (mm)
EEP	3,25
Sistem Air-Etilasetat:	
Fraksi etilasetat	3,63
Fraksi air	0
Sistem Air-Kloroform: \	
Fraksi kloroform	4,75
Fraksi air	0
Blanko (kontrol negatif)	0
Klorheksidin (kontrol positif)	6,88

Nilai *MIC* dan *MBC* dari EEP dan berbagai fraksinya disajikan pada Tabel 5.9, memberikan pola yang sama dengan pola yang ditunjukkan dalam eksperimen zona hambat dengan metode difusi agar (Tabel 5.8) yakni dengan urutan daya

inhibisi fraksi kloroform > fraksi etilasetat > EEP. Komponen dengan kepolaran yang tinggi (berada dalam fraksi air) relatif tidak menunjukkan aktivitas antibakteri (*MIC* dan *MBC* >1600 µg/ml).

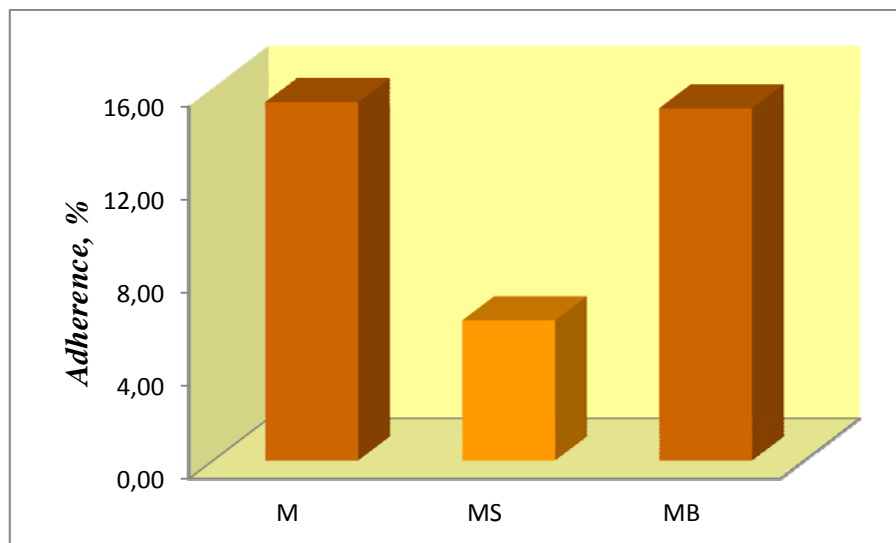
Tabel 5.9 Nilai *MIC* dan *MBC* dari EEP dan berbagai fraksinya yang diperoleh dengan cara fraksinasi berbasis perbedaan kepolaran pelarut pengekstrak

Bahan Uji	<i>MIC</i> (µg/ml)	<i>MBC</i> (µg/ml)
EEP	600 – 800	>1600
Sistem Air-Etilasetat:		
- Fraksi Etilasetat	100 – 200	400 – 800
- Fraksi air	>1600	>1600
Sistem Air-Kloroform:		
- Fraksi Kloroform	50 – 100	400 – 800
- Fraksi Air	>1600	>1600
Klorheksidin (kontrol positif)	<12,5	<12,5

Berdasarkan data pengujian aktivitas anti bakteri ini dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform dari EEP merupakan fraksi yang paling potensial sebagai agen antikaries dari propolis yang diinvestigasi.

5.5. Uji *Adherence* pertumbuhan *S.mutans*

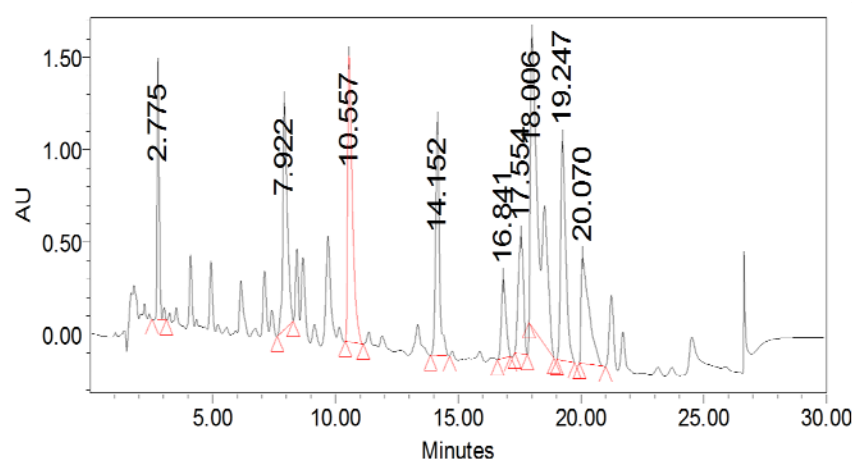
Dalam penelitian ini fraksi EEP yang paling potensial sebagai sumber agen antikaries (fraksi kloroform) diujikan pengaruhnya dalam menghambat karakter *adherence* dari *S.mutans* dan hasil yang diperoleh disajikan dalam bentuk diagram (Gambar 5.9). Data pada gambar 5.9 memberi gambaran secara tidak langsung, bahwa fraksi kloroform dari EEP menunjukkan kemampuan yang cukup bermakna dalam menghambat sintesis glukosa oleh *S.mutans* yang diujikan.



Gambar 5.9 Karakteristik *adherence S.mutans* (%) dalam media *BHI* yang mengandung 1% sukrosa (M), dalam media + fraksi kloroform 50µg/ml (MS) dan media + pelarut sebagai blanko (MB)

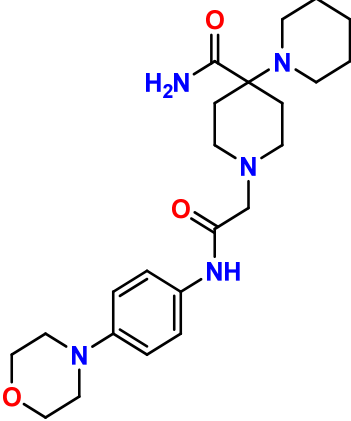
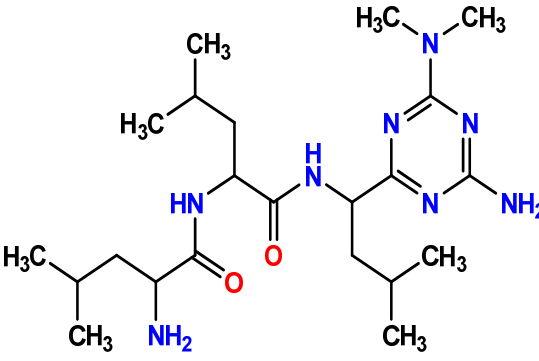
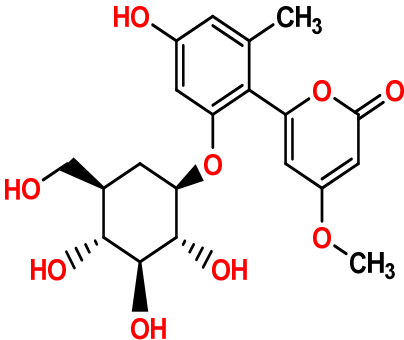
5.6. Identifikasi Kimia Varian Fraksi Bioaktif Terpilih

Analisis dilakukan hanya terhadap komponen mayor, yakni yang memberi luas puncak yang besar pada profil *LC-MS* (Gambar 5.10). Identifikasi dengan bantuan *database ChemSpider* memberikan hasil seperti yang disajikan dalam Tabel 5.10.

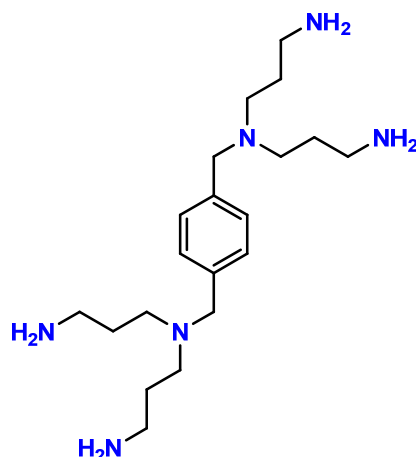


Gambar 5.10 Profil *LC-MS* fraksi kloroform dari EEP

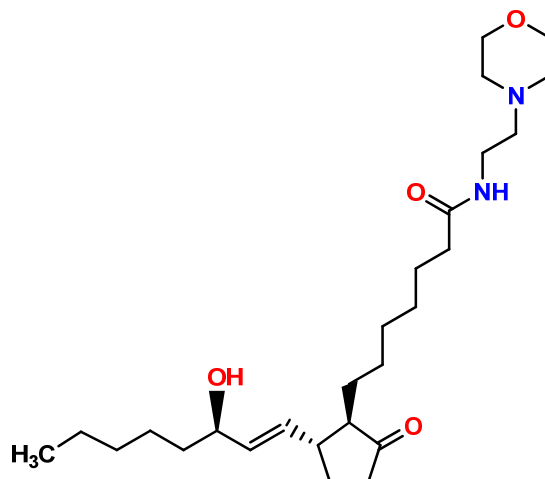
Tabel 5.10 Komponen mayor fraksi kloroform dari EEP

tr (menit)	Nama Senyawa	Struktur Senyawa
2,776	<i>1'-(2-{[4-(4-Morpholinyl)phenyl]amino}-2-oxoethyl)-1,4'-bipiperidine-4'-carboxamide</i>	
7,992	<i>Leucyl-N-{1-[4-amino-6-(dimethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]-3-methylbutyl}leucinamide</i>	
10,557	<i>5-Hydroxy-2-(4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)-3-methylphenyl β-D-glucopyranoside. Aloenin</i>	

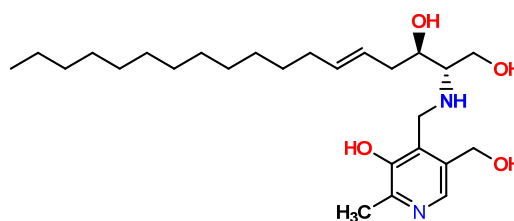
- 14,152 $N^1, N^{1'}$ -[1,4-
Phenylenebis(methylene)
]bis[N^1 -(3-aminopropyl)-
1,3-propanediamine



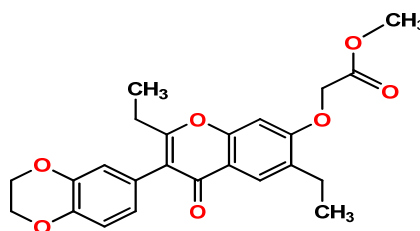
- 16,841 (13E,15R)-15-Hydroxy-
N-[2-(4-
morpholinyl)ethyl]-9-
oxoprost-13-en-1-amide



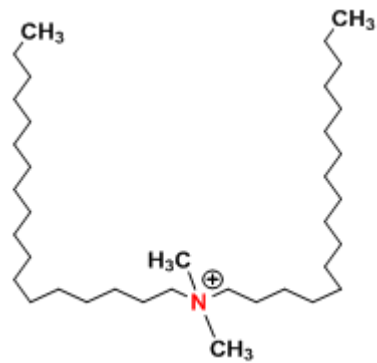
- 17,554 (2S,3R,5E)-2-({[3-
Hydroxy-5-
(hydroxymethyl)-2-
methyl-4-
pyridinyl]methyl}amino)-
5-octadecene-1,3-diol



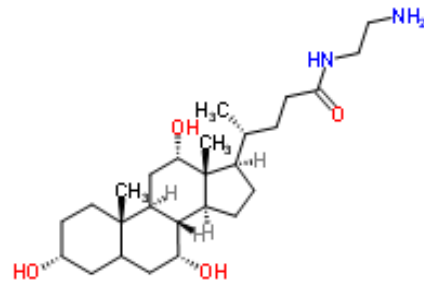
- 18.006 Methyl {[3-(2,3-dihydro-
1,4-benzodioxin-6-yl)-
2,6-diethyl-4-oxo-4H-
chromen-7-
yl]oxy}acetate



19,247 *N,N*-Dimethyl-*N*-
octadecyl-1-
octadecanaminium



20,070 *3α,7α,12α*-*N*-(2-
Aminoethyl)-*3,7,12*-
trihydroxycholelan-24-
amide



tr : waktu retensi

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Pemilihan Metode Ekstraksi Senyawa Bioaktif

Tahapan kritis dalam proses pengujian bahan aktif dari material alam adalah ekstraksi bahan aktif tersebut dari matriks alaminya. Dengan demikian, pemilihan metode ekstraksi bahan bioaktif yang efektif adalah penting agar pengujian ekspresi bioaktivitas dari bahan yang diinvestigasi berlangsung optimal. Tiga metode ekstraksi yakni metode tanpa pemanasan (maserasi), dengan pemanasan (refluks) dan dengan gelombang mikro (*MAE*) dievaluasi dalam upaya memperoleh suatu metode yang efektif dalam mengekstraksi bahan bioaktif dari sampel propolis yang diteliti. Untuk menghindari bias dalam evaluasi, maka perbandingan dilakukan pada kondisi optimal masing-masing metode tersebut. Oleh karena itu, perlu ditetapkan terlebih dahulu kondisi optimal masing-masing metode sebelum pemilihan dilakukan.

6.1.1. Optimasi parameter ekstraksi maserasi

Optimasi parameter ekstraksi (konsentrasi pelarut, x_1 dan waktu ekstraksi, x_2) untuk memperoleh rendemen ekstrak bioaktif optimal menggunakan metode respon permukaan dengan desain *central composite*. Metodologi respon permukaan (*RSM*) adalah kumpulan teknik statistik dan matematika, yang efektif untuk optimasi proses yang dipengaruhi oleh banyak faktor dan interaksi antar faktor tersebut.¹⁸⁴ Penggunaan metode ini dalam mengekstraksi senyawa fenolik dari bahan alam telah banyak digunakan.^{185,186,187}

Rendemen polifenolik (total fenolik dan flavonoid) digunakan sebagai respon komponen bioaktif dari sampel propolis, karena senyawa tersebut dipandang memberi kontribusi yang besar dalam pengobatan dibanding konstituen lainnya dalam propolis.^{126,188} Dalam penelitian ini, faktor rasio propolis/pelarut tidak dipertimbangkan sebagai variabel optimasi dan dibuat tetap (1:10). Pertimbangan ini mengacu pada hasil penelitian Trusheva et al. (2007) yang menyatakan bahwa

rasio di atas 1 : 10 tidak berpengaruh secara signifikan terhadap hasil ekstraksi dan hanya menyebabkan pemborosan pelarut dan energi.¹⁷²

Dengan mengaplikasi analisis regresi ganda pada data eksperimental, menunjukkan bahwa respon dan variabel bebas dihubungkan oleh persamaan polinomial orde kedua seperti yang diberikan oleh persamaan (5.1) dan (5.2). Signifikansi dan kesesuaian dari model ini dianalisis dengan menggunakan *ANOVA* seperti yang dianjurkan oleh Fu et al. (2007).¹⁸⁹ Hasil analisis menunjukkan bahwa model adalah signifikansi dan kesesuaian antara nilai-nilai diobservasi dan diprediksi mempunyai derajat korelasi yang tinggi. Selain itu, rendahnya nilai koefisien variasi ($CV < 10\%$) memberi gambaran bahwa model dipandang *reproducible*. Dengan demikian, model persamaan (5.1) dan (5.2) layak digunakan untuk memprediksi kondisi optimal ekstraksi maserasi.

Kondisi optimal untuk memperoleh rendemen atau respon maksimal untuk total fenolik dan flavonoid relatif sama (total fenolik: konsentrasi etanol = 70,72% dan waktu ekstraksi = 49,21 jam; flavonoid: konsentrasi etanol = 71,99% dan waktu ekstraksi = 50,03 jam). Trusheva et al (2007) melakukan ekstraksi propolis secara maserasi dengan etanol 70% selama 72 jam, sedangkan Shouqin et al (2005) menggunakan etanol 70% selama 7 hari. Mārghitas et al (2007) juga menggunakan etanol 70% dengan waktu ekstraksi 24 jam dalam melakukan validasi metode analisis total fenol dan flavonoid dalam romania propolis. Miguel et al (2011) melakukan ekstraksi secara maserasi dengan etanol 70% selama 96 jam untuk mengidentifikasi aktivitas aktioksidan propolis dari Algarve. Semua peneliti ini tidak memberikan gambaran apakah kondisi yang digunakan melalui proses optimasi. Namun demikian, konsentrasi etanol yang digunakan oleh peneliti tersebut adalah sama dan juga mirip dengan kondisi optimal pelarut yang dievaluasi. Sebaliknya, waktu ekstraksi optimal yang diperoleh dalam penelitian ini lebih pendek dibanding waktu ekstraksi yang dilakukan oleh peneliti-peneliti tersebut. Selain itu, dari gambar 5.1 juga menunjukkan bahwa jika waktu ekstraksi diperpanjang melewati kondisi optimal atau konsentrasi etanol ditingkatkan di atas konsentrasi optimal, menurunkan rendemen ekstraksi. Dari gambaran ini, optimasi metode ekstraksi perlu dilakukan untuk mendapatkan

komponen bioaktif yang optimal agar eksplorasi komponen bioaktif lanjut juga optimal, disamping itu proses ekstraksi berlangsung lebih efisien.

6.1.2. Optimasi parameter ekstraksi refluks

Seperti halnya dengan optimasi parameter ekstraksi maserasi, model (persamaan 5.3 dan 5.4) yang diperoleh melalui aplikasi regresi ganda terhadap data eksperimental bermakna signifikan dan menunjukkan korelasi yang tinggi antar data eksperimental dan yang diprediksi melalui model tersebut. Dengan demikian, model persamaan (5.3) dan (5.4) layak digunakan untuk memprediksi kondisi optimal ekstraksi refluks.

Kondisi optimum dari variable bebas untuk mendapatkan total fenolik maksimal, yaitu konsentrasi etanol=70.79% dan waktu ekstraksi = 77.37 menit dengan kadar fenol prediksi sebesar 4.25%. Dalam hal parameter optimum untuk mendapatkan flavonoid maksimal yaitu konsentrasi etanol=70.25% dan waktu ekstraksi = 78.76 menit dengan kadar flavonoid prediksi sebesar 0.24%. Berbagai penelitian yang menggunakan metode ekstraksi komponen bioaktif propolis yang distimulasi oleh panas menunjukkan penggunaan konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi yang lebih variatif dibanding yang dilakukan dengan metode maserasi. Shouqin et al (2005) melakukan ekstraksi polifenol dari propolis secara refluks dengan etanol 95% selama 4 jam (240 menit), sedangkan kondisi ekstraksi yang dilakukan oleh Alencar et al. (2007) adalah etanol 80% dan waktu ekstraksi 30 menit.¹⁷⁷ Seperti halnya teknik maserasi, berbagai penelitian yang menggunakan teknik ekstraksi berbantuan panas (refluks) juga tidak memberi gambaran bahwa kondisi yang digunakan merupakan kondisi optimal.

6.1.3. Optimasi parameter ekstraksi berbantuan gelombang mikro

Desain yang digunakan dalam optimasi parameter ekstraksi dengan metode *MAE* adalah desain faktorial lengkap, berbeda dengan desain yang digunakan dalam optimasi pada metode maserasi dan refluks. Selain itu, parameter ekstraksi yang dilibatkan dalam proses optimasi ditambah dengan parameter daya gelombang mikro (x_3). Penggunaan desain faktorial lengkap ini merupakan solusi untuk

keluar dari masalah keterbatasan variabel daya perangkat gelombang mikro yang digunakan. Konsekuensinya jumlah percobaan yang dilakukan jauh lebih banyak (27 kombinasi) dibanding jika menggunakan desain *central composite*.

Persamaan (5.5) dan (5.6) untuk memprediksi kondisi optimal dari ekstraksi *MAE* juga layak digunakan berdasarkan evaluasi *ANOVA*. Selanjutnya, parameter optimum dari variable bebas yang diperoleh untuk mendapatkan total fenolik maksimal, yaitu konsentrasi etanol=60,85%, waktu ekstraksi = 30,57 menit, Daya=495,4 watt dengan kadar fenol prediksi sebesar 5,81%. Dalam hal parameter optimum untuk mendapatkan kadar flavonoid maksimal yaitu konsentrasi etanol=64,66%, waktu ekstraksi = 24,4 menit, daya =520,9 watt dengan kadar flavonoid prediksi sebesar 0.36%.

Tidak seperti halnya ekstraksi dengan metode maserasi dan refluks, pengaruh konsentrasi etanol dengan *MAE* memberi dampak negatif terhadap respon seperti yang ditunjukkan pada suku x_1 dalam persamaan (5.5) dan (5.6). Kemampuan ekstraksi dari suatu pelarut dengan menggunakan *MAE* sangat dipengaruhi oleh karakter dielektriknya (Letellier et al., 1999; Kiss et al., 2000).^{190,191} Dalam hal ini, dengan meningkatnya konsentrasi etanol akan menyebabkan turunnya karakter dielektriknya, akibatnya menurunkan kemampuannya mengabsorpsi gelombang mikro dan mengekstrak komponen-komponen fenolik. Dua hal penting yang perlu dikompromikan dalam campuran pelarut pengektak, yakni kemampuan mengektak dan karakter dielektrik dari masing-masing individu pelarut. Gambar 5.5b dan 5.6b mengillustasikan kompromi ini yaitu peningkatan kandungan total fenolik dan flavonoid terjadi dengan meningkatnya konsentrasi etanol sampai level tertentu dan selanjutnya menurun lagi.

6.1.4 Perbandingan metode ekstraksi

Tabel 5.7. menggambarkan bahwa pada kondisi optimal, rendemen flavonoid dan total fenolik relatif sama untuk teknik maserasi dan refluks, yakni 0,2 % untuk flavonoid dan 4% untuk total fenolik. Peningkatan rendemen diamati pada teknik *MAE* yakni 0,4% dan 5,8% berturut-turut untuk flavonoid dan total fenolik.

Pengaruh faktor waktu ekstraksi dan konsentrasi etanol untuk ekstraksi dengan metode maserasi terhadap kadar flavonoid dan total fenolik relatif sama. Sebaliknya, nampak perbedaan pengaruh kedua faktor tersebut dengan adanya stimulasi panas (refluks) dan terutama irradiasi gelombang mikro. Selain itu waktu optimal ekstraksi flavonoid dengan adanya stimulan ini lebih pendek dibanding ekstraksi total fenolik yang menggambarkan bahwa fraksi flavonoid rentang terdegradasi/teroksidasi oleh efek panas. Fenomena ini sesuai dengan hasil yang ditemukan oleh Trucheva et al. (2007).¹⁷² Namun demikian, fenomena ini dapat ditekan dengan bekerja pada kondisi optimal. Dari ketiga metode yang dicobakan, metode *MAE* lebih efektif (berbasis rendemen ekstraksi, waktu ekstraksi dan konsumsi pelarut) dalam mengekstraksi flavonoid dan total fenolik dibanding kedua metode lainnya. Disamping itu, metode *MAE* juga menunjukkan selektivitas yang tinggi dalam mengekstraksi fraksi flavonoid.

6.2 Fraksinasi Ekstrak Etanol Propolis

Fraksinasi EEP dilakukan dengan dua cara, yakni berbasis perbedaan pH dan berbasis perbedaan polaritas pelarut pengekstrak.

6.2.1 Fraksinasi berbasis perbedaan pH

EEP diperlakukan pada berbagai pH (1 – 10) dalam rangkaian berkesinambungan, selanjutnya diekstraksi dengan kloroform. Hasil ekstraksi dipantau dengan teknik *HPLC* dan hasil yang diperoleh berupa kromatogram dari ekstrak yang diinvestigasi.

Kromatogram pada dasarnya memberi informasi profil kimia dari bahan yang dianalisis dan banyak peneliti telah menggunakan teknik *HPLC* ini dalam mengelusidasi profil kimia sampel propolis. Alencar et al, (2007) menunjukkan bahwa profil kimia EEP propolis merah dari Brazilia didominasi oleh senyawa dengan polaritas tinggi.¹⁷⁷ Sebaliknya, profil kimia EEP yang berasal dari Venezuela tersusun oleh hanya sedikit senyawa dengan polaritas rendah, mirip dengan yang ditemukan dalam propolis Brazilia *type-6*.^{60,192}

Profil kimia EEP dari sampel yang diteliti (Gambar 5.7a) menunjukkan komposisi kimia yang kompleks dengan berbagai puncak pada waktu retensi yang berbeda. Berdasarkan prinsip *HPLC* dengan teknik fase balik yang diaplikasikan dalam penelitian ini, maka kromatogram yang diperoleh dapat diklasifikasikan dalam dua kelompok yakni: kelompok dengan polaritas tinggi (waktu retensi <3 menit) dan kelompok dengan polaritas lebih rendah (waktu retensi >40 menit). Dari pengklasifikasian ini, nampak bahwa sampel yang diteliti didominasi oleh senyawa dengan polaritas rendah.

Perlakuan pH terhadap larutan EEP (Gambar 5.7b – 5.7e) hanya memberi respon perubahan profil yang signifikan pada daerah waktu retensi < 3 menit yang berhubungan dengan senyawa polaritas tinggi. Pada daerah ini (waktu retensi 0 – 3 menit), nampak bahwa jika pH ditingkatkan ekstrak semakin diperkaya oleh senyawa dengan waktu retensi yang lebih rendah. Ini bermakna bahwa komponen dengan waktu retensi yang paling rendah mempunyai sifat keasaman yang paling tinggi. Sebaliknya, daerah waktu retensi di atas 3 menit, sehubungan dengan senyawa polaritas lebih rendah, relatif tidak mengalami perubahan atau tetap dipertahankan seperti awalnya pada EEP.

Berdasarkan berbagai fenomena ini, dapat disimpulkan bahwa fraksinasi dengan perlakuan pH hanya sensitif digunakan untuk memfraksinasi komponen dengan tingkat kepolaran yang tinggi saja. Pemisahan kelompok senyawa dengan kepolaran yang tinggi terhadap kepolaran yang rendah belum berlangsung secara tuntas dengan teknik ini. Adanya etanol dalam fraksi air meningkatkan daya retensi komponen EEP dalam fase air untuk lepas ke fase kloroform, sehingga keefektifan kloroform dalam mengekstraksi komponen EEP adalah rendah.

6.2.2 Fraksinasi berbasis perbedaan polaritas pelarut pengekstrak

Berbasis fenomena adanya etanol dalam fraksi air akan menurunkan kemampuan ekstraksi dari pelarut dengan kepolaran yang lebih rendah, maka dalam fraksinasi berbasis perbedaan kepolaran pelarut pengekstrak dilakukan terhadap sampel EEP yang terlebih dahulu dibebaskan terhadap pelarut. Tiga pelarut dengan polaritas yang berbeda digunakan yakni air, etilasetat dan kloroform. Seperti halnya dalam

fraksinasi dengan perbedaan pH, hasil fraksinasi dipantau dengan teknik *HPLC* seperti yang disajikan dalam gambar 5.8.

Berbagai penelitian tentang penelusuran aktivitas biologis dari propolis merah *Brazilia* dengan memadukan teknik *bioassay* dan *HPLC* telah dipublikasikan. Alensar et al. (2007) telah melakukan fraksinasi yang dipandu oleh teknik *HPLC* dalam upaya menelusuri potensi komponen propolis merah *Brazilia* sebagai agen antioksidan, antimikroba dan antikanker.¹⁷⁷ Demikian juga, Castro et al. (2009) telah melakukan fraksinasi hingga ke tingkat sub-fraksi dalam rangka pemurnian fraksi antimikroba dari propolis yang berasal dari provinsi Bahia, *Brazilia*.

Dalam penelitian ini, fraksinasi dengan menggunakan tiga pelarut (air, etilasetat dan kloroform) dikelompokkan dalam dua sistem, yakni sistem air-etilasetat dan sistem air-kloroform, masing-masing sistem dengan perbandingan 1 : 1 (v/v). Dengan demikian, akan diperoleh 4 fraksi yakni: fraksi etil asetat, fraksi air dari etilasetat, fraksi kloroform dan fraksi air dari kloroform. Hasil fraksinasi menunjukkan bahwa pada fraksi etil asetat dalam ekstraksi dengan sistem air-etilasetat masih menyisakan relatif 1 puncak pada daerah komponen dengan kepolaran yang tinggi (waktu retensi < 3 menit) (gambar 5.8b) dan dua puncak lainnya tertinggal pada fase airnya (gambar 5.8c). Profil *HPLC* secara keseluruhan, mirip dengan yang diperoleh pada fraksinasi dengan menggunakan pH 1. Perbedaannya adalah bahwa dalam fraksinasi berbasis perbedaan kepolaran sudah tidak mengandung fraksi dengan kepolaran yang rendah pada fraksi airnya. Selanjutnya, fraksinasi dengan sistem air-kloroform (gambar 5.8d dan 5.8e) menunjukkan secara spektakuler pemisahan antara fraksi dengan kepolaran yang tinggi (tertarik ke dalam fraksi air) dan fraksi dengan kepolaran rendah (masuk ke fase kloroform). Dari hasil yang diperoleh ini dapat disimpulkan bahwa fraksinasi berbasis perbedaan kepolaran pelarut pengeksrak lebih efektif dibanding fraksinasi berbasis perbedaan pH dan fraksi yang dipilih untuk pengujian selanjutnya adalah fraksi yang diperoleh dari fraksinasi berbasis perbedaan polaritas pelarut pengeksrak.

6.3. Uji Aktivitas Antimikroba dan Pemilihan Varian Fraksi Bioaktif.

Uji aktivitas anti mikroba dari EEP dan fraksinya dilakukan melalui pengamatan zona hambat, *MIC* dan *MBC*. Hasil (Tabel 5.8 dan 5.9) ketiganya menunjukkan pola yang sama yakni dengan urutan daya inhibisi fraksi kloroform > fraksi etilasetat > EEP. Komponen dengan kepolaran yang tinggi (berada dalam fraksi air) relatif tidak menunjukkan aktivitas antibakteri (*MIC* dan *MBC* > 1600 µg/ml). Hasil kajian Duarte et al. (2003) juga menunjukkan bahwa senyawa aktif antibakteri dari propolis *type 6* mempunyai karakter non polar dan merupakan sumber yang berharga untuk eksplorasi senyawa bioaktif baru dalam propolis.¹⁵¹ Sementara itu, klorheksidin menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* yang lebih baik dibanding EEP dan fraksinya yang diinvestigasi dalam penelitian ini. Selanjutnya, perlu dicatat bahwa klorheksidin merupakan senyawa sintetik tunggal, sedangkan EEP dan fraksinya merupakan kelompok senyawa. Dengan demikian, kuantitas senyawa aktif dalam kelompok senyawa EEP atau fraksinya akan terencerkan oleh senyawa lainnya dalam kelompok tersebut.

Berdasarkan data pengujian aktivitas anti bakteri ini dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform dari EEP merupakan fraksi yang paling potensial sebagai agen antikaries dari propolis yang diinvestigasi. Walaupun kinerja antibakteri terhadap *S. mutans* dari fraksi kloroform ini masih lebih rendah dari klorheksidin, namun masih sangat memungkinkan untuk memperoleh agen antikaries yang sebanding dengan klorheksidin melalui eksplorasi hingga ke sub-fraksi atau senyawa tunggal. Pernyataan ini ditunjang oleh penelitian yang dilakukan oleh Castro et al. (2009) yang menunjukkan bahwa terjadi peningkatan daya inhibisi terhadap *S. aureus* dan *S. mutans* Ingbritt 1600 dari fraksi heksana propolis Brazilia *Type-6* ke sub-fraksinya dan nilai *MIC* dari sub-fraksi ini adalah sama dengan klorheksidin dalam menghambat *S. aureus* dan masih sebanding terhadap *S. mutans* Ingbritt 1600.

6.4 Uji *Adherence* pertumbuhan *S. mutans*

Pengaruh bahan bioaktif terhadap karakter *adherence S. mutans* penting diobservasi, karena *adherence/pelekatan* bakteri pada permukaan gigi merupakan

syarat utama dalam inisiasi pembentukan plak gigi. Disamping itu, karakteristik *adherence* bakteri biasanya dikaitkan dengan kemampuan bakteri mensintesis glukosa (terutama dari sukrosa), yang mempromosikan akumulasi streptococci kariogenik dan memberikan kontribusi yang signifikan terhadap pembentukan plak gigi.^{64,65}

Pengujian karakteristik *adherence* dalam penelitian ini dilakukan hanya terhadap fraksi EEP yang paling potensial sebagai sumber agen antikaries, yakni fraksi kloroform. Dalam media *BHI* yang mengandung 1% sukrosa memberikan karakter adherence pada permukaan kaca sebesar 15,48% dan adanya pelarut (blanko) tidak memberi efek terhadap karakter adherence dari *S.mutans* yang diujikan. Adanya fraksi kloroform dengan konsentrasi *sub-MIC* (50µg/ml) menurunkan kemampuan adherence dari *S.mutans* secara signifikan (penurunan sekitar 60% relatif terhadap media *BHI* yang mengandung 1% sukrosa). Keadaan ini memberi gambaran secara tidak langsung, bahwa fraksi kloroform dari EEP menunjukkan kemampuan yang cukup bermakna dalam menghambat sintesis glukosa oleh *S.mutans* yang diujikan.

6.5. Identifikasi Varian Fraksi Bioaktif Terpilih

Identifikasi komponen penyusun varian fraksi bioaktif terpilih (fraksi kloroform) dilakukan dengan menggunakan teknik *LC-MS* yang dibantu dengan *data base ChemSpider*. Analisis dilakukan hanya terhadap komponen mayor, yakni yang memberi luas puncak yang besar pada profil *LC-MS*.

Hasil menunjukkan bahwa komposisi fraksi bioaktif terpilih ini didominasi oleh senyawa bernitrogen yang sebagian besar merupakan turunan asam amino. Turunan morfolin seperti 1'-(2-{[4-(4-Morpholinyl)phe-nyl]amino}-2-oxoethyl)-1,4'-bipiperidine-4'-carboxamide dan (13E,15R)-15-Hydroxy-N-[2-(4morpholinyl)ethyl]-9-oxoprost-13-en-1-amide berpotensi sebagai agen antibakteri yang umum dijumpai pada kelompok senyawa ini. N,N-Dimethyl-N-octadecyl-1-octadecanaminium berpotensi sebagai antioksidan. Kroenke (1978) telah mematenkan

garam molibdenium dari *N,N-Dimethyl-N-octadecyl-1-octa-decanaminium* sebagai agen *antismoke*.¹⁹³

5-Hydroxy-2-(4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)-3-methylphenyl β-D-glucopyranoside merupakan turunan aloenin yang banyak dijumpai pada tanaman *Aloe arborescens* Mill. Var. *Natalensis* Berger. Menurut Hirata dan Saga (1978), aloenin digunakan di Jepang sebagai bahan obat tradisional untuk gangguan gastro-intestinal, luka bakar, gigitan serangga, kutu air.¹⁹⁴

Sebagai tambahan, nampak bahwa kandungan kimia sampel propolis yang diteliti sangat berbeda dengan propolis Eropa yang didominasi oleh senyawa polifenolik dan propolis Brazilia dan Amerika Latin lainnya yang didominasi oleh turunan asam kumarat terprenilasi dan asetofenon.^{129,130}

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan data dan berbagai fenomena yang diperoleh dalam penelitian ini, maka dapat ditarik beberapa kesimpulan seperti berikut.

- 7.1.1. Tiga metode ekstraksi yang dievaluasi, pada kondisi optimalnya, yakni metode ekstraksi konvensional tanpa stimulasi panas (maserasi), dengan stimulasi panas (refluks) dan dengan stimulasi panas via energi gelombang mikro. Pada kondisi optimal, rendemen flavonoid dan total fenolik yang digunakan sebagai respon optimasi, relatif sama untuk metode maserasi dan refluks, yakni sekitar 0.2 % untuk flavonoid dan 4% untuk total fenolik. Peningkatan rendemen diamati pada metode *MAE* yakni 0.4% dan 5.8% berturut-turut untuk flavonoid dan total fenolik. Selain itu selektivitas metode *MAE* terhadap rendemen flavonoid dan total fenol lebih tinggi dibanding kedua teknik lainnya. Berdasarkan rendemen, waktu ekstraksi dan konsumsi pelarut, metode *MAE* lebih efisien dalam mengekstraksi flavonoid dan total fenolik dibanding kedua metode lainnya.
- 7.1.2. Data yang diperoleh dari dua teknik fraksinasi EEP (berbasis perbedaan pH dan kepolaran pelarut pengestrak) menunjukkan fraksinasi berbasis kepolaran pelarut lebih efektif dibanding berbasis perbedaan pH, ditinjau dari aspek pemisahan komponen penyusun EEP. Selanjutnya, profil kimia berbasis kromatogram *HPLC* menunjukkan Profil kimia EEP dari sampel yang diteliti menunjukkan komposisi kimia yang kompleks dengan berbagai puncak pada waktu retensi yang berbeda dan didominasi oleh komponen dengan kepolaran yang rendah. Fraksinasi dengan sistem air-kloroform menunjukkan secara signifikan pemisahan antara fraksi dengan kepolaran yang tinggi dan fraksi dengan kepolaran

rendah. Dalam hal ekstraksi dengan sistem air-etilasetat, masih menyisakan satu puncak pada daerah kepolaran yang tinggi.

- 7.1.3. Berdasarkan uji aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans* ATCC 25175 (zona hambat, *MIC* dan *MBC*), menunjukkan bahwa fraksi kloroform dari EEP adalah fraksi yang paling potensial sebagai agen anti karies dibanding EEP dan fraksi lainnya yang diuji (fraksi etil asetat dan fraksi air dalam sistem air-kloroform dan air-etilasetat).
- 7.1.4. Karakteristik dari fraksi yang potensial sebagai agen antikaries (fraksi kloroform) adalah: kepolaran rendah, *MIC* = 50 – 100 µg/ml, *MBC* = 400 – 800 µg/ml dan karakter *adherence* = 6.02% (penurunan *adherence* sekitar 60% relatif terhadap media BHI yang mengandung 1% sukrosa sebagai pembanding).
- 7.1.5. Sensitivitas antibakteri (*S. mutans*) dari fraksi yang potensial ini masih di bawah klorheksidin (*MIC* dan *MBC* < 12.5 µg/ml). Namun demikian, eksplorasi hingga ke sub-fraksi atau komponen tunggal dari fraksi kloroform ini, masih memungkinkan untuk mendapatkan komponen dengan sensitivitas yang sebanding dengan klorheksidin.
- 7.1.6. Konstituen mayor dari fraksi yang potensial sebagai agen antikaries didominasi oleh senyawa bernitrogen. Dua diantaranya merupakan turunan morfolin yang banyak digunakan sebagai biosida. Sementara itu, *N,N-Dimethyl-N-octadecyl-1-octa-decanaminium* berpotensi sebagai antioksidan dan teridentifikasi juga satu turunan aloenin yang telah digunakan dalam pengobatan tradisional di Jepang.

7.2 Saran

Pada dasarnya, kajian komponen bioaktif propolis bertujuan mendapatkan senyawa bioaktif baru dari bahan alami yang berguna untuk pengembangan pengobatan masa akan datang. Dalam penelitian ini, hanya dihantarkan sampai ke tingkat fraksi yang potensial sebagai agen antikaries. Penelitian hingga ke tingkat sub-fraksi atau senyawa tunggal perlu ditindaklanjuti agar diperoleh agen antikaries dengan sensitivitas yang sebanding dengan klorheksidin yang saat ini dianggap sebagai “*Gold Standard*” antikaries.

RINGKASAN

Pendahuluan

Karies adalah penyakit infeksi yang masih merupakan masalah kesehatan mulut utama di berbagai belahan dunia.¹ Prevalensi karies aktif di Indonesia juga cukup tinggi, menurut Riset Kesehatan Dasar Nasional 2007 adalah 43,4% dan 14 provinsi di antaranya memiliki prevalensi aktif di atas prevalensi nasional.² Upaya pencegahan karies di Indonesia masih belum optimal dan agar penurunan indeks karies sesuai pedoman *WHO* dapat tercapai, maka perlu diupayakan pencegahan dari segala aspek penyebab karies.

Karies merupakan penyakit kompleks yang disebabkan oleh ketidakseimbangan fisiologis antara mineral gigi dan fluida biofilm.^{4,5,6} Terjadinya karies adalah multifaktor yang saling berinteraksi, yakni: *host* (gigi dan saliva), mikroorganisme terutama bakteri, substrat dan waktu.^{7,8} Selain itu, juga dipengaruhi oleh faktor pendidikan, status sosial, pola makan, pekerjaan, bahkan budaya manusia itu sendiri.^{9,10}

Salah satu spesies bakteri yang dominan dalam mulut dan merupakan penyebab utama timbulnya karies gigi yaitu *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Berbagai penelitian membuktikan adanya korelasi positif antara jumlah bakteri *S. mutans* pada plak gigi dengan prevalensi karies.^{12,13,14,15} *S. mutans* dipandang sebagai mikroorganisme yang paling kariogenik pada biofilm gigi. Hal ini disebabkan oleh kapasitasnya menggunakan karbohidrat dalam diet, seperti sukrosa, untuk mensintesis polisakarida ekstraseluler (glukan) dan karena sifat asidogenik serta asiduriknya.¹⁶ Polisakarida ekstraseluler merupakan faktor virulensi yang penting dari *S. mutans* karena polisakarida ini mempromosikan perlekatan bakterial pada permukaan gigi,^{17,18} memberi kontribusi terhadap integritas struktural biofilm,^{19,20} mengubah porositas biofilm²¹ sehingga karbohidrat dalam diet dapat masuk ke bagian dalamnya hingga mencapai antar muka biofilm-enamel dan akibatnya meningkatkan demineralisasi enamel.²² Oleh karena itu, bakteri ini menjadi target utama dalam upaya mencegah terjadinya karies gigi.^{23,24} Selain itu *S. mutans* juga digunakan untuk mengevaluasi sifat kariogenik yang disebabkan oleh karena sulitnya pengembangan studi *in vivo* dalam mengontrol situasi kariogenik.²⁵ Ccahuana-Vásquez dan Cury (2010) telah memvalidasi *S. mutans* sebagai model untuk mengevaluasi agen antimikroba dan demineralisasi enamel dengan cara mensimulasi berbagai episode (*feast-famine*) paparan sukrosa.²⁶

Klorheksidin dan triklosan adalah agen kimia sintetik yang merupakan material representatif untuk perawatan mulut saat ini. Meskipun kedua agen tersebut memiliki karakteristik antibakteri yang kuat dan dengan spektrum yang luas^{27,28}, mereka juga memiliki efek samping jangka panjang, seperti pewarnaan intraoral, mempengaruhi persepsi rasa, iritasi mukosa mulut dan gangguan pada ekologi bakteri rongga mulut.^{29,30} Koo et al. (2003) menunjukkan bahwa penggunaan klorheksidin dengan konsentrasi 1,33 mM untuk satu menit dan dua kali sehari, mempengaruhi secara dramatis viabilitas *S. mutans*.³¹ Gejala yang paling sering dilaporkan, berdasarkan laporan pasca pemasaran produk obat kumur klorheksidin glukonat, adalah *stomatitis*, *gingivitis*, *glossitis*, *ulcer*, mulut kering, *hypesthesia*, *glossal edema*, dan *paresthesia*.³² Oleh karena itu diperlukan penemuan senyawa baru tanpa efek samping selama penggunaan jangka panjang.

Saat ini pendekatan yang banyak diteliti para ahli adalah pencegahan pembentukan biofilm tanpa mengeliminasi mikroorganisme dari dalam rongga mulut di antaranya dengan pemanfaatan obat tradisional yang berasal dari tanaman atau bahan alam sebagai salah satu alternatif di bidang kedokteran gigi pencegahan. Pendekatan ini merupakan strategi yang diharapkan dapat melindungi gigi dari proses karies melalui intervensi terhadap interaksi bakteri dengan permukaan gigi.^{33,34} Beberapa bahan alam dari tanaman obat diyakini dapat mencegah karies dengan efek samping lebih ringan, walaupun hal tersebut masih memerlukan pembuktian ilmiah.

Salah satu bahan alam yang diyakini secara empiris mempunyai banyak khasiat dan relatif aman adalah propolis. Propolis adalah bahan alami tidak beracun dikumpulkan oleh lebah dari berbagai sumber tanaman telah digunakan sejak dahulu kala, di antaranya sebagai obat tradisional, biokosmetik, dan makanan kesehatan.^{36,37,38} Propolis memiliki aktivitas biologis dengan spektrum yang sangat luas, meliputi: antibakteri, antijamur, antivirus, antiprotozoa, antioksidan, antikanker, antiinflamasi, imunomodulator, agen antitumor, promotor penyembuhan luka dan sebagai agen anestesi.^{39,40,41,42,43,44} Propolis dapat menyembuhkan lesi kecil di mulut, angina, serta infeksi kulit, terapi mastitis yang disebabkan oleh mikroorganisme resisten terhadap antibiotik.⁴⁵ Komposisi kimia propolis sangat kompleks; flavonoid dan turunan (hidroksil) asam sinamat dan berbagai senyawa aromatik lainnya telah dianggap sebagai senyawa biologis aktif utama.⁴⁶ Sifat antibakteri propolis disebabkan oleh adanya flavonoida dan senyawa aromatik seperti asam kafeat.⁴⁷

Propolis berkhasiat sangat efektif terhadap bakteri gram positif⁵¹, terutama terhadap *Staphylococcus aureus*⁴⁹ dan terhadap bakteri gram negatif.⁵² Penelitian *in-vitro* menunjukkan bahwa propolis menghambat pertumbuhan *S. mutans*,^{53,54} yang merupakan agen etiologi utama karies gigi pada hewan dan manusia.^{16,55,56}

Penggunaan propolis dalam air minum atau dioleskan dapat mengurangi insidensi karies gigi pada tikus.⁵⁷

Duarte et al. (2003) mengkaji pengaruh fraksi/kelompok senyawa dalam propolis Brazil yang secara kimia diklasifikasikan sebagai propolis tipe 6 terhadap aktivitas *GTFs* dan pertumbuhan mutans streptococci. Fraksi dibedakan berdasarkan kelarutannya dalam berbagai polaritas pelarut (heksana, kloroform, etil asetat dan etanol). Hasil kajian ini menunjukkan bahwa senyawa aktif antibakteri dari propolis tipe 6 mempunyai karakter nonpolar dan merupakan sumber yang berharga untuk eksplorasi senyawa bioaktif baru dalam propolis.¹⁵¹

Mekanisme kerja propolis sebagai antimikroba adalah kompleks, dapat disebabkan oleh sinergisme antara fenolik dan senyawa lainnya.^{58,59} Propolis menghambat pertumbuhan bakteri melalui pencegahan pembelahan sel, sehingga mengakibatkan terbentuknya *Streptococcus* pseudo-multisel. Selain itu, propolis menyebabkan membran sitoplasmik dan dinding sel tidak beraturan, akibat bakteriolisis parsial dan penghambatan sintesis protein. Hal ini membuktikan bahwa mekanisme aksi propolis pada sel bakteri adalah kompleks dan tidak dapat dibuat analogi sederhana seperti cara kerja dari setiap antibiotik klasik.⁴⁵ Komposisi kimia propolis tergantung pada kekhususan flora lokal di lokasi pengumpulan, dengan demikian tergantung pada karakteristik geografi dan iklim dari lokasi tersebut. Komposisi kuantitatif dan kualitatif propolis memainkan peranan penting dalam aktivitas biologisnya. Sebagai ilustrasi, sampai saat ini terdapat dua belas jenis propolis Brazil yang berbeda secara kimia telah dikarakterisasi.⁶⁰ Dua jenis diantaranya (satu dari Brazil tenggara, tipe 12, dan yang lainnya dari Brazil selatan, tipe 3) merupakan jenis yang kaya akan flavonoid dan asam sinamat dan menunjukkan daya hambat yang luar biasa terhadap aktivitas glukosiltransferase yang telah dimurnikan (*GTFs*) secara in vitro.²⁴ *GTFs* memegang peranan penting dalam interaksi perekatan dengan *S. mutans* dan ekspresi virulensi oleh mikroorganisme ini.^{18,61,62,63} Glukan disintesis oleh *GTFs* tidak hanya mempromosikan akumulasi streptococci kariogenik pada permukaan gigi, tapi juga memberikan kontribusi yang signifikan terhadap pembentukan plak gigi.^{64,65} *S. mutans* menghasilkan setidaknya tiga *GTFs* yakni *GTF B*, yang mengkatalisis sintesis sebagian besar glukan terikat α 1-3 yang tidak larut air; *GTF C*, yang mengkatalisis sintesis campuran glukan terikat α 1-6 yang tidak larut dan larut; dan *GTF D*, yang mengkatalisis sintesis glukan terlarut. *GTFs B* dan *C* tampaknya merupakan *GTFs* paling penting terkait dengan karies gigi.⁶³ Di lain pihak, flavonoida maupun turunan asam sinamat tidak terdeteksi pada jenis yang diklasifikasikan sebagai tipe 6 (dari Brazil Timur Laut, hutan Atlantik, negara bagian Bahia).⁶⁶ Namun, ekstrak etanol propolis tipe 6 (EEP) menunjukkan aktivitas antimikroba yang luar biasa terhadap mikroorganisme patogen mulut, termasuk *S. mutans*.⁶⁷

Toksisitas, ulserasi mukosa, dan pengembangan strain bakteri resisten adalah masalah yang ditemukan pada penggunaan beberapa agen antibakteri sintetik. Adanya efek-efek yang merugikan ini mendorong penelitian terhadap studi agen antimikroba yang berbasis bahan alam. Kajian terhadap propolis Indonesia, terutama yang berhubungan dengan aktivitas anti karies relatif masih kurang. Sabir (2005) telah meneliti aktivitas antibakteri dari fraksi flavonoida propolis *Trigona* spp. yang berasal dari kabupaten Bulukumba-Sulawesi Selatan dan menunjukkan bahwa fraksi flavonoid tersebut mampu menghambat pertumbuhan *S. mutans* secara *in-vitro*.⁶⁹ Ekstrak etanol propolis *Apis mellifera* L dari berbagai daerah di Jawa (Sukabumi, Batang dan Lawang) menunjukkan perbedaan dalam komposisi kimia dan tingkat aktivitas sitotoksik terhadap *tumor cel lines* (*T47D*, *MCF-7*, *Hela*, *Myeloma* dan *Vero*).⁷⁰ Walaupun dalam kedua penelitian ini tidak menunjukkan komponen spesifik atau senyawa aktif prinsipal yang bertanggungjawab terhadap aktivitas biologis yang ditelitinya, namun penelitian ini membuka perspektif baru untuk penelitian selanjutnya. Identifikasi senyawa aktif prinsipal merupakan hal fundamental dalam rangka standarisasi propolis.⁷¹ Trusheva et al. (2011) telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi 11 senyawa dari propolis yang berasal dari Jawa Timur: empat alk(en)il resorsinol, empat prenilflavanon dan tiga triterpen jenis sikloartan. Keempat prenilflavanon menunjukkan aktivitas *scavenging* radikal yang signifikan dan satu dari keempat senyawa tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap *Staphylococcus aureus*.⁷²

Pada penelitian ini dilakukan investigasi terhadap propolis Indonesia yaitu propolis *Trigona* spp. yang berasal dari Banten. Beberapa aspek yang dikaji meliputi pemilihan metode ekstraksi bahan aktif agar diperoleh ekstrak yang dapat menggambarkan daya kerja bioaktif dan informasi molekuler yang optimal dari golongan senyawa berkhasiat sebagai agen antikaries; penentuan daya hambat terhadap *S. mutans* dari ekstrak bioaktif dan berbagai fraksinya yang diikuti dengan analisis kimia dan uji aktivitas *adherence* terhadap fraksi yang mempunyai kemampuan daya hambat yang paling optimal. Dari data kajian tersebut diperoleh agen antikaries yang potensial dan terkarakterisasi.

Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam paragraf pendahuluan, maka dirumuskan permasalahan dalam bentuk pertanyaan seperti berikut ini.

Pertanyaan Umum Penelitian

Apakah terdapat komponen bioaktif dalam sampel propolis *Trigona* spp. (Banten) yang potensial sebagai agen antikaries?

Pertanyaan Khusus Penelitian

(i). Bagaimana teknik ekstraksi terbaik untuk memperoleh ekstrak bioaktif propolis?, (ii) Bagaimana profil senyawa bioaktif dalam sampel propolis *Trigona* spp. yang berasal dari Banten ?, (iii) Fraksi dari ekstrak bioaktif yang mana memiliki efek inhibisi terbaik terhadap bakteri penyebab karies (*S. mutans*) ? (iv) Berapa nilai *MIC*, *MBC* dan bagaimana karakteristik *adherence* dari fraksi terbaik terhadap *S. mutans*. ? (v) Apakah fraksi terbaik dari ekstrak bioaktif memberi efek yang lebih baik dibanding agen antikaries yang dianggap standar saat ini (klorheksidin) ?, dan (vi) Bagaimana identitas kimia fraksi terbaik dari ekstrak bioaktif ?

Tujuan Penelitian

Secara umum, penelitian ini bertujuan untuk memperoleh ekstrak bioaktif propolis *Trigona* spp. asli Indonesia yang dapat digunakan sebagai agen anti karies gigi.

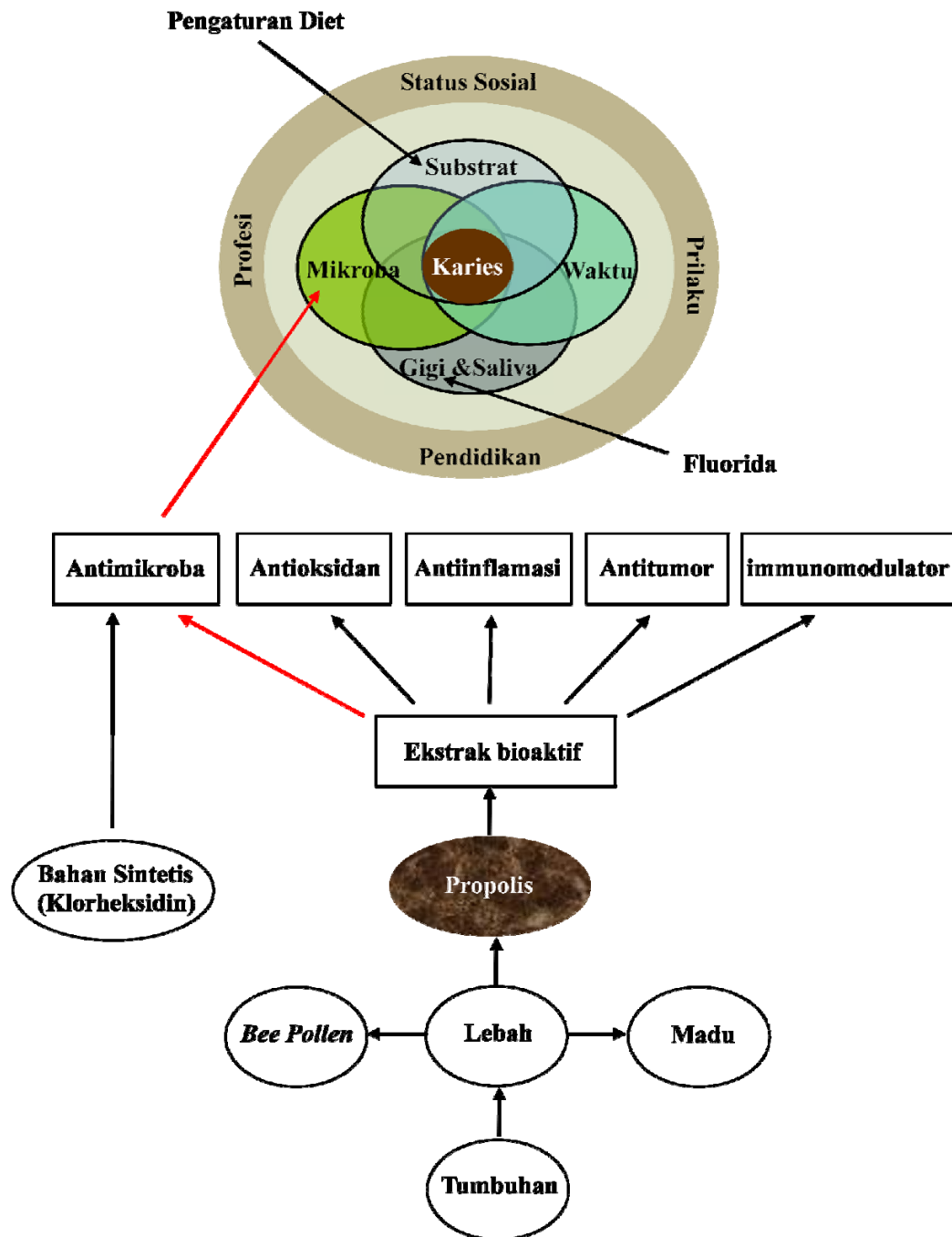
Tujuan khusus penelitian ini adalah (i) menetapkan cara ekstraksi bahan aktif biologis yang optimal dari propolis, khususnya dari matriks sampel propolis *Trigona* spp. asal Banten, (ii) menganalisis profil senyawa dalam ekstrak bioaktif dan fraksinya, (iii) menetapkan fraksi yang terbaik dari ekstrak bioaktif sebagai agen antikaries, (iv) menetapkan nilai *MIC*, *MBC* dan karakteristik *adherence* dari fraksi ekstrak bioaktif yang terbaik terhadap *S. mutans*, (v) menganalisis sensitivitas antibakteri dari fraksi ekstrak bioaktif yang terbaik terhadap *S. mutans*, dan (vi) mengidentifikasi komponen kimia dari fraksi ekstrak bioaktif yang terbaik sebagai agen anti karies

Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah (i) memperkaya khasanah penelitian di kedokteran gigi menyangkut penelusuran bahan bioaktif alami untuk keperluan pencegahan karies gigi melalui pendekatan yang berdasarkan analisis kimia dipandu oleh bioassay, (ii) memperkaya bank data obat asli Indonesia khususnya dalam pencegahan karies gigi, (iii) diperoleh fraksi atau kombinasi fraksi propolis *Trigona* spp. yang terbaik dan aman untuk mencegah karies gigi yang pada akhirnya untuk mengatasi salah satu masalah kesehatan gigi di Indonesia, (iv) memberi alternatif cara pencegahan karies gigi melalui penggunaan substansi alami yang diperoleh dari propolis, khususnya dalam menekan penggunaan bahan sintetik yang dapat memberi efek samping yang tidak diinginkan atau penggunaan antibiotik yang dapat menyebabkan resistensi. Selain itu, juga mengurangi ketergantungan terhadap bahan sintetik yang merupakan produk import, dan (v) memberi peluang untuk pengembangan budidaya propolis asli Indonesia, yang pada akhirnya memberi nilai tambah ekonomi nasional.

Kerangka Teori

Diagram kerangka teori dari penelitian ini, disajikan dalam Gambar 1

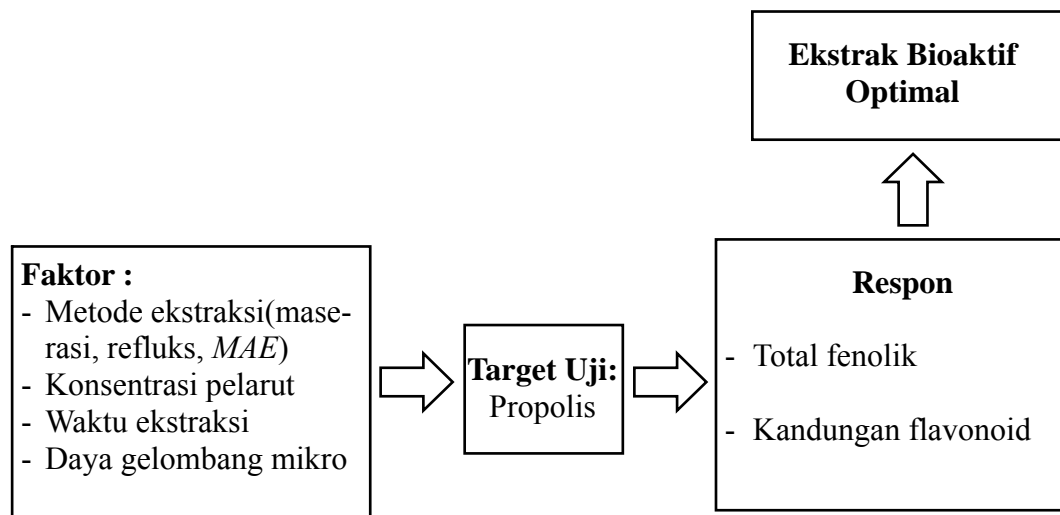


Gambar 1. Kerangka teori

Kerangka Konsep

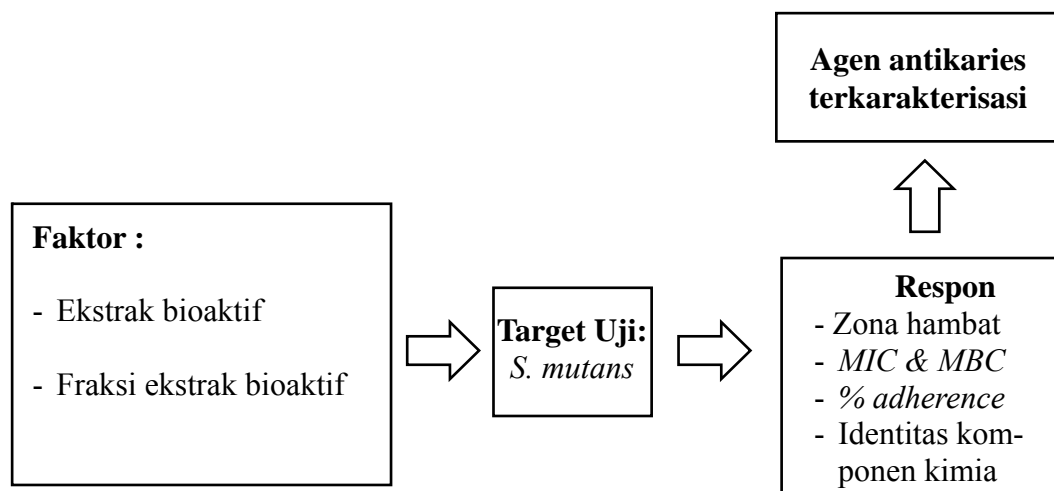
Kerangka konsep penelitian ini disajikan dalam bentuk diagram seperti dalam gambar 2.

a. Propolis \longrightarrow Ekstrak bioaktif



MAE = ekstraksi berbantuan gelombang mikro

b. Ekstrak bioaktif \longrightarrow Agen anti karies terkarakterisasi



Gambar 2. Kerangka konsep untuk memperoleh ekstrak bioaktif optimal (a) dan agen antikaries terkarakterisasi dari ekstrak bioaktif propolis *Trigona* spp. (b)

Hipotesis Penelitian

Hipotesis Mayor: Ekstrak bioaktif propolis *Trigona* spp. asal Banten yang mengandung komponen antikaries dapat ditetapkan

Hipotesis Minor: Berbagai aspek yang dapat ditetapkan, meliputi (i) teknik ekstraksi terbaik untuk memperoleh ekstrak bioaktif dari propolis *Trigona* spp. (ii) profil senyawa dalam ekstrak bioaktif dan fraksinya, (iii) Fraksi ekstrak bioaktif yang memiliki antimikroba yang terbaik penyebab karies (iv) nilai *MIC*, *MBC* dan karakteristik *adherence* terhadap *S. mutans* dari ekstrak bioaktif dan fraksi ekstrak bioaktif terbaik (v) sensitivitas relatif antibakteri terhadap *S. mutans* dari fraksi terbaik, dan (vi) identitas komponen kimia dari fraksi ekstrak bioaktif terbaik.

Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium terpadu IPB. Pengujian dengan kromatografi cair-spektrometer massa (*LC-MS*) dilakukan di Laboratorium Analitik Pusat Pengkajian dan Penerapan Bioteknolog BPPT, Serpong.

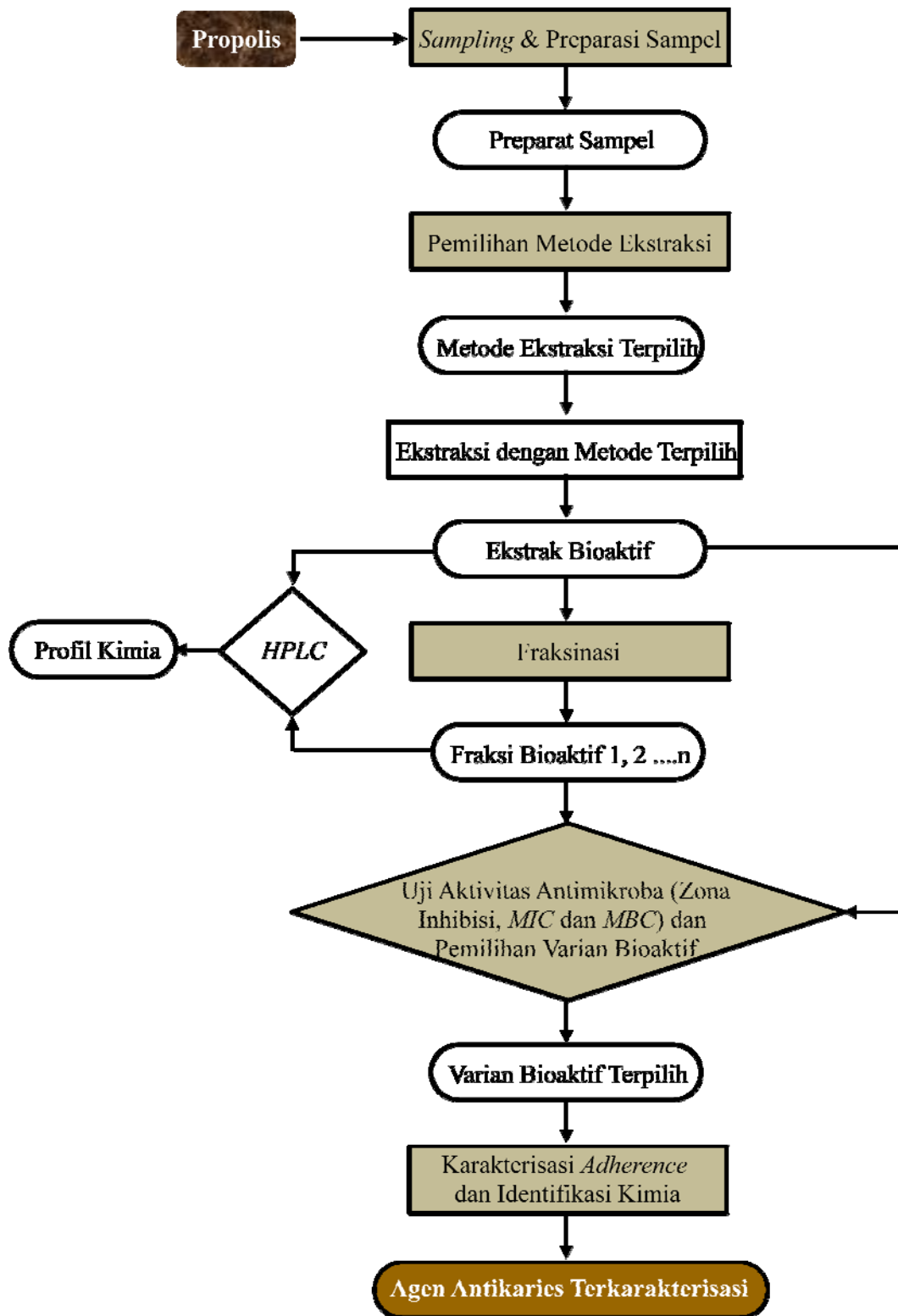
Kajian senyawa bioaktif propolis *Trigona* spp sebagai agen antikaries dilakukan sesuai diagram alir yang disajikan pada gambar 3. Berdasarkan diagram alir ini, dapat dikelompokkan lima tahapan, yakni :

(i) *Sampling* dan preparasi sampel propolis. *Sampling* dilakukan secara acak di daerah Banten pada radius 1 km di sekitar titik $S 6^{\circ} 17' 61''$ dan $E 106^{\circ} 04' 27''$. Sampel propolis kemudian dimasukkan ke dalam wadah plastik dan disimpan dalam lemari pendingin ($- 20^{\circ}\text{C}$) selama 24 jam, selanjutnya digerus dengan *waring blender* hingga diperoleh preparat berbentuk bubuk (80-100 mesh). Preparat yang diperoleh kemudian disimpan kembali ke lemari pendingin untuk selanjutnya digunakan dalam tahapan penelitian berikutnya.

(ii) Pemilihan metode ekstraksi komponen bioaktif dan aplikasi metode terpilih untuk memperoleh ekstrak bioaktif. Tiga metode yang dicobakan yakni maserasi, refluks dan ekstraksi berbantuan gelombang mikro (*MAE*). Sebelum pemilihan dilakukan, ketiga metode ekstraksi dioptimasi terlebih dahulu, menggunakan metode respon permukaan (*RSM*) dengan desain central composite dan faktorial lengkap dengan mengacu ke Myers dan Montgomery (1995).¹⁸⁴ Rendemen komponen bioaktif, waktu ekstraksi dan konsumsi pelarut pengeksrak (etanol) digunakan sebagai dasar pemilihan metode ekstraksi.

(iii) Fraksinasi ekstrak bioaktif diikuti dengan penentuan profil kimia dengan HPLC dari ekstrak bioaktif dan fraksinya. Fraksinasi dilakukan dengan berbasis pada perbedaan pH dan perbedaan kepolaran pelarut. Selanjutnya, ekstrak bioaktif

dan berbagai fraksinya dianalisis dengan HPLC untuk memperoleh informasi profil kimianya.



Gambar 3. Diagram alir penelitian

(iv) Uji aktivitas anti-mikroba dari ekstrak dan fraksinya serta pemilihan varian fraksi bioaktif terbaik. Aktivitas antimikroba ditentukan melalui penetapan zona hambat, *minimal inhibitory concentration (MIC)* dan *minimal bactericidal concentration (MBC)*, sesuai dengan pedoman *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*^{180,181} dan Koo et al. (2000)¹⁶⁰. Sebagai mikroba uji digunakan *S. mutans ATCC 25175*.

(v) Uji karakteristik *adherence* dan identifikasi komponen kimia varian bioaktif terbaik sebagai agen anti karies. Uji karakteristik *adherence* dilakukan dengan mengacu ke metode Koo et.al (2000) dan Hamada dan Torii (1978)^{182,183}, sedangkan identifikasi komponen kimia dilakukan dengan menggunakan paduan piranti *LC-MS* dengan perangkat lunak *ChemSpider*.

Hasil dan Pembahasan.

Sampling, Preparasi Sampel, dan Pemilihan Metode ekstraksi

Sampling dilakukan secara acak di daerah Banten, dengan radius 1 km di sekitar titik S 6°17'61" dan E 106°4'27". Sampel yang diperoleh bertekstur lengket dan berwarna coklat kehitaman seperti yang disajikan dalam Gambar 4a. Terhadap sampel ini, dipreparasi berturut-turut sebagai berikut: didinginkan pada suhu -20°C (Gambar 4b), dihaluskan dan diayak sehingga diperoleh preparat dengan ukuran 80 - 100 mesh (Gambar 4c).



Gambar 4. (a) Bahan baku propolis *Trigona* spp., (b) sampel setelah Pendinginan -20°C, dan (c) preparat sampel

Tahapan kritis dalam proses pengujian bahan aktif dari material alam adalah ekstraksi bahan aktif tersebut dari matriks alaminya. Dengan demikian, pemilihan metode ekstraksi bahan bioaktif yang efektif adalah penting agar ekspresi bioaktivitas dari bahan yang diinvestigasi berlangsung optimal. Tiga metode ekstraksi yakni metode tanpa pemanasan (maserasi), dengan pemanasan (refluks) dan dengan gelombang mikro (*MAE*) dievaluasi dalam upaya memperoleh suatu metode yang efektif dalam mengekstraksi bahan bioaktif dari sampel propolis yang diteliti. Untuk menghindari bias dalam evaluasi, maka perbandingan dilakukan pada kondisi optimal masing-masing metode tersebut.

Ringkasan proses optimasi dari ketiga metode yang diinvestigasi disajikan pada Tabel 1 berikut,

Tabel 1. Ringkasan proses optimasi metode ekstraksi

Metode Ekstraksi	Variabel optimasi	Desain Percobaan	Σ Kombinasi Experiment
Maserasi	Konsentrasi etanol (x_1)	<i>Central composite</i>	10
	Waktu ekstraksi (x_2)		
Refluks	Konsentrasi etanol (x_1)	<i>Central composite</i>	10
	Waktu ekstraksi (x_2)		
MAE	Konsentrasi etanol (x_1)	Faktorial lengkap	27
	Waktu ekstraksi (x_2)		
	Daya glb. Mikro (x_3)		

Dengan mengaplikasi analisis regresi ganda pada data eksperimental, respon (rendemen total fenolik, Y_1 , dan flavonoid, Y_2) terhadap variabel uji dihubungkan melalui persamaan polinomial orde kedua (Tabel 2).

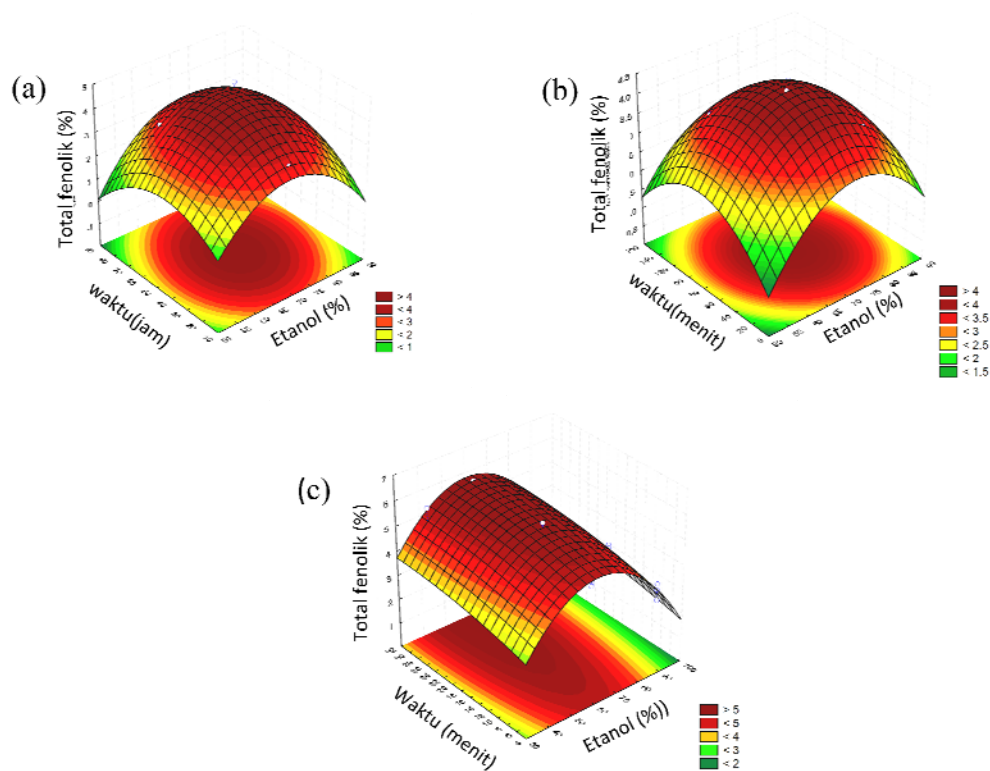
Tabel 2. Persamaan regresi yang menghubungkan respon eksperimental dengan variabel uji

Metode	Persamaan Regresi
Maserasi	$Y_1 = 4.49 + 0.103x_1 + 0.06x_2 - 1.09x_1^2 - 1.10x_2^2 + 0.26x_1x_2$ $Y_2 = 0.21 + 0.01x_1 + 0.01x_2 - 0.05x_1^2 - 0.06x_2^2 + 0.01x_1x_2$
Refluks	$Y_1 = 4.25 + 0.09x_1 + 0.04x_2 - 0.79x_1^2 - 0.86x_2^2 - 0.11x_1x_2$ $Y_2 = 0.239 + 0.002x_1 + 0.006x_2 - 0.074x_1^2 - 0.074x_2^2 - 0.003x_1x_2$
MAE	$Y_1 = 5.59 - 0.46x_1 + 0.32x_2 + 0.09x_3 - 1.37x_1^2 - 0.16x_2^2 - 0.27x_3^2$ $- 0.11x_1x_2 + 0.21x_1x_3 + 0.09x_2x_3$ $Y_2 = -0.358x - 0.002x_1 + 0.017x_2 + 0.005x_3 - 0.086x_1^2 - 0.015x_2^2$ $- 0.005x_3^2 - 0.001x_1x_2 + 0.005x_1x_3 + 0.011x_2x_3$

Berdasarkan persamaan regresi tersebut, nampak bahwa konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi untuk metode maserasi dan refluks memberi dampak positif terhadap rendemen total fenolik dan flavonoid seperti yang ditunjukkan oleh tanda positif pada suku x_1 dan x_2 . Sebaliknya, pengaruh konsentrasi etanol pada metode MAE memberi dampak negatif terhadap respon seperti yang ditunjukkan pada suku x_1 dalam persamaan regresi. Kemampuan ekstraksi dari suatu pelarut dengan menggunakan MAE sangat dipengaruhi oleh karakter dielektriknya.^{190,191} Dalam hal ini, dengan meningkatnya konsentrasi etanol akan menyebabkan turunnya karakter dielektriknya, akibatnya menurunkan kemampuannya mengabsorpsi gelombang mikro dan mengekstrak komponen-komponen fenolik. Dua hal penting yang perlu dikompromikan dalam campuran pelarut pengektak, yakni kemampuan mengektak dan karakter dielektrik dari masing-masing individu pelarut.

Signifikansi dan kesesuaian dari model regresi ini dianalisis dengan menggunakan *ANOVA* seperti yang dianjurkan oleh Fu et al. (2007).¹⁸⁹ Hasil analisis menunjukkan bahwa model adalah signifikan ($p < 0.05$) dan kesesuaian antara nilai-nilai diobservasi dan diprediksi mempunyai derajat korelasi yang tinggi ($R^2 = 0.917$ s/d 0.949 untuk total fenolik dan 0.789 s/d 0.952 untuk flavonoid). Selain itu, rendahnya nilai koefisien variasi ($CV < 10\%$) memberi gambaran bahwa model dipandang *reproducible*. Dengan demikian, model regresi pada Tabel 2 layak digunakan untuk memprediksi kondisi optimal ekstraksi.

Untuk mengevaluasi interaksi antara variabel dan untuk menentukan nilai optimum dari setiap variabel, respon permukaan tiga dimensi dan grafik kontur diplot sesuai dengan persamaan regresi yang diperoleh. Gambar 5 menyajikan bentuk respon permukaan tiga dimensi dan grafik kontur dari persamaan regresi untuk respon total fenolik terhadap variabel konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi dari ketiga metode yang diujikan.



Gambar 5. Plot permukaan respon dan kontur dari pengaruh konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi terhadap total fenolik dengan metode maserai (a), refluks (b) dan MAE (c).

Selanjutnya, kondisi optimum yang diperoleh dari ketiga metode yang diuji, disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Ringkasan rendemen flavonoid dan total fenolik pada kondisi optimal dari metode ekstraksi maserasi, refluks dan *MAE*

Metode	Waktu ekstraksi		[etanol],%		Daya (watt)		Flav. (%)	Fen. (%)
	Flav.	Fen.	Flav.	Fen.	Fen.	Fen.		
Maserasi	50,03j	49,21 j	71,99	70,72	-	-	0,21	4,50
Refluks	78,76m	77,37 m	70,25	70,79	-	-	0,24	4,25
<i>MAE</i>	24,42m	30,57 m	64,66	60,85	520,9	495,4	0,38	5,81

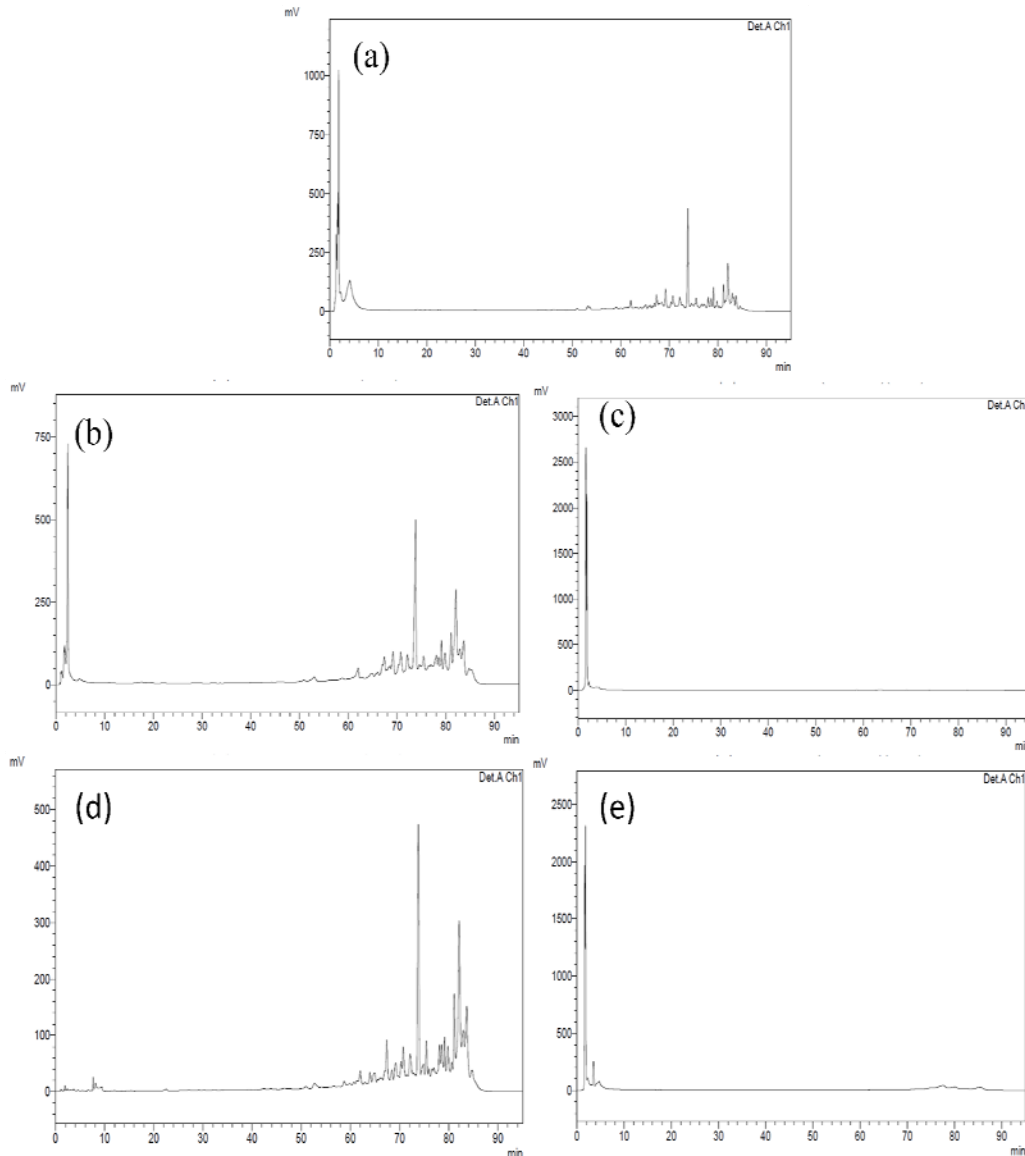
Flav: flavonoid, Fen: total fenolik, j: jam dan m: menit

Pengaruh faktor waktu ekstraksi dan konsentrasi etanol untuk ekstraksi dengan metode maserasi terhadap kadar flavonoid dan total fenolik relatif sama. Sebaliknya, nampak perbedaan pengaruh kedua faktor tersebut dengan adanya stimulasi panas (refluks) dan terutama irradiasi gelombang mikro. Selain itu waktu optimal ekstraksi flavonoid dengan adanya stimulan ini lebih pendek dibanding ekstraksi total fenolik yang menggambarkan bahwa fraksi flavonoid rentan terdegradasi/teroksidasi oleh efek panas. Fenomena ini sesuai dengan hasil yang ditemukan oleh Trucheve et al. (2007).¹⁷² Namun demikian, fenomena ini dapat ditekan dengan bekerja pada kondisi optimal. Berbasis rendemen ekstraksi, waktu ekstraksi dan konsumsi pelarut, metode *MAE* lebih efisien dibanding kedua metode lainnya. Disamping itu, metode *MAE* juga menunjukkan selektivitas yang tinggi dalam mengekstraksi fraksi flavonoid.

Fraksinasi Ekstrak Bioaktif dan Uji Aktivitas Antimikroba

Ekstrak etanol propolis (EEP) yang digunakan dalam proses fraksinasi ini diperoleh dari metode ekstraksi terbaik (MAE). Fraksinasi dilakukan dengan dua cara, yakni berbasis perbedaan pH dan berbasis perbedaan polaritas pelarut pengeksrak. Hasil fraksinasi dipantau dengan teknik kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Berbagai penelitian tentang penelusuran aktivitas biologis dari propolis merah Brazilia dengan memadukan teknik *bioassay* dan *HPLC* telah dipublikasikan. Alensar et al. (2007) telah melakukan fraksinasi yang dipandu oleh teknik *HPLC* dalam upaya menelusuri potensi komponen propolis merah Brazilia sebagai agen antioksidan, antimikroba dan antikanker.¹⁷⁷ Demikian juga, Castro et al. (2009) telah melakukan fraksinasi hingga ke tingkat sub-fraksi dalam rangka pemurnian fraksi antimikroba dari propolis yang berasal dari provinsi Bahia, Brazilia.

Ditinjau dari aspek pemisahan komponen EEP, hasil menunjukkan bahwa ekstraksi berbasis perbedaan polaritas pelarut pengeksrak lebih efektif dibanding berbasis perbedaan pH. Hasil fraksinasi berbasis perbedaan polaritas pelarut disajikan dalam bentuk kromatogram HPLC (Gambar 6).



Gambar 6. Kromatogram HPLC dari EEP (a), fraksi etilasetat (b), fraksi air sistem air-etilasetat (c), fraksi kloroform(d) dan fraksi air sistem air-kloroform (e)

Uji aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans* meliputi uji zona hambat dengan metode difusi agar, penentuan nilai *MIC* dan *MBC*. Hasil yang diperoleh disajikan dalam Tabel 4 dan 5. Nilai *MIC* dan *MBC* dari EEP dan berbagai fraksinya disajikan memberikan pola yang sama dengan pola yang ditunjukkan dalam eksperimen zona hambat, yakni dengan urutan daya inhibisi fraksi kloroform > fraksi etilasetat > EEP. Komponen dengan kepolaran yang tinggi (berada dalam fraksi air) relatif tidak menunjukkan aktivitas antibakteri (zona hambat =0, *MIC* dan *MBC* >1600 µg/ml).

Tabel 4. Rataan (n=4) zona inhibisi pertumbuhan *S. mutans* oleh EEP dan berbagai fraksinya

Bahan Uji	Rataan (n=4) dari zona inhibisi (mm)
EEP	3.25
Sistem Air-Etilasetat:	
Fraksi etilasetat	3.63
Fraksi air	0
Sistem Air-Kloroform:	
Fraksi kloroform	4.75
Fraksi air	0
Blanko (kontrol negatif)	0
Klorheksidin (kontrol positif)	6.88

Tabel 5. Nilai *MIC* dan *MBC* dari EEP dan berbagai fraksinya yang diperoleh dengan cara fraksinasi berbasis perbedaan kepolaran pelarut pengekstrak

Bahan Uji	<i>MIC</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>MBC</i> ($\mu\text{g/ml}$)
EEP	600 – 800	>1600
Sistem Air-Etilasetat:		
- Fraksi Etilasetat	100 – 200	400 – 800
- Fraksi air	>1600	>1600
Sistem Air-Kloroform:		
- Fraksi Kloroform	50 – 100	400 – 800
- Fraksi Air	>1600	>1600
Klorheksidin (kontrol positif)	<12.5	<12.5

Hasil kajian Duarte et al. (2003) juga menunjukkan bahwa senyawa aktif antibakteri dari propolis *type 6* mempunyai karakter non polar dan merupakan sumber yang berharga untuk eksplorasi senyawa bioaktif baru dalam propolis.¹⁵¹ Sementara itu, klorheksidin menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* yang lebih baik dibanding EEP dan fraksinya yang diinvestigasi dalam penelitian ini. Selanjutnya, perlu dicatat bahwa klorheksidin merupakan senyawa sintetik tunggal, sedangkan EEP dan fraksinya merupakan kelompok senyawa. Dengan demikian, kuantitas senyawa aktif dalam kelompok senyawa EEP atau fraksinya akan terencerkan oleh senyawa lainnya dalam kelompok tersebut.

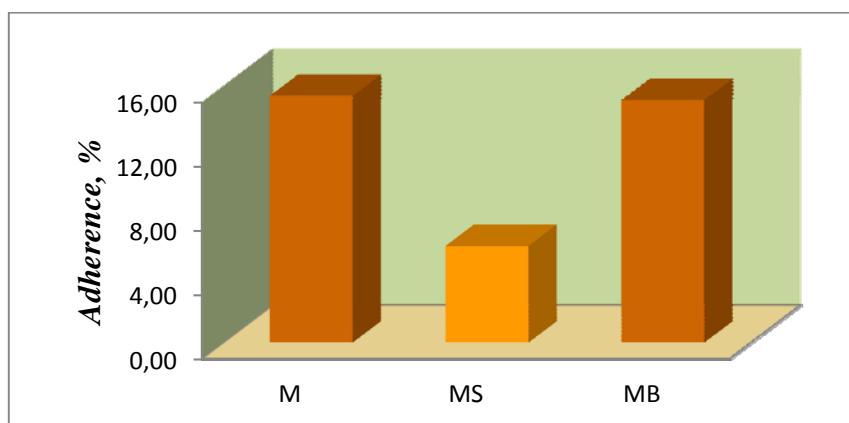
Berdasarkan data pengujian aktivitas anti bakteri ini dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform dari EEP merupakan fraksi yang paling potensial sebagai agen antikaries dari propolis yang diinvestigasi. Walaupun kinerja antibakteri terhadap

S.mutans dari fraksi kloroform ini masih lebih rendah dari klorheksidin, namun masih sangat memungkinkan untuk memperoleh agen antikaries yang sebanding dengan klorheksidin melalui eksplorasi hingga ke sub-fraksi atau senyawa tunggal. Pernyataan ini ditunjang oleh penelitian yang dilakukan oleh Castro et al. (2009) yang menunjukkan bahwa terjadi peningkatan daya inhibisi terhadap *S. aureus* dan *S.mutans* Ingbritt 1600 dari fraksi heksana propolis Brazilia *Type-6* ke sub-fraksinya dan nilai *MIC* dari sub-fraksi ini adalah sama dengan klorheksidin dalam menghambat *S.aureus* dan masih sebanding terhadap *S.mutans* Ingbritt 1600.

Karakteristik *Adherence* dan Identifikasi Kimia Varian Fraksi Bioaktif Terpilih

Pengaruh bahan bioaktif terhadap karakter adherence *S.mutans* penting diobservasi, karena *adherence*/pelekatan bakteri pada permukaan gigi merupakan syarat utama dalam inisiasi pembentukan plak gigi. Disamping itu, karakteristik *adherence* bakteri biasanya dikaitkan dengan kemampuan bakteri mensintesis glukukan (terutama dari sukrosa), yang mempromosikan akumulasi streptococci kariogenik dan memberikan kontribusi yang signifikan terhadap pembentukan plak gigi.^{64,65}

Pengujian karakteristik *adherence* dalam penelitian ini dilakukan hanya terhadap fraksi EEP yang paling potensil sebagai sumber agen antikaries, yakni fraksi kloroform. Hasil yang diperoleh disajikan dalam bentuk diagram (Gambar 7).

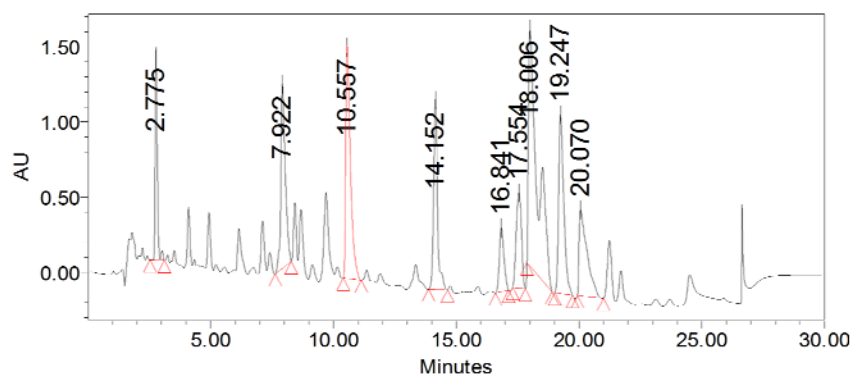


Gambar 7. Karakteristik *adherence* *S.mutans* (%) dalam media *BHI* yang mengandung 1% sukrosa (M), dalam media + fraksi kloroform 50 μ g/ml (MS) dan media + pelarut sebagai blanko (MB)

Dalam media *BHI* yang mengandung 1% sukrosa memberikan karakter adherence pada permukaan kaca sebesar 15,48% dan adanya pelarut (blanko) tidak memberi efek terhadap karakter adherence dari *S.mutans* yang diujikan. Adanya fraksi kloroform dengan konsentrasi *sub-MIC* (50 μ g/ml) menurunkan kemampuan

adherence dari *S.mutans* secara signifikan (penurunan sekitar 60% relatif terhadap media *BHI* yang mengandung 1% sukrosa). Keadaan ini memberi gambaran secara tidak langsung, bahwa fraksi kloroform dari EEP menunjukkan kemampuan yang cukup bermakna dalam menghambat sintesis glukon oleh *S.mutans* yang diujikan.

Identifikasi komponen penyusun varian fraksi bioaktif terpilih (fraksi kloroform) dilakukan dengan menggunakan teknik *LC-MS* yang dibantu dengan data base *ChemSpider*. Analisis dilakukan hanya terhadap komponen mayor, yakni yang memberi luas puncak yang besar pada profil *LC-MS* (Gambar 8).



Gambar 8. Profil *LC-MS* fraksi kloroform dari EEP

Hasil menunjukkan bahwa komposisi fraksi bioaktif terpilih ini didominasi oleh senyawa bernitrogen (Tabel 6).

Tabel 6. Komponen mayor fraksi kloroform dari EEP

Waktu retensi (menit)	Senyawa
2,776	<i>1'-(2-{[4-(4-Morpholinyl)phe-nyl]amino}-2-oxoethyl)-1,4'-bipiperidine-4'-carboxamide</i>
7,992	<i>Leucyl-N-{1-[4-amino-6-(dimethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]-3-methylbutyl}leucinamide</i>
10,557	<i>5-Hydroxy-2-(4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)-3-methylphenyl β-D-glucopyranoside. Aloenin</i>
14,152	<i>N¹,N¹'-[1,4-Phenylenebis(methylene)]bis[N¹-(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine</i>
16,841	<i>(13E,15R)-15-Hydroxy-N-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-9-oxoprost-13-en-1-amide</i>
17,554	<i>(2S,3R,5E)-2-({[3-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methyl-4-pyridinyl]methyl}amino)-5-octadecene-1,3-diol</i>
18.006	<i>Methyl {[3-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-2,6-diethyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl]oxy}acetate</i>
19,247	<i>N,N-Dimethyl-N-octadecyl-1-octadecanaminium</i>
20,070	<i>3α,7α,12α)-N-(2-Aminoethyl)-3,7,12-trihydroxycholan-24-amide</i>

Turunan morfolin seperti *1'-(2-{[4-(4-Morpholinyl)phe-nyl]amino}-2-oxoethyl)-1,4'-bipiperidine-4'-carboxamide* dan *(13E,15R)-15-Hydroxy-N-[2-(4morpholinyl)ethyl]-9-oxoprost-13-en-1-amide* berpotensi sebagai agen antibakteri yang umum dijumpai pada kelompok senyawa ini. *N,N-Dimethyl-N-octadecyl-1-octadecanaminium* berpotensi sebagai antioksidan. Kroenke (1978) telah mematenkan garam molibdenium dari *N,N-Dimethyl-N-octadecyl-1-octadecanaminium* sebagai agen *antismoke*.¹⁹³

5-Hydroxy-2-(4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)-3-methylphenyl β-D-glucopyranoside merupakan turunan aloenin yang banyak dijumpai pada tanaman *Aloe arborescens* Mill. Var. *Natalensis* Berger. Menurut Hirata dan Saga (1978), aloenin digunakan di Jepang sebagai bahan obat tradisional untuk gangguan gastro-intestinal, luka bakar, gigitan serangga, kutu air.¹⁹⁴

Sebagai tambahan, nampak bahwa kandungan kimia sampel propolis yang diteliti sangat berbeda dengan propolis Eropa yang didominasi oleh senyawa polifenolik dan propolis Brazilia dan Amerika Latin lainnya yang didominasi oleh turunan asam kumarat terprenilasi dan asetofenon.^{129,130}

Simpulan

Berdasarkan data dan berbagai fenomena yang diperoleh dalam penelitian ini, maka dapat ditarik beberapa kesimpulan seperti berikut.

1. Berdasarkan rendemen, waktu ekstraksi dan konsumsi pelarut, metode *MAE* lebih efisien dalam mengekstraksi komponen bioaktif propolis dibanding metode maserasi dan refluks.
2. Data yang diperoleh dari dua teknik fraksinasi EEP (berbasis perbedaan pH dan kepolaran pelarut pengekstrak) menunjukkan fraksinasi berbasis kepolaran pelarut lebih efektif dibanding berbasis perbedaan pH, ditinjau dari aspek pemisahan komponen penyusun EEP. Selanjutnya, profil kimia berbasis kromatogram *HPLC* menunjukkan Profil kimia EEP dari sampel yang diteliti menunjukkan komposisi kimia yang kompleks yang didominasi oleh komponen dengan kepolaran rendah. Fraksinasi dengan sistem air-kloroform menunjukkan pemisahan antara fraksi dengan kepolaran yang tinggi dan fraksi dengan kepolaran rendah secara signifikan.
3. Berdasarkan uji aktivitas antimikroba terhadap *S.mutans ATCC 25175* (zona hambat, *MIC* dan *MBC*), menunjukkan bahwa fraksi kloroform dari EEP adalah fraksi yang paling potensial sebagai agen anti karies dibanding EEP dan fraksi lainnya yang diuji (fraksi etil asetat dan fraksi air dalam sistem air-kloroform dan air-etilasetat).
4. Karakteristik dari fraksi yang potensial sebagai agen antikaries (fraksi kloroform) adalah: *MIC* = 50 – 100 µg/ml, *MBC* = 400 – 800 µg/ml

karakter *adherence* = 6,02% (penurunan adherence sekitar 60% relatif terhadap media BHI yang mengandung 1% sukrosa sebagai pembanding) dan kepolaran rendah.

5. Sensitivitas antibakteri (*S. mutans*) dari fraksi yang potensial ini masih di bawah klorheksidin (*MIC* dan *MBC* < 12,5 µg/ml). Namun demikian, eksplorasi hingga ke sub-fraksi atau komponen tunggal dari fraksi kloroform ini, masih memungkinkan untuk mendapatkan komponen dengan sensitivitas yang sebanding dengan klorheksidin.
6. Konstituen mayor dari fraksi yang potensial sebagai agen antikaries didominasi oleh senyawa bernitrogen. Dua diantaranya merupakan turunan morfolin yang banyak digunakan sebagai biosida. Sementara itu, *N,N-Dimethyl-N-octadecyl-1-octa-decanaminium* berpotensi sebagai antioksidan dan teridentifikasi juga satu turunan aloenin yang telah digunakan dalam pengobatan tradisional di Jepang.

Saran

Pada dasarnya, kajian komponen bioaktif propolis bertujuan mendapatkan senyawa bioaktif baru dari bahan alami yang berguna untuk pengembangan pengobatan masa akan datang. Dalam penelitian ini, hanya dihantarkan sampai ketinggian fraksi yang potensial sebagai agen antikaries. Penelitian hingga ke tingkat sub-fraksi atau senyawa tunggal perlu ditindaklanjuti agar diperoleh agen antikaries dengan sensitivitas yang sebanding dengan klorheksidin yang saat ini dianggap sebagai “*Gold Standard*” antikaries.

Kebaruan Penelitian

Berdasarkan penelusuran informasi ilmiah tentang penelitian propolis, maka beberapa aspek kebaruan dari penelitian yang dilakukan ini, yakni:

- penelitian ini merupakan yang pertama tentang ekstraksi, fraksinasi dan evaluasi komponen bioaktif sebagai agen antikaries dari propolis asli Indonesia, khususnya yang berasal dari Banten. Selain itu, hasil penelitian juga memberi perspektif tentang potensi komponen bioaktif dalam propolis asal Banten sebagai antioksidan dan pemanfaatannya dalam bidang pengobatan lainnya.
- ditemukannya potensi agen antikaries dalam fraksi kloroform yang didominasi oleh senyawa bernitrogen merupakan hal yang spektakuler dan sejauh penelusuran yang dilakukan terhadap komponen bioaktif yang ditemukan pada propolis yang berasal dari berbagai belahan dunia, tidak pernah menyinggung tentang senyawa bernitrogen. Sebagai tambahan, klorheksidin yang saat ini dianggap sebagai *gold standard* agen antikaries juga merupakan senyawa bernitrogen, sehingga sangat memungkinkan adanya satu atau lebih senyawa dalam fraksi kloroform tersebut mempunyai aktivitas setara atau lebih baik dibanding klorheksidin.

SUMMARY

Introduction

Caries is an infectious disease and it is still a major oral health problem worldwide.¹ Prevalence of active caries in Indonesia is also quite high, according to the National Health Research Association 2007 was 43.4% and 14 provinces had an active prevalence above the national prevalence.² Caries prevention efforts in Indonesia is still not yet optimal and that the decline in caries index according to WHO guidelines can be achieved, it needs to be pursued all aspects of the cause of dental caries prevention.

Caries is a complex disease caused by physiological imbalance between tooth mineral and fluid biofilm.^{4,5,6} Occurrence of caries is multifactorial interact with each other, namely: the host (teeth and saliva), microorganisms, especially bacteria, substrate and waktu.^{7, 8} In addition to it is also influenced by education, social status, diet, occupation, and even human culture.^{9, 10}

One of the dominant species of bacteria in the mouth and the main cause of dental caries, is *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Various studies have shown a positive correlation between the number of bacteria *S. mutans* in dental plaque and caries prevalence.^{12,13,14,15} *S. mutans* is considered the most cariogenic microorganisms in dental biofilms. This is due to its capacity to use carbohydrates in the diet, especially sucrose, to synthesize extracellular polysaccharides (glucans) and because of its acidogenic and aciduric properties.¹⁶ Extracellular polysaccharides are an important virulence factor of *S. mutans* because these polysaccharides promotes bacterial adhesion to the tooth surface,^{17,18} contributing to the structural integrity of the biofilm,^{19,20} changing the porosity of the biofilm²¹ thus carbohydrates in the diet can go into the interior until it reaches the biofilm-enamel interface and consequently increase demineralization of enamel.²² Therefore, this bacterium is a major target in efforts to prevent dental caries.^{23,24} *S. mutans* is also used to evaluate the cariogenic properties due to the difficulty of developing of *in vivo* studies to controlling cariogenic situation.²⁵ Ccahuana-Vásquez and Cury (2010) has validated the *S. mutans* as a model to evaluate the antimicrobial agents and enamel demineralization in a way to simulate the various episodes (feast-famine) exposure to sucrose.²⁶

Chlorhexidine and triclosan are a synthetic chemical agents which are a representative material for oral care at this time. Although both agents have a strong antibacterial characteristics and with a broad spectrum,^{27,28} they also have long-term side effects, such as intraoral staining, affecting the perception of taste,

irritation of oral mucosa and disorders of the oral bacterial ecology.^{29,30} Koo et al. (2003) showed that the use of 1.33 mM chlorhexidine for one minute and two times a day, dramatically affect the viability of *S. mutans*.³¹ The most frequently reported symptoms, based on post-marketing reports of chlorhexidine gluconate mouthwash products, are stomatitis, gingivitis, glossitis, ulcer, dry mouth, hypesthesia, glossal edema, and paresthesia.³² Therefore, we need the discovery of new compounds without side effects during long-term use.

Currently, the approach studied by many experts is the prevention of biofilm formation without eliminating microorganisms from the oral cavity include the use of traditional medicines derived from plants or natural substances as an alternative in the field of preventive dentistry. This approach is a strategy that is expected to protect teeth from caries process through the intervention of the interaction of bacteria with the surface of the tooth.^{33,34} Some natural products from medicinal plants are believed to prevent caries with milder side effects, although its still requires scientific proof.

One of the natural products that are believed to have many properties and relatively safe is propolis. Propolis is a nontoxic natural substance collected by bees from various plant sources have been used since ancient times, such as traditional medicine, biokosmetik, and foods supplementary.^{36,37,38} Propolis has a biological activity with a very broad spectrum include: antibacterial, antifungal, antiviral, antiprotozoa, antioxidant, anticancer, antiinflammatory, immunomodulatory, antitumor agents, promoters of wound healing and as an anesthetic agent.^{39,40,41,42,43,44} Propolis can heal small lesions in the mouth, angina, as well as skin infections, treatment of mastitis caused by microorganisms resistant to antibiotics.⁴⁵ The chemical composition of propolis is very complex; flavonoids and derivatives (hydroxyl) cinnamic acid and various other aromatic compounds has been considered the main biologically active compounds.⁴⁶ Antibacterial properties of propolis are caused by the presence of aromatic compounds such as flavonoids and cafeic acid.⁴⁷

Propolis is very effective efficacious against gram positive bacteria,⁵¹ especially against *Staphylococcus aureus*⁴⁹ and of gram negative bacteria.⁵² *In-vitro* studies suggest that propolis inhibited the growth of *S. mutans*,^{53,54} which is the main etiological agent of dental caries in animals and humans.^{16,55,56} The use of propolis in drinking water or applied (smear on teeth) to reduce the incidence of dental caries in rats.⁵⁷

Duarte et al. (2003) was examined the influence of fractions or groups of compounds in Brazilian propolis which was chemically classified as propolis type 6 on the activity of GTFs and the growth of mutans streptococci. Fractions were

distinguished by their solubility in different solvents polarity (hexane, chloroform, ethyl acetate and ethanol). The results of this study indicate that the antibacterial active compounds of propolis type 6 have a nonpolar character and were a valuable resource for the exploration of new bioactive compounds in propolis.¹⁵¹

Mechanism of action of propolis as an antimicrobial is complex, can be caused by a synergism between phenolic and other compounds.^{58,59} Propolis inhibits bacterial growth by preventing cell division, thus resulting in the formation of pseudo-multicellular streptococci. In addition, propolis led to the cytoplasmic membrane and cell wall is irregular, due to a partial bacteriolysis and inhibition of protein synthesis. These things prove that the mechanism of action of propolis on bacterial cells is complex and cannot be made a simple analogy, as well as the workings of any classic antibiotics.⁴⁵

The chemical composition of propolis depends on the specifics of the local flora at the site of collection, thus depending on the characteristics of geography and climate that location. Quantitative and qualitative composition of propolis play an important role in its biological activity. As an illustration, until now there are twelve different types of Brazilian propolis has been chemically characterized.⁶⁰ Two types of them (one from southeastern Brazil, type 12, and the other from southern Brazil, type 3) are flavonoid- and cinnamic acid-rich types, showed remarkable inhibitory effects on the activity of several purified glucosyltransferase (GTFs) *in vitro*.²⁴ GTFs are central importance in adhesive interactions with *S. mutans* and are essential in the expression of virulence by these microorganism.^{18,61,62,63} The glucans synthesized by GTFs not only promote the accumulation of cariogenic streptococci on the tooth surface, but also contribute significantly to the formation of dental plaque.^{64,65} *S. mutans* produces at least three GTFs: GTF B, which catalyzes the synthesis of mostly insoluble α 1,3-linked glucan; GTF C, which catalyzes the synthesis of a mixture of insoluble and soluble α 1,6-linked glucan; and GTF D, which catalyzes the synthesis of soluble glucan. Among them, GTFs B and C seems to be the most important GTFs related to dental caries.⁶³ On the other hand, flavonoids and cinnamic acid derivatives was not detected in species that are classified as type 6 (from Northeast Brazil, the Atlantic forest, the state of Bahia).⁶⁶ However, ethanol extract of propolis type 6 (EEP) showed remarkable antimicrobial activity against oral pathogenic microorganisms, including *S. mutans*.⁶⁷

Toxicity, mucosal ulceration, and the development of resistant bacterial strains are a problem that are found in the use of some synthetic antibacterial agents. The existence of adverse effects is encouraging research on antimicrobial agents based on natural products. Study of Indonesian propolis, especially those related to anti-carries activity is relatively less. Sabir (2005) have investigated the antibacterial activity of the flavonoids fraction of propolis *Trigona* spp. from the district

Bulukumba, South Sulawesi and showed that the flavonoid fraction was able to inhibit the growth of *S. mutans in vitro*.⁶⁹ *Apis mellifera* propolis ethanol extract from various regions in Java (Sukabumi, Batang, and Lawang) showed differences in chemical composition and the level of cytotoxic activity against tumor cell lines (T47D, MCF-7, HeLa, myeloma and Vero).⁷⁰ Although the both study did not show specific components or the principal active compound responsible for biological activity examined, but this study opens new perspectives for further research. Identification of active compounds is a fundamental principal in order to standardize the propolis.⁷¹ Trusheva et al. (2011) have isolated and identified 11 compounds of propolis from East Java: four-alk(en)ylresorcinol, four prenylflavanones and three cycloartane-type triterpenes. All prenylflavanones showed significant radical scavenging activity and one of the four compounds showed significant antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.⁷²

This research has been done on the investigation of the Indonesian propolis *Trigona* spp. from Banten. Some aspects that were examined include the selection of the extraction method to obtain an extract that can describe the optimal performance of bioactive and molecular information from the class of compound efficacious as anticaries agent; determining the inhibition ability of bioactive extracts and its fractions against *S. mutans*, followed by chemical analysis and adherence test to the fraction that has highest the inhibition ability. From the results of this study was obtained a potential anticaries agents and its characteristics.

Formulation of Research Problem

On the basis of the description in the introductory paragraph, then the problem was formulated as a question as follows.

General Research Questions

Is there a bioactive component in propolis *Trigona* spp. samples as a potential anticaries agents?

Specific Research Questions

(i). How best extraction technique to obtain the bioactive extract of propolis?, (ii) What is the profile of bioactive compounds in propolis *Trigona* spp. samples from Banten?, (iii) The fraction of the bioactive extract which has the best inhibitory effect against bacteria that cause caries (*S. mutans*)? (iv) What is the value of MIC, MBC and how the characteristics of the adherence against *S. mutans* of the best fraction ? (v) What is the best fraction of bioactive extracts give a better effect than anticaries agents are considered as gold standard today (chlorhexidine)?, and (vi) How the chemical identity of the best fraction of bioactive extracts?

Benefits of Research

The benefits of this study were (i) enrich research in dentistry related to tracing natural bioactive materials for dental caries prevention through bioassay-guided chemical analysis approach, (ii) enrich Indonesia original drug data bank, especially in the prevention of dental caries, (iii) the fraction obtained fractions or combinations of propolis *Trigona* spp. the best and safe way to prevent dental caries in the end to address one of the dental health problems in Indonesia, (iv) provide an alternative means of prevention of dental caries through the use of a natural substance obtained from propolis, particularly in suppressing the use of synthetic materials that can give side effects unwanted or use of antibiotics can lead to resistance. Moreover, it also reduces the dependence on synthetic materials that are imported products, and (v) provides opportunities for the development of native propolis Indonesia, which in turn gives added value of the national economy.

Research objectives

In general, this study aims to obtain a bioactive extract of Indonesian propolis *Trigona* spp. that can be used as an anticaries agent.

The specific objective of this study were (i) define how to extract the optimal biologically active ingredient of propolis, especially from the sample matrix propolis *Trigona* spp. from Banten, (ii) to analyze the profile of bioactive compounds in the extracts and its fractions, (iii) determine the best fraction of bioactive extracts as anticaries agents, (iv) determine the value of MIC, MBC and adherence characteristics againts *S.mutans* of the best fraction of the bioactive extract , (v) analyze the sensitivity of antibacterial againts *S.mutans* of the best fraction of bioactive extract, and (vi) identify the chemical components of the best bioactive fractions as anticaries agent

Theoretical Framework

Diagram of the theoretical framework of this research is presented in Figure 1

Conceptual Framework and Hypothesis

Conceptual framework of this research is presented in diagram form as shown in figure 2.

Hypothesis

Major hypotheses: Bioactive extracts of propolis *Trigona* spp. from Banten containing anticaries component can be specified

Minor Hypothesis: Various aspects that can be established, including (i) the best extraction technique to obtain the bioactive extract of propolis *Trigona* spp. (ii) profiles of bioactive compounds in the extracts and its fractions, (iii) a bioactive extract fractions that have the best antimicrobial causes caries (iv) the value of

MIC, MBC and adherence characteristics of *S. mutans* of bioactive extracts and its best fractions (v) Antibacterial sensitivity relative against *S. mutans* of the best fraction, and (vi) chemical identity of components of the best fraction of bioactive extracts.

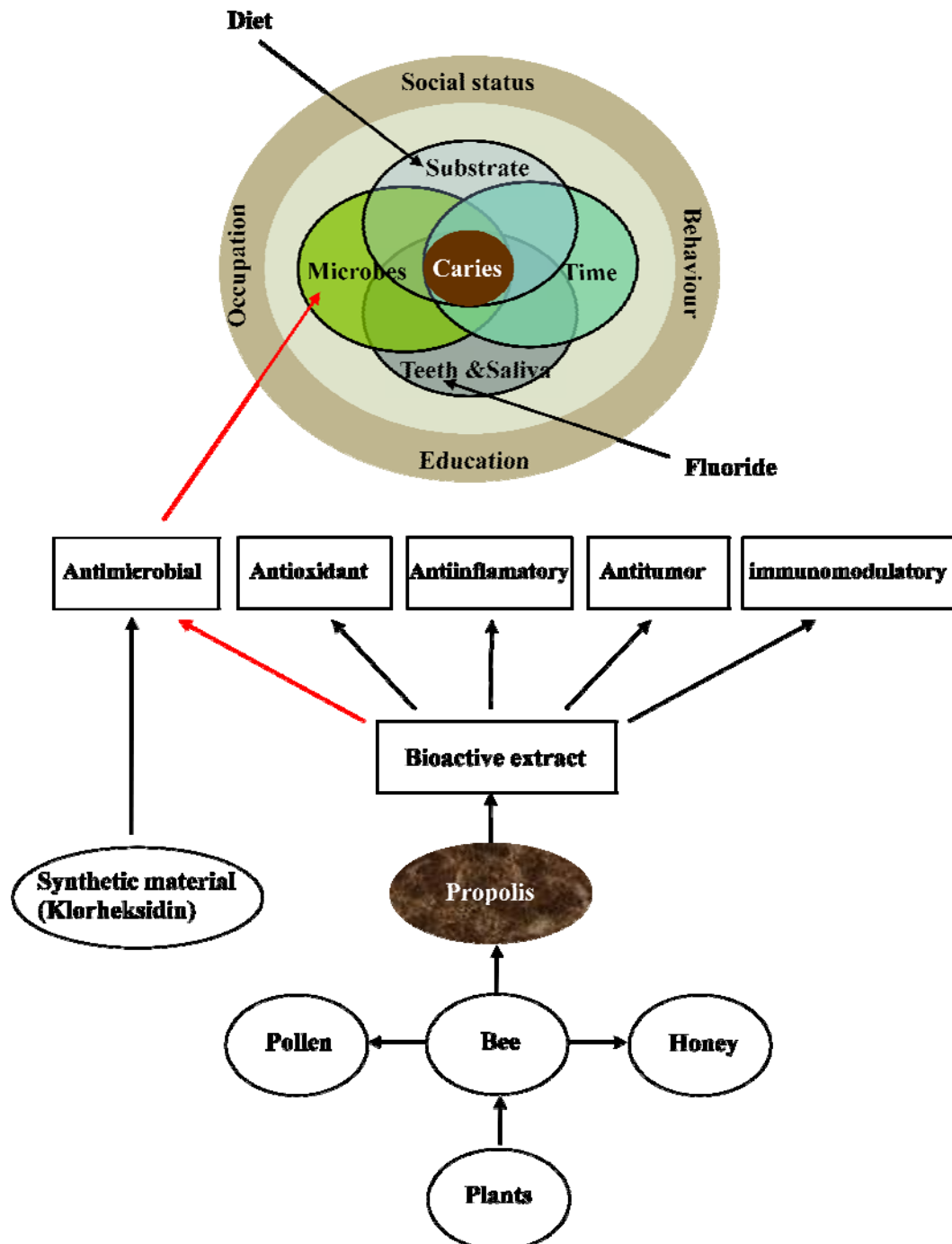
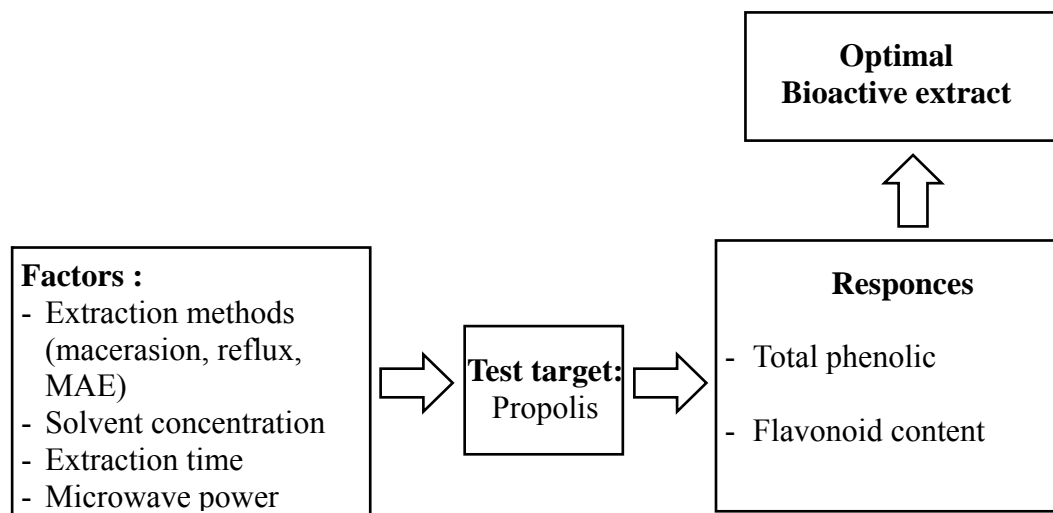


Figure 1: Theoretical Framework

a. Propolis → Bioactive extract



MAE = microwave-assisted extraction

b. Bioactive extract → Anticaries agent characterised

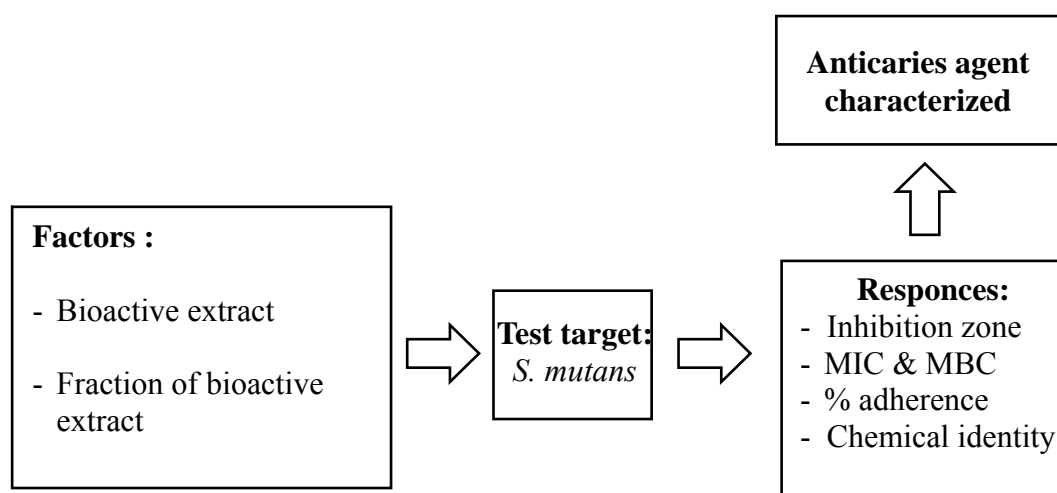


Figure 2. The conceptual framework to obtain optimal bioactive extract (a) and anticaries agent characterized from bioactive extract of propolis *Trigona* spp. (b)

Research Methods

Research was conducted at the Laboratory of Integrated IPB. Tests with liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was performed at the Laboratory of Analytical, Center for Assessment and Application Biotechnology, BPPT, Serpong.

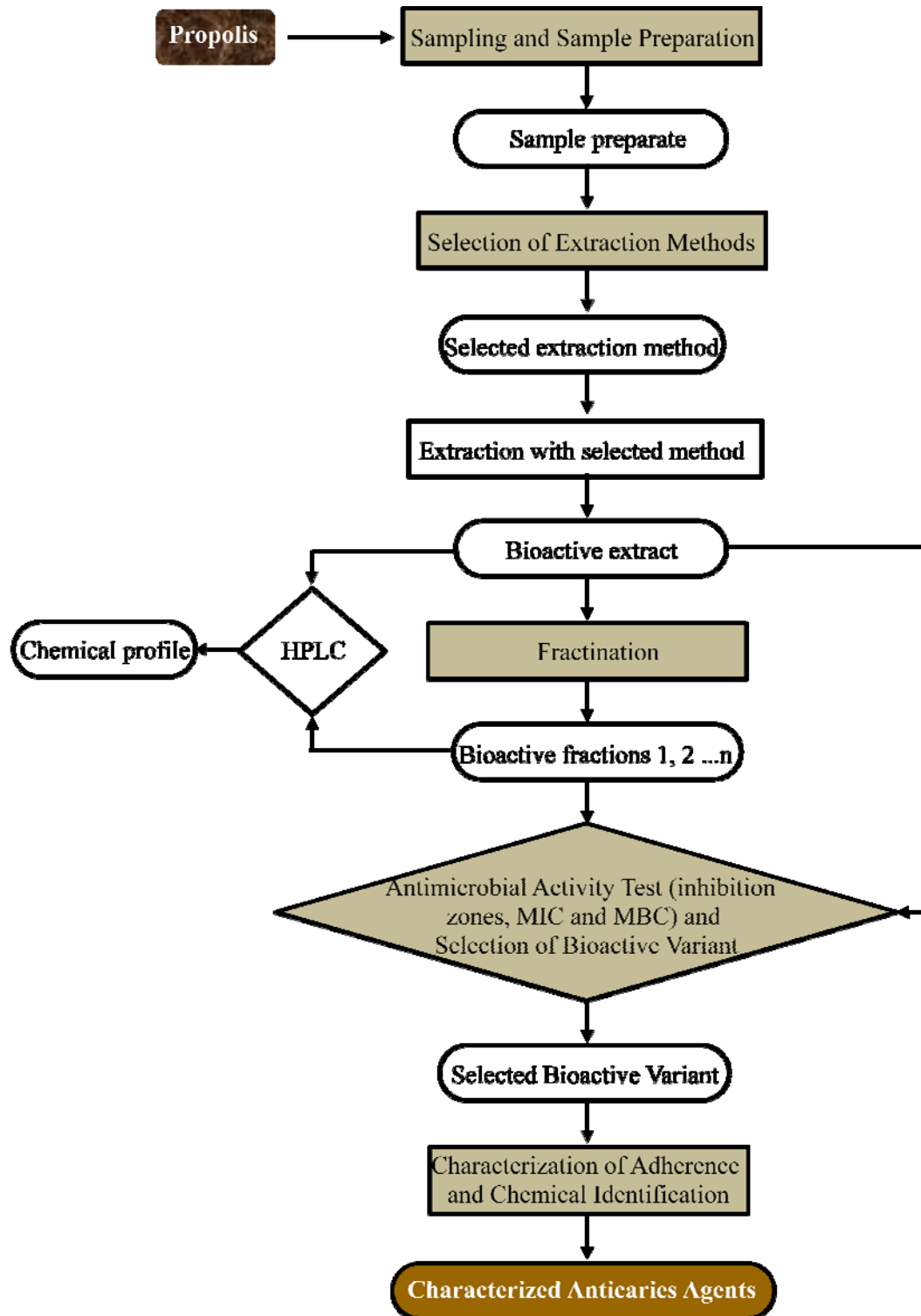


Figure 3. Flowchart of the research

Study of bioactive compounds of propolis *Trigona* spp as anticaries agents was carried out in accordance to flow chart presented in Figure 3. Based on this flow chart, can be grouped five stages, namely:

(i) Sampling and sample preparation propolis. Sampling was conducted randomly in Banten at 1 km radius around the point S 6°17'61 "and E 106°04'27". Propolis samples and then put into plastic containers and stored in a refrigerator (- 20°C) for 24 hours, then crushed with a waring blender to obtain a sample, called sample prepare, in powder form (80-100 mesh). Preparation was then stored back into the refrigerator for later use in subsequent research stages.

(ii) The selection of the extraction method and the application of the method selected to obtain the bioactive extract. Three methods were tested namely maceration, reflux and microwave-assisted extraction (MAE). All methods were optimized prior to election, using response surface methods (RSM) with central composite and a full factorial designs, refers to Myers and Montgomery (1995).¹⁸⁴ The yield of bioactive components, extraction time and solvent consumption were used as the basis for the selection of extraction method.

(iii) Fractionation of bioactive extract followed determination of the chemical profile by HPLC. Fractionation was performed based on differences in pH and solvent polarity. Furthermore, bioactive extracts and its fractions were analyzed by HPLC to obtain their chemical profile.

(iv) The antimicrobial activity test of extracts and fractions as well as the selection of the best variant of the bioactive fractions. Antimicrobial activity was performed by the determination of inhibition zones, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC), according to the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)^{180,181} and Koo et al. (2000).¹⁶⁰ *S. mutans* ATCC 25175 was used as a test microbe.

(v) Adherence characteristics test and identification of bioactive chemical components of the best variant as anticaries agent. Adherence characteristics test was carried out refers to the method of Koo et.al (2000)¹⁶⁰ and Hamada and Torii (1978),^{182,183} while the identification of chemical components was done by using a combination of LC-MS devices with ChemSpider software.

Results and Discussion.

Sampling, Sample Preparation, and Selection of Extraction Methods

Random sampling in Banten, with a radius of 1 km around the point S 6°17'61 "and E 106°4'27". Samples obtained were textured sticky and blackish brown, as shown in Figure 4a. These samples, prepared in a row as follows: cooled at a temperature of -20°C (Fig. 4b), crushed and sieved to obtain a sample prepare with a size of 80-100 mesh (Fig. 4c).



Figure 4. (a) Raw material of propolis *Trigona spp.*, (b) refrigerated sample at -20°C , and (c) sample prepare

A Critical step in the process of testing the active ingredient of the natural products is the extraction of active ingredients from natural matrix. Thus, the selection of an effective extraction method is important for expression of bioactivity of the materials investigated in an optimal place. Three methods of extraction ie without heating methods (maceration), with heating (reflux) and microwave (MAE) was evaluated in order to obtain an effective method in extracting bioactive ingredients of propolis samples studied. To avoid bias in the evaluation, the comparison was performed at optimal conditions of each method. Summary of the optimization process of the three methods investigated are presented in Table 1 below,

Table 1. Summary of the optimization process of extraction methods

Extraction methods	Optimization variables	Experimental desaign	Σ Experimental combination
Maceration	Ethanol concentration (x_1)	Central composite	10
	Extraction time (x_2)		
Reflux	Ethanol concentration (x_1)	Central composite	10
	Extraction time (x_2)		
MAE	Ethanol concentration (x_1)	Full factorial	27
	Extraction time (x_2)		
	Microwave power (x_3)		

By applying multiple regression analysis on experimental data, the response (yield of total phenolic, Y_1 , and flavonoids, Y_2) of the test variables are connected through a second-order polynomial equation (Table 2).

Based on the regression equation, it appears that the ethanol concentration and extraction time for maceration and reflux methods have a positive effect on the yield of total phenolic and flavonoid as shown by the positive sign on the term x_1 and x_2 . In contrast, the influence of ethanol concentration on the MAE method gave a negative impact on response as shown in the term x_1 on regression equation. The extraction ability of a solvent using MAE is strongly influenced by the dielectric properties.^{190,191} In this case, with increasing concentrations of

ethanol will cause a decline in the character of dielectric, reducing its ability to absorb microwaves and extract the phenolic components. Two important things that need to be compromised in the solvent mixture, namely the extraction ability and dielectric character of each individual solvent.

Table 2. The regression equation that connects the experimental response and test variables

Methods	Regression models
Maceration	$Y_1 = 4.49 + 0.103x_1 + 0.06x_2 - 1.09x_1^2 - 1.10x_2^2 + 0.26x_1x_2$ $Y_2 = 0.21 + 0.01x_1 + 0.01x_2 - 0.05x_1^2 - 0.06x_2^2 + 0.01x_1x_2$
Reflux	$Y_1 = 4.25 + 0.09x_1 + 0.04x_2 - 0.79x_1^2 - 0.86x_2^2 - 0.11x_1x_2$ $Y_2 = 0.239 + 0.002x_1 + 0.006x_2 - 0.074x_1^2 - 0.074x_2^2 - 0.003x_1x_2$
MAE	$Y_1 = 5.59 - 0.46x_1 + 0.32x_2 + 0.09x_3 - 1.37x_1^2 - 0.16x_2^2 - 0.27x_3^2$ $- 0.11x_1x_2 + 0.21x_1x_3 + 0.09x_2x_3$ $Y_2 = -0.358x - 0.002x_1 + 0.017x_2 + 0.005x_3 - 0.086x_1^2 - 0.015x_2^2$ $- 0.005x_3^2 - 0.001x_1x_2 + 0.005x_1x_3 + 0.011x_2x_3$

Significance and the suitability of these regression models were analyzed using ANOVA as recommended by Fu et al. (2007).¹⁸⁹ The results show that the model was significant ($p < 0.05$) and the fit between observed values and predicted to have a high degree of correlation ($R^2 = 0.917 - 0.949$ for total phenolic and $0.789 - 0.952$ for flavonoid). In addition, the low value of the coefficient of variation ($CV < 10\%$) illustrates that the model is considered reproducible. Thus, the regression models at Tabel 2 were feasible used to predict the optimal conditions of extraction.

To evaluate the interaction between variables and to determine the optimum value of each variable, three-dimensional response surface and contour graphs plotted according to the regression equation obtained. Figure 5 presents the form of three-dimensional response surface and contour graphs of the regression equation for total phenolic response to variable concentrations of ethanol and the extraction time of the three methods tested. Furthermore, the optimum conditions obtained from the three methods tested, are presented in Table 3.

Table 3. Summary of total phenolic and flavonoid yields at optimum conditions of maceration, reflux and MAE methods

Methods	Extraction time		[ethanol],%		Power (watt)		Flav. (%)	Phe. (%)
	Flav.	Phe.	Flav.	Fen.	Fen.	Fen.		
Maceration	50,03h	49,21 h	71,99	70,72	-	-	0,21	4,50
Reflux	78,76m	77,37 m	70,25	70,79	-	-	0,24	4,25
MAE	24,42m	30,57 m	64,66	60,85	520,9	495,4	0,38	5,81

Flav: flavonoid, Phe: total phenolic, h: hours, and m: minutes

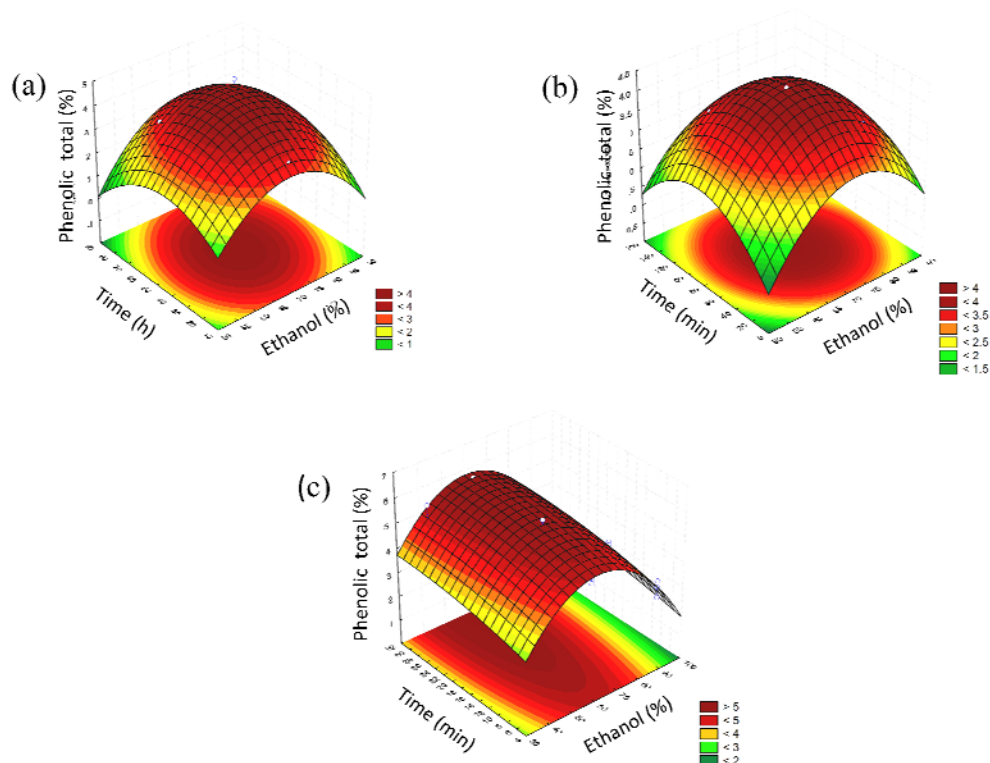


Figure 5. Response surface and contour plots of the effect of ethanol concentration and extraction time on total phenolic yield by maceration(a), reflux (b), and MAE (c) methods

Effect of extraction time and the concentration factors for the extraction of ethanol by maceration method for total phenolic and flavonoid levels are relatively equal. In contrast, it appears that both factors influence the differences in the presence of heat stimulation (reflux) and especially microwave irradiation. Besides the optimal extraction of flavonoids in the presence of these stimuli is shorter than the extraction of total phenolic flavonoids which illustrates that the fraction of easily degraded / oxidized by thermal effects. This phenomenon is in accordance with the results found by Trucheva et al. (2007).¹⁷² However, this phenomenon can be suppressed by working at optimal conditions. Based on the extraction yield, extraction time and solvent consumption, MAE method is more efficient than the two other methods. In addition, MAE method also showed high selectivity in extracting flavonoid fraction.

Bioactive Extracts, Fractionations and Antimicrobial Activity Tests

Ethanol extract of propolis (EEP) which is used in the fractionation process was obtained from the best method of extraction (MAE). Fractionation done in two ways, based on differences in pH and the polarity of the extracting solvent-based differences. The results of fractionation monitored by high performance liquid

chromatography technique (HPLC). Various studies on the biological activity of propolis tracing Brazilia red by combining bioassay and HPLC techniques have been published. Alensar et al. (2007) has conducted a guided fractionation by HPLC techniques in order to explore the potential of the Brazilian red propolis components as an antioxidant agent, antimicrobial and antikanker.¹⁷⁷ Likewise, Castro et al. (2009) has conducted fractionation up to the level of sub-fractions in the context of the purification fractions of antimicrobial propolis originating from the province of Bahia, Brazil.

Viewed from the aspect of separation of components of EEP, the results show that extraction is based on differences in polarity of the extracting solvent is more effective than pH-based differences. The results of fractionation (based on solvent polarity differences) are presented in the form of HPLC chromatograms (Figure 6).

Test of antimicrobial activity against *S. mutans* include inhibition zone test by agar diffusion method, determination of MIC and MBC values. The results obtained are presented in Tables 4 and 5. MIC and MBC values of EEP and the various fractions gave the same pattern with the pattern shown in the experimental zone of inhibition, by order of the inhibition of the chloroform fraction > ethylacetate fraction > EEP. Components with high polarity (located in the fraction of water) is relatively not show antibacterial activity (zone of inhibition = 0, MIC and MBC > 1600 μ g / ml).

Duarte et al. (2003) also showed that the antibacterial active compounds of propolis type 6 has a non-polar character and are a valuable resource for the exploration of new bioactive compounds in propolis.¹⁵¹ Meanwhile, chlorhexidine showed antibacterial activity against *S. mutans* better than the EEP and its fractions were investigated in this study. Furthermore, it should be noted that chlorhexidine is a single synthetic compound, while the EEP and its fractions are a group of compounds. Thus, the quantity of active compound in the EEP group of compounds or compound fractions will be diluted by others in the group.

Based on the testing of antibacterial activity could be concluded that the chloroform fraction of the EEP was a most potential as anticaries agent. Even though its performance against *S. mutans* was still lower than chlorhexidine, but still very possible to obtain an anticaries agent comparable with chlorhexidine through exploration down to sub-fractions or a single compound. This statement was supported by research conducted by Castro et al. (2009) who showed that an increase in the inhibition of *S. aureus* and *S. mutans* Ingbritt 1600 from hexane fraction of Brazilian propolis Type-6 into sub-fractions and the value of sub-MIC of this fraction was equal to chlorhexidine in inhibiting *S. aureus* and still comparable to *S. mutans* Ingbritt 1600.

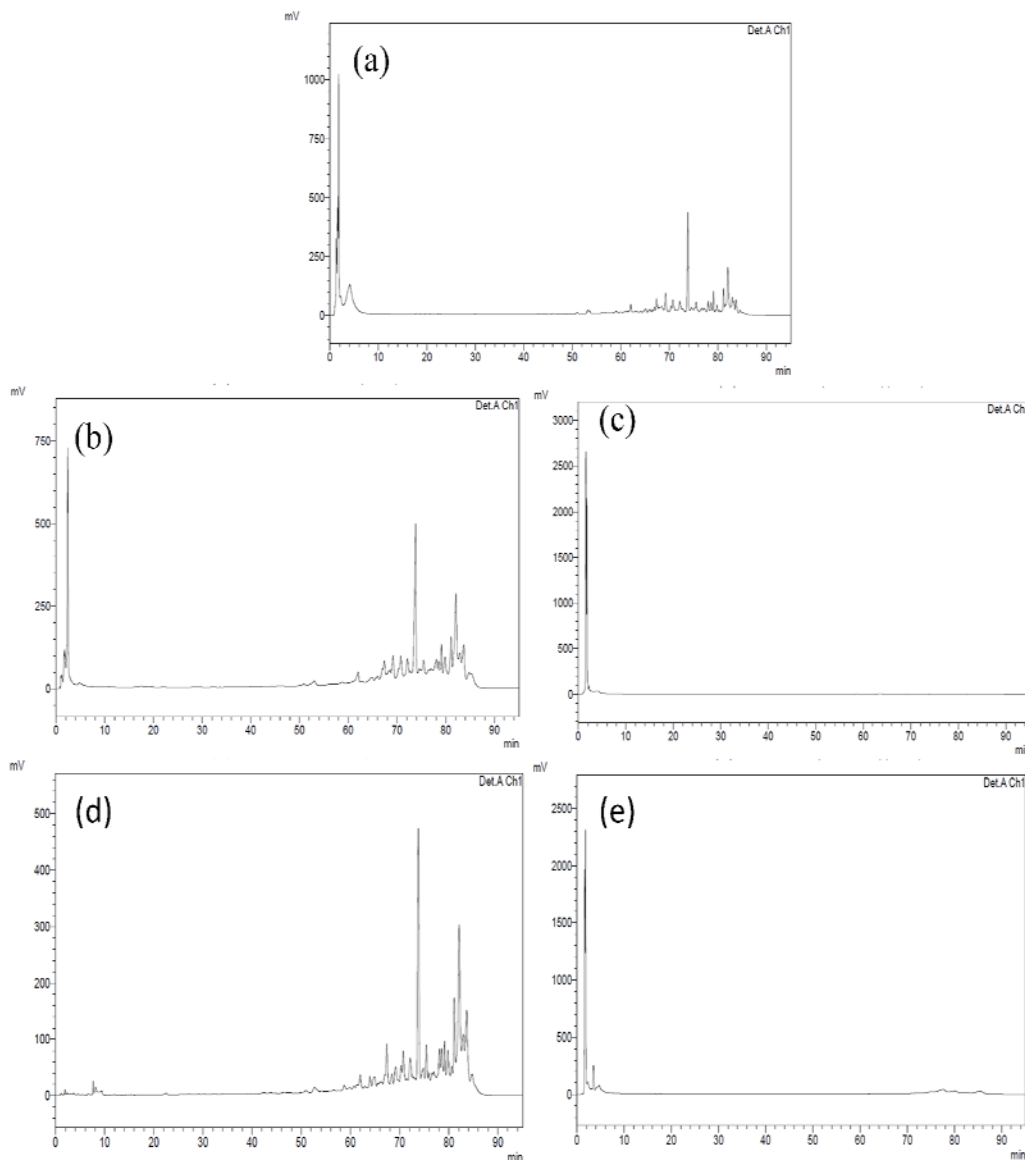


Figure 6. HPLC chromatogram of EEP (a), ethylacetate fraction (b), water fraction of water-ethylacetate system (c), chloroform fraction (d), and water fraction of water-chloroform system

Characteristics of adherence and Chemical Identification of Variants Selected

Effect of bioactive materials to adherence *S.mutans* is important to observe, because adherence / attachment of bacteria to the tooth surface is a major requirement in the initiation of the formation of dental plaque. In addition, adherence properties of bacteria are usually associated with the bacteria's ability to synthesize glucans (mainly from sucrose), which promotes the accumulation of cariogenic streptococci and contributes significantly to the formation of dental plaque.^{64,65}

Adherence test in this study was performed only on the most potential fraction of EEP as anticaries agent, ie the fraction of chloroform. The results obtained are presented Figure 7.

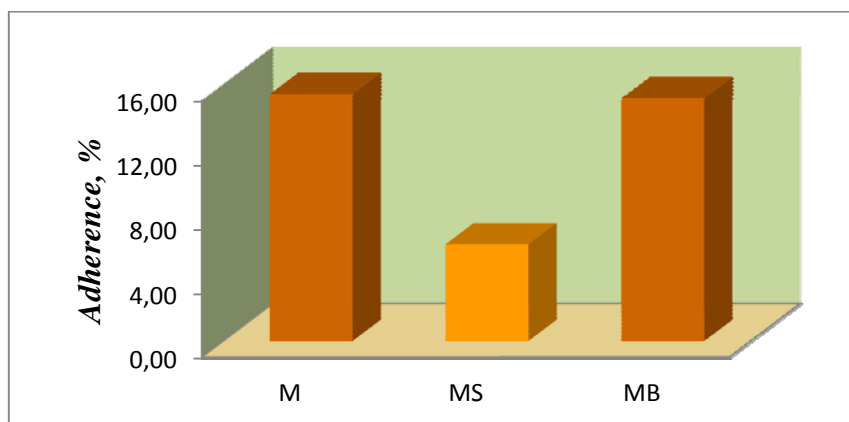


Figure 7. Adherence characteristics of *S.mutans* (%) in BHI medium containing 1% sucrose (M), in the medium +chloroform fraction 50 µg/ml (MS) and the media + solvent as a blank (MB)

In BHI medium containing 1% sucrose to give adherence to the glass surface by 15.48% and the solvent (blank) had no effect on adherence of *S.mutans* tested. Presence of chloroform fraction of sub-MIC concentrations (50 µg / ml) decreased the adherence ability of *S.mutans* significantly (approximately 60% decrease relative to the BHI medium containing 1% sucrose). This situation illustrates indirectly, that the chloroform fraction of EEP showed a substantial ability in inhibiting the synthesis of glucan by *S.mutans* tested.

Chemical identification of the bioactive components of variants selected (chloroform fraction) was done by using LC-MS-assisted ChemSpider data base. The analysis was done only for major components, which gives a large broad peak in LC-MS profile (Figure 8).

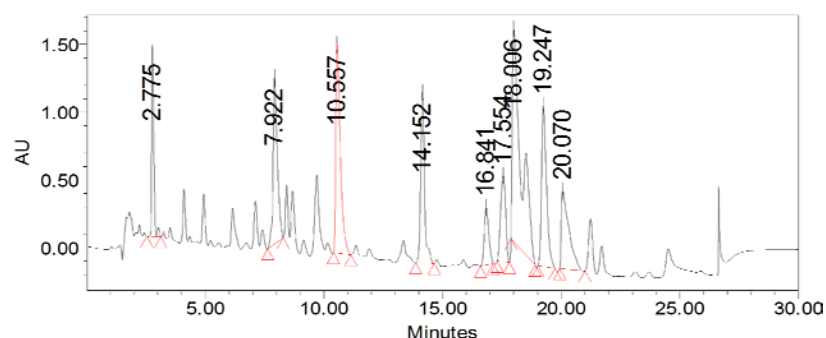


Figure 8. LC-MS Profile of chloroform fraction of EEP

The results showed that the composition of selected bioactive fraction is dominated by nitrogenous compounds (Table 6).

Tabel 6. Mayor components of chloroform fraction of EEP

Retention times (min.)	Compounds
2,776	1'-(2-{[4-(4-Morpholinyl)phe-nyl]amino}-2-oxoethyl)-1,4'-bipiperidine-4'-carboxamide
7,992	Leucyl-N-{1-[4-amino-6-(dimethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]-3-methylbutyl}leucinamide
10,557	5-Hydroxy-2-(4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)-3-methylphenyl β -D-glucopyranoside. Aloenin
14,152	N ¹ ,N ^{1'} -[1,4-Phenylenebis(methylene)]bis[N ¹ -(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine
16,841	(13E,15R)-15-Hydroxy-N-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-9-oxoprost-13-en-1-amide
17,554	(2S,3R,5E)-2-({[3-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methyl-4-pyridinyl]methyl}amino)-5-octadecene-1,3-diol
18.006	Methyl {[3-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-2,6-diethyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl]oxy}acetate
19,247	N,N-Dimethyl-N-octadecyl-1-octadecanaminium
20,070	3 α ,7 α ,12 α)-N-(2-Aminoethyl)-3,7,12-trihydroxycholan-24-amide

Morfolin derivatives such as 1'-(2 - {[4 - (4-Morpholinyl) phenyl] amino}-2-oxoethyl) -1,4 '-bipiperidine-4'-carboxamide and (13E, 15R) -15 - hydroxy-N-[2 - (4morpholinyl) ethyl]-9-en-13-oxoprost-1-Amide potential as antibacterial agents which is common in this group of compounds. N, N-Dimethyl-N-octadecyl-1-Octa-decanaminium potential as an antioxidant. Kroenke (1978) have patented molibdenium salt of N,N-Dimethyl-N-octadecyl-1-Octa-decanaminium as antismoke agent.¹⁹³

5-Hydroxy-2-(4-methoxy-2-oxo-2H-pyran-6-yl)-3-methylphenyl- β -D-glucopyranoside are aloenin derivatives often found on the plant *Aloe arborescens* Mill. *Var. Natalensis* Berger. According to Hirata and Saga (1978), aloenin was used in Japan as a traditional medicine for gastro-intestinal disorders, burns, and insect bites.¹⁹⁴ In addition, it appears that the chemical content of the studied samples of propolis is very different from European propolis which is dominated by polyphenolic compounds and Propolis Brazilian and other Latin America is dominated by prenylated coumaric acid derivatives and asetophenone.^{129,130}

Conclusion

Based on the data and the various phenomena which have been obtained in this study, it could be drawn some conclusions as follows.

1. Based on yield, extraction time and solvent consumption, MAE method is more efficient in extracting the bioactive components of propolis than the method of maceration and reflux.

2. The data obtained from two EEP fractionation techniques (based on differences in pH and extracting solvent polarity) show polar solvent-based fractionation is more effective than pH-based differences, in terms of aspects of the separation of components of EEP. Furthermore, the chemical profiles based HPLC chromatograms show the chemical profiles of the samples studied EEP shows a complex chemical composition which is dominated by components with low polarity. Fractionation with chloroform-water system showed the separation between fractions with a high polar and polar fractions with significantly lower.
3. Based on the testing of antimicrobial activity against *S.mutans* ATCC 25175 (zones of inhibition, MIC and MBC), showed that the fraction of the chloroform fraction of the EEP is the most potential as an anti-caries agents than the EEP and the other fractions tested (ethyl acetate fraction and the fraction of water in the system water-and water-ethylacetate klorofom).
4. Characteristics of the fraction of potential as an agent anticaries (chloroform fraction) are: MIC = 50-100 µg / ml, MBC = 400-800 µ g / ml = 6.02% adherence characters (approximately 60% decrease in adherence relative to BHI media containing 1% sucrose as a comparison) and low polarity.
5. Antibacterial sensitivity (*S. mutans*) from the fraction of potential still under chlorhexidine (MIC and MBC <12.5µg/ml). However, the exploration to the sub-fractions or single components of the chloroform fraction, it is still possible to obtain components with sensitivity comparable to chlorhexidine.
6. Major constituent of the fraction which is potential as anticaries agents dominated by nitrogenous compounds . Two of them were morfolin derivatives which are widely used as biocides. Meanwhile, N, N-Dimethyl-N-octadecyl-1-Octa-decanaminium potential as antioxidant and also identified a aloenin derivative compound that has been used in traditional medicine in Japan.

Suggestions

Basically, the study of bioactive components in propolis aims to obtain new bioactive compounds from natural products that are useful for the future drug development. In this study, only delivered up to the level of potential fraction as an anticaries agent. Research up to the level of sub-fractions or single compounds need to be followed in order to obtain anticaries agent with sensitivity comparable with chlorhexidine to that currently regarded as the "Gold Standard" of anticaries.

Novelty

On the basis of scientific information on research of propolis, some aspects of the novelty of this research are as follows:

- This is the first study of the extraction, fractionation and evaluation of bioactive component of Indonesian propolis as anticaries agent, particularly from Banten. In addition, the results also give a perspective on the potential bioactive components in the propolis from Banten as an antioxidant and its utilization in other therapeutic areas.
- The discovery of potential anticaries agents in the chloroform fraction dominated by nitrogenous compounds is spectacular and the extent of searches conducted on the bioactive components found in the propolis from different parts of the world, never mentioned the nitrogenous compounds. In addition, chlorhexidine which is currently regarded as the gold standard of anticaries agent is also a nitrogenous compound, so it is possible the presence of one or more compounds in the chloroform fraction has an activity equal to or better than chlorhexidine.

DAFTAR PUSTAKA

1. Petersen PE., Bourgeois D., Ogawa H., Estupinan-Day S., Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull. World Health Organ.* 2005; **83** (9); 661-669.
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKEDAS) Nasional 2007.
3. WHO, 1995 : Oral Health Care, Needs of the Community. A Public Health Report.
4. Featherstone JD. The continuum of dental caries—evidence for a dynamic disease process. *J. Dent. Res.* 2004; **83**(spec no C): C39-C42.
5. Fejerskov O, Nyvad B. Is dental caries an infectious disease? Diagnostic and treatment consequences for the practitioner. In: Schou L, ed. *Nor Dentistry 2003 Yearbook*. Copenhagen, Denmark: Quintessence Publishing; 2003:141-151
6. Loesche WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J. Dent. Res.* 1979; **58**(12): 2404-2412.
7. Fejerskov O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. *Caries Res* 2004; **38**:182–191
8. Southam JC, Soames JV (1993). "2. Dental Caries". *Oral pathology* (2nd ed.). Oxford: Oxford Univ. Press. ISBN 0-19-262214-5.
9. Burt B. Trends in caries prevalence in North America children. *Int. Dent. J.* 1994; 44: 403-413.
10. Rippra LW. Has the decline in caries prevalence reduced the need for fissure sealant in UK. A review: *J. Peadiatric. Dent.* 1990; **6**: 79-83.
11. Lamont RJ, Jenkinson HF (2010). *Oral Microbiology at a Glance*, John Wiley & Sons, Ltd., Pub.
12. HaTa S, HaTa H, Miyasawa H, Mayanagi H. Correlation between caries prevalence and Mutans Streptococci by real-time PCR Seq #92 - Caries Risk in Children March 2004 Hawaii Convention Center Exhibit Hall 1-2

Back to the Cariology Research Program Back to the IADR/AADR/CADR
82nd General Session (March 10-13, 2004)

13. Marcucci MC and Bankova VS. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. *Curr Top Phytochem* 1999; **2**: 115-123
14. Saric B, Hasanagic M. Risk factor for caries-control and prevention. *Medicinski Glasnik* 2008; **5** (2): 109-114
15. Seki M, Karakama F, Yamashita Y. Does a clinical evaluation of oral cleanliness with caries incidence in preschool children? Finding from a cohort study. *J. Oral Sci.* 2003; **45**(2): 93-98.
16. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* 1986; **50**: 353–380.
17. Röllä G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferases and polysaccharides. *Scand. J. Dent. Res.* 1989; **97**(2):115-119.
18. Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 1992; **60**: 284-295
19. Koo H, Xiao J, Klein MI. Extracellular Polysaccharides matrix-An often forgotten virulence factor in oral biofilm research. *Int. J. Oral Sci.* 2009; **1**(4):229-234.
20. Xiao J, Koo H. Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 2010; **108**(6): 2103-2113.
21. Dibdin GH, Shellis RP. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *J. Dent. Res.* 1988; **67**(6): 890-895.
22. Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000; **34**(6): 491-497.

23. Duckworth RM. The science behind caries prevention. *Int. Dent. J.* 1993; **43**: 529–539.
24. Koo H, Vacca-Smith AM, Bowen WH, Rosalen PL, Cury JA, Park YK. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Res.* 2000; **34**, 418-426.
25. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv. Dent. Res.* 1997; **11**(1): 110-26.
26. Ccahuana-Vásquez R.A., Cury J.A. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz. Oral Res.* 2010; **24**(2):135-141
27. Lindhe J. Triclosan/copolymer/fluoride dentifrices. A new technology for the prevention of plaque, calculus, gingivitis and caries. *Am J Dent* 1990;3(Spec Iss):S3-S4.
28. Kaplowitz GJ, Cortel M. Chlorhexidine: A Multi-Functional Antimicrobial Drug, www.ineedce.com, 2008 by the Academy of Dental Therapeutics and Stomatology, a division of PennWell
29. Phan TN, Marquis RE. Triclosan inhibition of membrane enzymes and glycolysis of *Streptococcus mutans* in suspensions and biofilms. *Can. J. Microbiol.* 2006;52:977-983.
30. Gürkan CA, Zaim E, Bakirsoy I, Soykan E. Short-term side effects of 0.2% alcohol-free chlorhexidine mouthrinse used as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a double-blind clinical study. *J Periodontol.* 2006;77(3):370-84.
31. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; **52**: 782–789.
32. Chlorhexidine Official FDA Information, Side effects and uses. <http://www.drugs.com/Pro/Chlorhexidine.html>.
33. Anusavice KJ. Present and future approaches for the control of caries. *J. Dent. Educ.* 2005; **69**(5): 538-554

34. Hegazi AG, Abd El Hady FK. Egyptian Propolis: 3. antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from Reclaimed Lands. *Z. Ntaureforsch.* 2002; **57**: 395-502.
35. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Kebijakan Obat Tradisional Tahun 2007, Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 381/Menkes/SK/III/2007, Tanggal 27 Maret 2007, p. 24.
36. Bankova VS, De Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; **31**: 3-15.
37. Palombo E.A . Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011; Volume 2011, Article ID 680354, 15 pages
38. Parolia A, Thomas MS, Kundabala M, Mohan M. Propolis and its potential uses in oral health. *Int. J. Med. and Medical Sci.* 2010; **2**(7): 210-215.
39. Abd El Hady FK, Hegazi AG. Egyptian Propolis: 2. chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east Nile Delta propolis. *Z. Natureforsch.* 2002; **57**: 386-394.
40. Ansorge S, Reinhold D, Lendeckl U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Z. Naturforsch.* 2003; **58**: 580-589.
41. Boyanova L, Gergov G, Nikolov R, Derejian S, Lazarova E, Katsarov N, Mitov I, Krastev Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains *in vitro* agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *J. Med. Microbio.* 2005; **54**: 481-483.
42. Gonsales GZ, Orsi RO, Fernandes JA, Prodigues P, Funari SR. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.* 2006; **12**(2): 276-284.
43. Katircioglu H, Mercan N. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis form different regions. *Afr. J. of Biotech.* 2006; **5**(11):1151-1153.

44. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin FR, Tsvetkova I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. CAM. 2006; **3** (2): 249-254
45. Oksuz H, Duran N, Tamer C, Cetin M, Silici S. Effect of propolis in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* Keratitis in Rabbits. Ophthalmic Research 2005; **37**: 328-334.
46. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol . 1998;36:347-363
47. Koru O, Toksoy F, Acikel CH, Tunca YM, Baysallar M, Uskudar Guclu A, Akca E, Ozkok Tuylu A, Sorkun K, Tanyuksel M, Salih B. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. Anaerobe. 2007; 13: 140-145.
48. Krol W, Czuba Z, Scheller S, Gabrys J, Grabiec S, Shani J. Antioxidant property of ethanolic extract of Propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. Biochem. Int. 1990; **21**: 593-597.
49. Velazquez C, Navarro M, Acosta A, Angulo A, Dominguez Z, Robles R, Robles-Zepeda R, Lugo E, Goycoolea FM, Velazquez EF, Astiazaran H, Hernandez J. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. Appl. Microbiol. 2007; **103**: 1747-1756.
50. Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. Fitoterapia 2002; **73**(S): 53-63.
51. Seidel V, Peyfoon E, Watson DG, Fearnley J (2008). Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. Phytother. Res. 2008; **22**: 1256-1263.
52. Orsi R, Sforcin J, Rall V, Funari S, Barbosa L, Fernandes J. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. J. Venom. Anim. Toxins incl. trop. Dis. 2005; **11**: 109-116.
53. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res. 1991; 25: 347-351.

54. Park YK, Koo H, Abreu JA, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol.* 1998; **36**: 24-28 .
55. Fitzgerald RJ, Keyes PH, Stoudt TH, Spinell DM. The Effect of a dextranase preparation on plaque and caries in hamsters, a preliminary report. *JADA* 1968; **76**:301-304.
56. Hamada S, Koga T, Ooshima T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.* 1984; **63**: 407-411.
57. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Ikegaki M, Sattler A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res.* 1999; **33**: 393-400.
58. Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch.* 1995; **50**: 529-532.
59. Korel W, Scheller S, Shani J, Pietsz G, Czuba Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus* . *Arzneimittelforschung.* 1993; **43**:607-609.
60. Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Moura FF. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honey Bee Sci.* 2000; **21**: 85-90.
61. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.* 1980; **63**, 407-411.
62. Tanzer JM, Feedman ML, Fitzgerald RJ. *Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion*, ed. by Mergenhagen SE, Rosan B, American Society for Microbiology Washington, D.C., U.S.A. 1985, pp. 204—211.
63. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect. Immun.* 1993; **61**: 3811-3817.
64. Critchley P. The breakdown of carbohydrate and protein matrix of dental plaque. *Caries Res.* 1969, **3**, 249—265.

65. Hotz P, Guggenheim B, Schmid R. Carbohydrates in pooled dental plaque. *Caries Res.* 1972; **6**, 103-121.
66. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 2005; **50**:2502-2506
67. Koo H, Rosalen P L, Cury JA, Ambrosano GM, Murata RM, Yatsuda R, Ikegaki M, Alencar SM, Park YK. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans Streptococci. *Curr. Microbiol.* 2000; **41**: 192-196.
68. Takahashi K, Fukazawa M, Motohia H, Ochiai K, Nishikawa H, Miyata T. A. Pilot study on antiplaque effects of mastic chewing gum in the oral cavity. *J. Periodontol.* 2003; **74**: 501-505.
69. Sabir A. Aktivitas antibakteri flavonoid propolis *Trigona sp* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* (in vitro). *Maj. Ked. Gigi (Dent. J.)*. 2005; **38**: 135-141.
70. Syamsudin, Wiryowidagdo S, Simanjuntak P, Heffen WL. Chemical composition of propolis from different regions in Java and their cytotoxic activity. *Am. J. Biochem & Biotech.* 2009; **5**(4): 180-183.
71. Salomão K, Pereira PR, Campos LC, Borba CM, Cabello PH. Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evid. Based Complement, Alternat. Med.* 2008; **5**: 317-324.
72. Trusheva B, Milena Popova M, Eko Budi Koendhori, Iva Tsvetkova I, Christo Naydenski C, Bankova V. Indonesian propolis: chemical composition, biological activity and botanical origin. *Nat. Prod. Lett.* 2011; **25**(6): 606-613.
73. Jeevarathan, J., Deepti, A., Muthu, M., Rathna P.V., Chamundeeswari, G. Effect of fluoride varnish on *Streptococcus mutans* counts in plaque of caries-free children using dentocult SM strip mutans test: A randomized controlled triple blind study. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* 2007; **25** (4): 157-163.
74. Kolenbrander PE, Andersen RN, Kazmerak KM, Palmer RJ. Coaggregation and coadhesion in oral biofilms. In *Community structure and co-operation in biofilms*. Edited by: Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M.

- Cambridge, Cambridge University Press, Society for General Microbiology Symposium 2000; **59**: 65-85.
75. Margolis HC, Duckworth JH, Moreno EC. Composition of pooled resting plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J. Dent. Res.* 1988; **67**: 1468–1475.
 76. National Institutes of Health Clinical Center (CC). NCT00001726, History of Changes, October 26, 2010
 77. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci. Rev.* 1976; **9**:63-107.
 78. Theilade E: The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1986; **13**: 905-911
 79. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003; **149**: 279-294
 80. de Soet JJ, Nyvad B, Kilian M. Strain-related acid production by oral *streptococci*. *Caries Res* 2000 , **34**:486-490
 81. Brailsford SR, Shah B, Simins D, Gilbert S, Clark D, Ines I, Adama SE, Allison C, Beighton D. The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. *J Dent Res.* 2001; **80**:1828-183
 82. Sansone C, van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis HC. The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J Dent Res* 1993; **72**: 508-516.
 83. Theilade E. The experimental gingivitis studies: the microbiological perspective. *J. Dent. Res.* 1996; **75**:1434–1438.
 84. Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millenium? *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 2002; **13**: 126–131.
 85. Newbrun E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. *Odontol. Revy.* 1967; **18**: 373–386.
 86. Marsh PD. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. *Proc. Finn. Dent. Soc.*1991; **87**: 515–525.
 87. De Stoppelaar JD, van Houte J, Backer Dirks O. The effect of carbohydrate restriction on the presence of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*

- and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in human dental plaque. *Caries Res.* 1970;4:114–123.
88. Dennis DA, Gawronski TH, Sudo SZ, Harris RS, Folke LE. Variations in microbial and biochemical components of four-day plaque during a four-week controlled diet period. *J. Dent. Res.* 1975; **54**: 716–722.
 89. Staat RH, Gawronski TH, Cressey DE, Harris RS, Folke LE. Effects of dietary sucrose levels on the quantity and microbial composition of human dental plaque. *J. Dent. Res.* 1975; **54**: 872–880.
 90. Minah GE, Lovekin GB, Finney JP. Sucrose-induced ecological response of experimental dental plaques from caries-free and caries-susceptible human volunteers. *Infect. Immun.* 1981; **34**: 662–675.
 91. Ribeiro CC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br. J. Nutr.* 2005; **94**: 44–50.
 92. Zero DT, van Houte J, Russo J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* 1986b; **65**: 918–923.
 93. Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and on enamel demineralization. *Caries Res.* 2006; **40**: 28–32.
 94. Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. *In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque.* *Caries Res.* 1997;31:356–360.
 95. Johnson MC, Bozzola JJ, Shechmeister IL, Shklair IL. Biochemical study of the relationship of extracellular glucan to adherence and cariogenicity in *Streptococcus mutans* and an extracellular polysaccharide mutant. *J. Bacteriol.* 1977; **129**: 351–357.
 96. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J. Dent. Res.* 2000; **79**: 1371–1377.

97. Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res.* 2002; **36**: 347–352.
98. Pearce E. Plaque minerals and dental caries. *NZ. Dent. J.* 1998; **94**: 12–15.
99. Cury JA, Marques AS, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA. Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. *Braz. Dent. J.* 2003; **14**: 147–152.
100. Cury JA, Francisco SB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. In situ study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and dental caries. *Braz. Dent. J.* 2001; **12**: 101–104.
101. Margolis HC, Moreno EC. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. *J. Dent. Res.* 1992; **71**: 1776–1784.
102. Birkhed D, Frostell G, Lamm CJ. Cariogenicity of glucose, sucrose and amylopectin in rats and hamsters infected and noninfected with *Streptococcus mutans*. *Caries. Res.* 1980; **14**: 441–447.
103. Horton WA, Jacob EA, Green RM, Hillier VF, Drucker DB. The cariogenicity of sucrose, glucose and maize starch in gnotobiotic rats mono-infected with strains of the bacteria *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus milleri*. *Arch. Oral Biol.* 1985; **30**: 777–780.
104. Downer MC. Caries experience and sucrose availability: an analysis of the relationship in the United Kingdom over fifty years. *Community Dent. Health* 1999; **16**: 18–21.
105. Duggal MS, Toumba KJ, Amaechi BT, Kowash MB, Higham SM. Enamel demineralization *in situ* with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. *J. Dent. Res.* 2001; **80**: 1721–1724.
106. Hefti A, Schmid R. Effect on caries incidence in rats of increasing dietary sucrose levels. *Caries Res* 1979; **13**: 298–300.
107. König KG, Schmid P, Schmid R. An apparatus for frequency-controlled feeding of small rodents and its use in dental caries experiments. *Arch. Oral Biol.* 1968; **13**: 13–26.

108. Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. *In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use.* J. Dent. Res. 2004; **83**: 71–75.
109. Tanzer, JM.; Freedman, ML.; Woodiel, FN.; Eifert, RL.; Rinehimer, LA. Association of *Streptococcus mutans* virulence with synthesis of intracellular polysaccharide. In: Stiles, HM.; Loesche, WJ.; O'Brien, TC., editors. Microbial aspects of dental caries. Washington, DC: Information Retrieval; 1976. p. 597-616
110. Zero DT, van Houte J, Russo J. Enamel demineralization by acid produced from endogenous substrate in oral streptococci. Arch Oral Biol 1986a; **31**: 229–234.
111. Kopec LK, Vacca-Smith AM, Bowen WH. Structural aspects of glucans formed in solution and on the surface of hydroxyapatite. Glycobiology 1997; **7**: 929–934.
112. Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Quivey RG Jr, Bowen WH. Interactions of streptococcal glucosyltransferases with alpha-amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite. Arch. Oral Biol. 1996; **41**: 291–298.
113. Frostell G, Keyes PH, Larson RH. Effect of various sugar and sugar substitutes on dental caries in hamsters and rats. J. Nutr. 1967; **93**: 65–76.
114. Krasse B. The effect of caries-inducing streptococci in hamsters fed diets with sucrose or glucose. Arch. Oral Biol. 1965; **10**: 223–226.
115. Hamilton, IR. Intracellular polysaccharide synthesis by cariogenic microorganisms. In: Stiles, HM.; Loesche, WJ.; O'Brien, TC., editors. Microbial aspects of dental caries. Washington,DC: Information Retrieval; 1976.
116. Gibbons RJ, Socransky SS. Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaques. Its relation to dental caries and microbial ecology of the oral cavity. Arch. Oral Biol. 1962; **7**: 73–80.

117. Loesche WJ, Henry CA. Intracellular microbial polysaccharide production and dental caries in a Guatemalan Indian village. *Arch. Oral. Biol.* 1967; **12**: 189–194.
118. Spatafora G, Rohrer K, Barnard D, Michalek S. A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic *in vivo*. *Infect. Immun.* 1995; **63**: 2556–2563.
119. Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res* 2006; **85**:834–838.
120. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, Rosalen PL, Park YK. Apigenin and *tt*-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J. Dent. Res.* 2005; **84**(11):1016-1020.
121. Love RM., Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2002; **13**(2): 171-183
122. Kenneth T. Microbes and dental disease. The microbial world, University Winskonsin-Madison 2008
123. Taubman MA., Nash DA., The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries, *Nat. Rev.Immun.* 2006; **6**: 555-563
124. Australian museum. Stingless bee. <http://australianmuseum.net.au/Stingless-Bee>
125. Crane E. Beekeeping: Science, Practice and World Recourses, Heinemann 1988, London.
126. Ghisalberti EL. Propolis: a review., *Bee Wld.* 1978; **60**: 59–84.
127. Cogshall W, Morse RA. Beeswax: production, harvesting, processing and products. Wicwas Press 1984, Ithaca, NY, USA, 192 pp.
128. Krell R. Value-added products from beekeeping, *FAO Agricultural Service Bull.*, No. 124 (1996)
129. Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch.* 2002; **57c**: 530–533
130. Kumazawa Sh, Yoned M, Shibata I, Kanaeda J, Hamasaka T, Nakayama Ts. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation

- of honeybee behavior and phytochemical analysis. Chem. Pharm. Bull. 2003; **51**: 740-742
131. Sawaya ACHF, Tomazela DM, Cunha IBS, et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. Analyst 2004; **129**: 739-44
 132. Bankova, V. Recent trends and important developments in propolis research. eCAM. 2005; 2: 29-32.
 133. Magro Filho O, de Carvalho AC. Application of propolis to dental sockets and skin wounds. J. Nihon Univ. School Dentistry 1990; **32**(1): 4-13.
 134. Mylotte JM, McDermott C, Spooner J (1987). Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteria. Rev. Infec.Dis. 1987; **9**: 981
 135. Barton MD. Does the use of antibiotics in animals affect human health. Austral Vet. J. 1998; **76**(3): 177-180
 136. Khachatourians GG. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. Can Med. Assoc. J. 1998; **159**: 1129-1136
 137. Cox SD, Mannnn CM, Markham JL. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J. Applied Microbiol. 2000; **88**: 170-175
 138. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Applied Microbiol. 2000; **88**: 308-316.
 139. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Applied Microbiol. 1999; **86**: 985-990.
 140. Emilson C-G, Fornell J. Effect of tooth brushing with chlorhexidine gel on salivary microflora, oral hygiene and caries. Scand. J. Dent. Res. 1976; **84**: 308-319.
 141. Caufield PW, Gibbon RJ (1979). Suppression of *Streptococcus mutans* in the mouths of humans by a dental prophylaxis and topically applied iodine. J. Dent Res. 1979; **58**:1317-1326.
 142. Maltz M, Zickert I. Effect of penicillin on *Streptococcus mutants* , *Streptococcus sanguis* and *Lactobacilli* in hamsters and in man. Scand J. Dent. Res. 1982; **90**:193-199

143. Ambrosio SR, Furtado NAJC, De Oliveira DCR, Da Costa FB, Martins CHG, De Carvalho TC, Porto TS, Veneziani RCS. Antimicrobial activity of kaurane diterpenes against oral pathogens. *Z. Naturforsch.* 2008; **63c**: 326-330.
144. Greenberg M, Dodds M, Tian M. Naturally occurring phenolic antibacterial compounds show effectiveness against oral bacteria by a quantitative structure-activity relationship study. *J. Agr. Food Chem.* 2008; **56**: 11151-11156
145. More G, Tshikalange TE, Lall N, Botha F, Meyer JJM. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *J. Ethnopharmacol.* 2008; **119**: 473-477.
146. Porto TS, Rangel R, Furtado NAJC, De Carvalho TC, Martins CHG, Veneziani RCS, Da Costa FB, Vinholis AHC, Cunha WR, Heleno VCG, Ambrosio SR. Pimarane-type Diterpenes: Antimicrobial activity against oral pathogens. *Molecules* 2009; **14**: 191-199.
147. Bankova V, Dyulgerov A, Popov S, Evstatieva L, Kuleva L, Pureb A, Zamjansan Z. Propolis produced in bulgarian and Mongolia: phenolic and plant origin. *Apidologie* 1992; **23**: 79-85.
148. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR. The composition and plant origins of propolis. *Bee World* 1990; **71**: 107-118.
149. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 ; **46**(5): 1302-1309.
150. Bard M, Albrecht MR, Gupta N, Guynn CJ, Stillwell W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids* 1988; **23**:534-538
151. Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, Rozalen PL. Effect of a novel type of propolis and its chemical fraction on glucosyltransferases and on growth and adherence of Mutans Streptococci. *Biol. Pharm. Bull.* 2003; **26**(4): 527-531

152. Keskin N, Hazir S, Baser HC, Kurkcuoglu M. Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis. *Z Naturforsch.* 2001; **56c**: 1112–1115
153. Velikova M, Bankova V, Sorkun K, Houcine S, Tsvetkova I, Kujumgiev A. Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Z Naturforsch* 2000; **55c**: 790-793.
154. De Laurentis N, Cafarchia C, Lai O, Losacco V, Milillo MA. Chemical composition and biological investigation of Apulia region propolis. *Riv Ital EPPOS* 2002; **34**: 29–41
155. Erdem BG, Olmez S. Inhibitory effect of Bursa propolis on dental caries formation in rats inoculated with *Streptococcus sobrinus*. *Turk. J. Zool.* 2004; **28**: 29–36
156. Santos FA, Bastos EMA, Uzeda M, et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol* 2002; **80**: 1–7
157. Da Silva Cunha IB, Salomao K, Shimizu M, et al. Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. *Chem Pharm Bull* 2004; **52**: 602–604
158. Chen Ch, Wu , Chi , Shy H, Lin J. Cytotoxic prenylflavones from Taiwanese propolis. *J Nat Prod* 2003; **66**: 503–506.
159. Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharm.* 2002; **80**: 67–73
160. Gao XJ, Fan Y, Kent RL Jr, van Houte J, Margolis HC. Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *J. Dent. Res.* 2001; **80**: 1834–1839.
161. Usia T, Banskota AH, Tezuka Ya, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota Sh. Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activity. *J. Nat. Prod.* 2002; **65**: 673-676.
162. Melliou E, Chinou I. Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Med.* 2004; **70**: 515–519

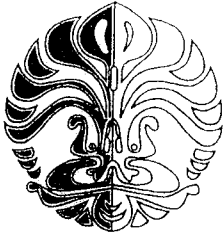
163. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine* 2001; **8**: 16–23
164. Ito J, Chang F, Wang H, Park YK, Ikegaki M, Kilgore N, Lee K. Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *J. Nat. Prod.* 2001; **64**: 1278–1281.
165. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Yu, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origins. *J. Ethnopharmacol.* 1999; **64**: 235-240
166. Popova M, Bankova V, Naydensky Ch, Tsvetkova I, Kujumgiev A. Comparative study of the biological activity of propolis from different geographic origin: a statistical approach. *Macedonian Pharm. Bull.* 2004; **50**: 9-14
167. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol.* 2000; **72**: 239–46
168. Salomao K, Borba CM, Campos LC, Machado DG, Aquino Neto FR, de Castro SL. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; **38**: 87-92.
169. Kumazawa Sh, Hamasaka T, Nakayama Ts. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 2004; **84**: 329–39
170. Chen Ch, Weng M, Wu Ch, Lin J. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *eCAM* 2004; **1**: 175–85
171. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD, (eds.). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008.
172. Trusheva B, Trunkova D, Bankova V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal* 2007; **1**:13

173. Chen CR, Lee YN, Lee MR, Chang CMJ. Supercritical fluids extraction of cinnamic acid derivatives from Brazilian propolis and the effect on growth inhibition of colon cancer cells. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2009; **40**:130-135.
174. Paviani LC, Dariva C, Marcucci MC, Cabral FA. Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from the dry ethanolic extract of propolis, *J. Food Process Eng.* 2010; 33 (1): 15–27.
175. Wang BJ, Lien YH, Yu ZR. Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chem.* 2004; 86 (2), 237-243.
176. Park YK, Koo H, Sato HH, Contado JL. Survey of some components of propolis which were collected by *Apis mellifera* in Brazil. *Arquivos de biologia e Tecnologia* 1995; **38**: 1253–1259
177. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ikegaki M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Science Direct* 2007, Elsevier, online at www.sciencedirect.com.
178. Otto M. *Chemometry*. Wiley-VCH verlag GmbH 1999, Weinheim
179. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteau reagent. *Methods of Enzymology* 1999; **299**: 152–178.
180. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Tentative standard M26-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
181. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved standard. NCCLS publication no. M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa
182. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch. Oral Biol.* 2000; **45**: 141-148.

183. Hamada S, Torii M. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. *Infect. Immun.* 1978; **20**: 592-599.
184. Myers, R.H., Montgomery, D.C., *Response Surface Methodology: Process and Product in Optimization using Designed Experiments*, Wiley, New York 1995
185. Singh, A., Sabally, K., Kubow, S., Donnelly, D.J., Garipey, Y., Orsat, V., Raghavan, G.S.V., Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from potato peels. *Molecules* 2011; **16**: 2218-2232.
186. Bai, X-L., Yue, T-L., Yuan, Y-H., Zhang, H-W., Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis. *J. Sep. Sci.* 2010; **33**: 3751-3758.
187. Kim, S-H., Kim, I-H., Kang, B-H., Lee, K-H., Lee, S-H., Lee, D-S, Cho, S.K., Hur, S-S., Kwon, T-K, Lee J-M., Optimization of ethanol extraction conditions from propolis (a bee product) using response surface methodology. *Korean J. Food Preserv.*, 2009; **16** (6): 908-914.
188. Burdock, G.A., Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis), *Food and Chemical Toxicology* 1998; **36**,. 347-363.
189. Fu, J., Zhao, Y., Wu, Q., Optimising photoelectrocatalytic oxidation of fulvic acid using response surface methodology. *J. Hazard Mater.* 2007; **144**: 499-505
190. Letellier, M., Budzinski, H., Charrier, L., Capes, S., Dorthe, A.M., Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclicaromatic hydrocarbons from marine sediment. *J. Anal. Chem.* 1999; **364**:228-237
191. Kiss, G.A.C., Forgacs, E., Serati, T.C. Mota, T., Morais, H., Ramos, A., Optimization of the microwave assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annum* L.) powders. *J. Chromatogr.* 2000; A. **889**: 41-49
192. Tomas-Barberan, F.A., Garcia-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Tomas-Lorente, F., Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* 1993; **34**: 191-196\

193. Kroenke, W.J., Dimethyldioctadecylammonium molybdates, US-Patent 4424164,1984.
194. Hirata, T., Saga, T., Structure of aloenin, a new biologically-active bitter glucoside from *Aloe arborescens* var. *Natalensis*, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1978; **51(3)**: 842-849.

LAMPIRAN



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

JLN. SALEMBA RAYA NO. 4 JAKARTA PUSAT 10430
TELP. (62-21) 31930270, 3151035
FAX. (62-21) 31931412

SURAT KETERANGAN LOLOS ETIK

Nomor: 131/Ethical Clearance/FKGUI/V/2012

Setelah membaca dan mempelajari/mengkaji usulan penelitian yang tersebut di bawah ini:

Judul : “ Kajian Senyawa Bioaktif Propolis *Trigona spp* sebagai Agen Antikaries Melalui Pendekatan *Biossay* Dipandu dengan Analisis Kimia ”

Nama Peneliti : Drg. Irene Margaretha, SpOrt 0906598341

Sesuai dengan keputusan Anggota Komisi Etik, maka dengan ini Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia menerangkan bahwa penelitian tersebut dinyatakan lolos etik.

Mengetahui:
Dekan FKGUI,



Prof. drg. Bambang Irawan, PhD.
NIP. 195306151980031005

Jakarta, 30 Mei 2012
Ketua Komisi Etik Penelitian FKGUI,

drg. Anton Rahardjo, MKM, PhD
NIP. 195406021983031002

Lampiran 2. Data Proses Respon Permukaan

DATA MASERASI

etanol,%	t,maserasi	fenol,maserasi
56	48	3.264
60	24	3.36
60	72	3.383
70	14	3.383
70	48	4.44
70	48	4.555
70	82	3.24
80	24	3.319
80	72	3.864
84	48	3.368

Response Surface Regression: fenol,maserasi versus etanol,%, t,maserasi

The analysis was done using coded units.
Estimated Regression Coefficients for fenol,maserasi

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	4.49601	0.13874	32.407	0.000
etanol,%	0.10352	0.09761	1.061	0.349
t,maserasi	0.06460	0.09819	0.658	0.547
etanol,%*etanol,%	-1.09009	0.18266	-5.968	0.004
t,maserasi*t,maserasi	-1.09670	0.18330	-5.983	0.004
etanol,%*t,maserasi	0.25882	0.19457	1.330	0.254

S = 0.1962 R-Sq = 93.0% R-Sq(adj) = 84.3%, CV=5.42%

Analysis of Variance for fenol,maserasi

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	2.05729	2.05729	0.411458	10.69	0.020
Linear	2	0.05996	0.05996	0.029981	0.78	0.518
Square	2	1.92921	1.92921	0.964605	25.06	0.005
Interaction	1	0.06812	0.06812	0.068121	1.77	0.254
Residual Error	4	0.15399	0.15399	0.038498		
Lack-of-Fit	3	0.14738	0.14738	0.049126	7.43	0.262
Pure Error	1	0.00661	0.00661	0.006613		
Total	9	2.21128				

Estimated Regression Coefficients for fenol,maserasi using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-23.7239
etanol,%	0.759932
t,maserasi	0.0549126
etanol,%*etanol,%	-0.00556170
t,maserasi*t,maserasi	-9.48700E-04
etanol,%*t,maserasi	0.000543750

(Lanjutan)

Predicted Response for New Design Points Using Model for fenol,maserasi

Point	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
1	3.30240	0.154300	(2.87399, 3.73080)	(2.60936, 3.99543)
2	3.40435	0.155379	(2.97295, 3.83575)	(2.70946, 4.09924)
3	3.23454	0.155379	(2.80314, 3.66595)	(2.53965, 3.92943)
4	3.33471	0.155409	(2.90323, 3.76620)	(2.63977, 4.02965)
5	4.49601	0.138735	(4.11082, 4.88120)	(3.82882, 5.16319)
6	4.49601	0.138735	(4.11082, 4.88120)	(3.82882, 5.16319)
7	3.46391	0.155409	(3.03242, 3.89539)	(2.76896, 4.15885)
8	3.29123	0.155379	(2.85983, 3.72263)	(2.59634, 3.98612)
9	3.64342	0.155379	(3.21202, 4.07482)	(2.94853, 4.33831)
10	3.50943	0.154300	(3.08102, 3.93783)	(2.81639, 4.20246)

Critical values; Variable: fenol,maserasi (Spreadsheet42) Solution: maximum Predicted value at solution: 4,499831

	Observed - Minimum	Critical - Values	Observed - Maximum
etanol,%	56,00000	70,72381	84,00000
t,maserasi	14,00000	49,20875	82,00000

etanol,%	t,maserasi	flavonoid, Maserasi
56	48	0,14055
60	24	0,14862
60	72	0,15265
70	14	0,15004
70	48	0,20526
70	48	0,21748
70	82	0,15107
80	24	0,15768
80	72	0,1824
84	48	0,1701

Response Surface Regression: Flavonoid,maserasi2 versus etanol,%, t,maserasi

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for Flavonoid,maserasi2

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0.211304	0.006042	34.975	0.000
etanol,%	0.014173	0.004251	3.334	0.029
t,maserasi	0.005340	0.004276	1.249	0.280
etanol, %*etanol, %	-0.052001	0.007954	-6.538	0.003
t,maserasi*t,maserasi	-0.056864	0.007982	-7.124	0.002
etanol, %*t,maserasi	0.010259	0.008473	1.211	0.293

S = 0.008544 R-Sq = 95.2% R-Sq(adj) = 89.3% CV=5.10%

(Lanjutan)

Analysis of Variance for Flavonoid,maserasi2

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	0.005835	0.005835	0.001167	15.99	0.009
Linear	2	0.000926	0.000926	0.000463	6.34	0.058
Square	2	0.004802	0.004802	0.002401	32.89	0.003
Interaction	1	0.000107	0.000107	0.000107	1.47	0.293
Residual Error	4	0.000292	0.000292	0.000073		
Lack-of-Fit	3	0.000217	0.000217	0.000072	0.97	0.615
Pure Error	1	0.000075	0.000075	0.000075		
Total	9	0.006127				

Estimated Regression Coefficients for Flavonoid,maserasi2 using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-1.20805
etanol,%	0.0371215
t,maserasi	0.00337070
etanol,%*etanol,%	-2.65311E-04
t,maserasi*t,maserasi	-4.91904E-05
etanol,%*t,maserasi	2.15521E-05

Predicted Response for New Design Points Using Model for Flavonoid,maserasi2

Point	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
1	0.145130	0.0067193	(0.126474, 0.163786)	(0.114950, 0.175309)
2	0.147718	0.0067663	(0.128932, 0.166505)	(0.117458, 0.177979)
3	0.144913	0.0067663	(0.126126, 0.163699)	(0.114652, 0.175173)
4	0.149100	0.0067676	(0.130310, 0.167890)	(0.118837, 0.179362)
5	0.211304	0.0060415	(0.194530, 0.228078)	(0.182250, 0.240358)
6	0.211304	0.0060415	(0.194530, 0.228078)	(0.182250, 0.240358)
7	0.159780	0.0067676	(0.140990, 0.178570)	(0.129517, 0.190043)
8	0.157621	0.0067663	(0.138834, 0.176407)	(0.127360, 0.187881)
9	0.175505	0.0067663	(0.156719, 0.194291)	(0.145244, 0.205766)
10	0.173476	0.0067193	(0.154820, 0.192132)	(0.143296, 0.203656)

Critical values; Variable: flavonoid,maserasi (Spreadsheet42) Solution: maximum Predicted value at solution: ,2124711			
	Observed - Minimum	Critical - Values	Observed - Maximum
etanol,%	56,00000	71,99045	84,00000
t,maserasi	14,00000	50,03256	82,00000

(Lanjutan)

DATA REFLUKS

etanol,%	t,refluks	fenol, refluks
56	75	3,29009
60	30	3,28291
60	120	3,56012
70	12	3,30748
70	75	4,29889
70	75	4,19889
70	140	3,30794
80	30	3,54421
80	120	3,59235
84	75	3,45876

Response Surface Regression: Fenol,Refluks versus etanol,%, t,Refluks

The analysis was done using coded units,

Estimated Regression Coefficients for Fenol,Refluks

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	4,25043	0,08855	48,000	0,000
etanol,%	0,09185	0,06234	1,473	0,215
t,Refluks	0,04357	0,06282	0,694	0,526
etanol,%*etanol,%	-0,79458	0,11669	-6,809	0,002
t,Refluks*t,Refluks	-0,86606	0,11719	-7,390	0,002
etanol,%*t,Refluks	-0,11403	0,12470	-0,914	0,412

S = 0,1253 R-Sq = 94,9% R-Sq(adj) = 88,6% CV=3.50%

Analysis of Variance for Fenol,Refluks

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	1,17402	1,17402	0,234805	14,97	0,011
Linear	2	0,04765	0,04160	0,020801	1,33	0,362
Square	2	1,11325	1,11325	0,556625	35,48	0,003
Interaction	1	0,01312	0,01312	0,013118	0,84	0,412
Residual Error	4	0,06275	0,06275	0,015688		
Lack-of-Fit	3	0,05775	0,05775	0,019251	3,85	0,355
Pure Error	1	0,00500	0,00500	0,005000		
Total	9	1,23678				

Estimated Regression Coefficients for Fenol,Refluks using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-18,0234
etanol,%	0,583790
t,Refluks	0,0417279
etanol,%*etanol,%	-0,00405398
t,Refluks*t,Refluks	-2,11440E-04
etanol,%*t,Refluks	-1,27261E-04

(Lanjutan)

Predicted Response for New Design Points Using Model for Fenol,Refluks

Point	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
1	3,36133	0,098459	(3,08796, 3,63470)	(2,91899, 3,80367)
2	3,24216	0,099447	(2,96606, 3,51827)	(2,79812, 3,68620)
3	3,45603	0,098798	(3,18172, 3,73034)	(3,01311, 3,89895)
4	3,34080	0,098316	(3,06783, 3,61377)	(2,89871, 3,78290)
5	4,24954	0,088545	(4,00370, 4,49538)	(3,82366, 4,67542)
6	4,24954	0,088545	(4,00370, 4,49538)	(3,82366, 4,67542)
7	3,42794	0,100467	(3,14900, 3,70688)	(2,98214, 3,87375)
8	3,49045	0,099447	(3,21435, 3,76656)	(3,04641, 3,93449)
9	3,47525	0,098798	(3,20094, 3,74956)	(3,03233, 3,91817)
10	3,54859	0,098459	(3,27522, 3,82195)	(3,10625, 3,99093)

Critical values; Variable: fenol,refluks (Spreadsheet42) Solution: maximum Predicted value at solution: 4,253482

	Observed - Minimum	Critical - Values	Observed - Maximum
etanol,%	56,00000	70,78759	84,0000
t,refluks	12,00000	77,37289	140,0000

etanol,%	t,Refluks	flavonoid,refluks
56	75	0,1588
60	30	0,15185
60	120	0,179
70	12	0,1618
70	75	0,22848
70	75	0,24848
70	140	0,1588
80	30	0,1624
80	120	0,1827
84	75	0,16032

Response Surface Regression: flavonoid,refluks versus etanol,%, t,Refluks

The analysis was done using coded units,

Estimated Regression Coefficients for flavonoid,refluks

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,238804	0,009038	26,424	0,000
etanol,%	0,002842	0,006362	0,447	0,678
t,Refluks	0,006448	0,006411	1,006	0,371
etanol, %*etanol, %	-0,074247	0,011910	-6,234	0,003
t,Refluks*t,Refluks	-0,074027	0,011960	-6,189	0,003
etanol, %*t,Refluks	-0,003410	0,012727	-0,268	0,802

S = 0,01278 R-Sq = 93,3% R-Sq(adj) = 84,9% CV=7,13%

(Lanjutan)

Analysis of Variance for flavonoid,refluks

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	0,009109	0,009109	0,001822	11,15	0,018
Linear	2	0,000257	0,000198	0,000099	0,61	0,589
Square	2	0,008840	0,008840	0,004420	27,05	0,005
Interaction	1	0,000012	0,000012	0,000012	0,07	0,802
Residual Error	4	0,000654	0,000654	0,000163		
Lack-of-Fit	3	0,000454	0,000454	0,000151	0,76	0,667
Pure Error	1	0,000200	0,000200	0,000200		
Total	9	0,009762				

Estimated Regression Coefficients for flavonoid,refluks using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-1,76388
etanol,%	0,0535259
t,Refluks	0,00311423
etanol,%*etanol,%	-3,78812E-04
t,Refluks*t,Refluks	-1,80729E-05
etanol,%*t,Refluks	-3,80556E-06

Predicted Response for New Design Points Using Model for flavonoid,refluks

Point	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
1	0,161543	0,0100488	(0,133643, 0,189443)	(0,116398, 0,206689)
2	0,154266	0,0101496	(0,126086, 0,182445)	(0,108947, 0,199585)
3	0,170012	0,0100834	(0,142016, 0,198008)	(0,124807, 0,215217)
4	0,158329	0,0100342	(0,130470, 0,186189)	(0,113209, 0,203450)
5	0,238686	0,0090369	(0,213595, 0,263776)	(0,195220, 0,282151)
6	0,238686	0,0090369	(0,213595, 0,263776)	(0,195220, 0,282151)
7	0,171226	0,0102537	(0,142757, 0,199695)	(0,125727, 0,216725)
8	0,161827	0,0101496	(0,133647, 0,190006)	(0,116508, 0,207145)
9	0,170723	0,0100834	(0,142727, 0,198719)	(0,125518, 0,215928)
10	0,167334	0,0100488	(0,139434, 0,195233)	(0,122188, 0,212479)

Critical values; Variable: flavonoid,refluks (Spreadsheet42) Solution: maximum Predicted value at solution: ,2389693

	Observed - Minimum	Critical - Values	Observed - Maximum
etanol,%	56,00000	70,25406	84,0000
t,refluks	12,00000	78,76073	140,0000

(Lanjutan)

DATA MICROWAVE

etanol,%	t,microwave	Daya,watt	fenol,microwave	flavonoid,microwave
40	5	360	4,01744	0,254893
40	15	360	4,64478	0,278831
40	30	360	4,32068	0,231237
40	5	480	4,08835	0,264116
40	15	480	4,20149	0,231279
40	30	480	5,5661	0,290876
40	5	600	3,93058	0,236986
40	15	600	4,00011	0,234178
40	30	600	4,58847	0,31739
60	5	360	4,80021	0,288068
60	15	360	5,94707	0,374627
60	30	360	5,28521	0,35603
60	5	480	5,13496	0,325051
60	15	480	5,41362	0,371529
60	30	480	5,5782	0,359097
60	5	600	4,67967	0,31303
60	15	600	5,16907	0,331248
60	30	600	5,92054	0,343876
90	5	360	2,84831	0,214692
90	15	360	2,9722	0,266629
90	30	360	3,23057	0,25276
90	5	480	3,27371	0,25395
90	15	480	3,88568	0,279122
90	30	480	3,94251	0,223991
90	5	600	3,52806	0,230071
90	15	600	3,75442	0,266965
90	30	600	3,72613	0,309887

Response Surface Regression: fenol,microw versus etanol,%, t,microwave, ,,,

The analysis was done using coded units,

Estimated Regression Coefficients for fenol,microwave

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	5,59419	0,16910	33,082	0,000
etanol,%	-0,46248	0,07514	-6,155	0,000
t,microwave	0,31827	0,07514	4,236	0,001

(Lanjutan)

Daya,watt	0,08861	0,07539	1,175	0,256
etanol,%*etanol,%	-1,37143	0,13603	-10,082	0,000
t,microwave*t,microwave	-0,15559	0,13603	-1,144	0,269
Daya,watt*Daya,watt	-0,26699	0,12973	-2,058	0,055
etanol,%*t,microwave	-0,10691	0,09052	-1,181	0,254
etanol,%*Daya,watt	0,21019	0,09113	2,307	0,034
t,microwave*Daya,watt	0,09346	0,09113	1,026	0,319

S = 0,3178 R-Sq = 91,7% R-Sq(adj) = 87,2% CV=7,24%

Analysis of Variance for fenol,microwave

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	18,8656	18,8656	2,09618	20,76	0,000
Linear	3	7,2583	5,8104	1,93681	19,18	0,000
Square	3	10,8231	10,8231	3,60769	35,73	0,000
Interaction	3	0,7843	0,7843	0,26143	2,59	0,087
Residual Error	17	1,7166	1,7166	0,10098		
Total	26	20,5822				

Estimated Regression Coefficients for fenol,microwave using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-5,53067
etanol,%	0,239113
t,microwave	0,0526433
Daya,watt	0,0128928
etanol,%*etanol,%	-0,00219428
t,microwave*t,microwave	-9,95774E-04
Daya,watt*Daya,watt	-1,85406E-05
etanol,%*t,microwave	-3,42100E-04
etanol,%*Daya,watt	7,00649E-05
t,microwave*Daya,watt	6,23058E-05

Predicted Response for New Design Points Using Model for fenol,microwave

Point	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
1	4,05254	0,216483	(3,59580, 4,50928)	(3,24132, 4,86377)
2	4,46728	0,183541	(4,08004, 4,85452)	(3,69305, 5,24151)
3	4,71598	0,225794	(4,23959, 5,19236)	(3,89353, 5,53842)
4	4,10448	0,179993	(3,72473, 4,48424)	(3,33397, 4,87500)
5	4,59399	0,162191	(4,25180, 4,93618)	(3,84128, 5,34670)
6	4,95483	0,185206	(4,56408, 5,34558)	(4,17884, 5,73083)
7	3,62245	0,216483	(3,16571, 4,07919)	(2,81123, 4,43368)
8	4,18673	0,183541	(3,79949, 4,57396)	(3,41250, 4,96096)
9	4,65972	0,225794	(4,18334, 5,13610)	(3,83727, 5,48217)
10	4,91649	0,183541	(4,52926, 5,30373)	(4,14226, 5,69072)
11	5,26281	0,162717	(4,91951, 5,60612)	(4,50960, 6,01603)
12	5,40888	0,189580	(5,00890, 5,80886)	(4,62820, 6,18956)
13	5,13659	0,162191	(4,79440, 5,47878)	(4,38388, 5,88930)
14	5,55768	0,161808	(5,21629, 5,89906)	(4,80533, 6,31002)
15	5,81589	0,162311	(5,47344, 6,15834)	(5,06306, 6,56872)
16	4,82272	0,183541	(4,43548, 5,20995)	(4,04849, 5,59695)
17	5,31857	0,162717	(4,97527, 5,66187)	(4,56535, 6,07179)
18	5,68893	0,189580	(5,28896, 6,08891)	(4,90825, 6,46961)
19	2,92100	0,225794	(2,44462, 3,39738)	(2,09855, 3,74345)
20	3,16469	0,189580	(2,76471, 3,56467)	(2,38401, 3,94537)
21	3,15681	0,235974	(2,65894, 3,65467)	(2,32173, 3,99188)

(Lanjutan)

22	3,39333	0,185206	(3,00258, 3,78408)	(2,61734, 4,16932)
23	3,71178	0,162311	(3,36934, 4,05423)	(2,95896, 4,46461)
24	3,81605	0,191801	(3,41139, 4,22072)	(3,03296, 4,59914)
25	3,33169	0,225794	(2,85531, 3,80807)	(2,50924, 4,15414)
26	3,72491	0,189580	(3,32493, 4,12489)	(2,94423, 4,50559)
27	3,94133	0,235974	(3,44347, 4,43919)	(3,10626, 4,77640)

Critical values; Variable: fenol,microwave (Spreadsheet42) Solution: maximum Predicted value at solution: 5,806969

	Observed - Minimum	Critical - Values	Observed - Maximum
etanol,%	40,0000	60,8496	90,0000
t,microwave	5,0000	30,5710	30,0000
daya,watt	360,0000	495,3639	600,0000

Response Surface Regression: flavonoid,mi versus etanol,%, t,microwave, ...

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for flavonoid,microwave

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0.358319	0.014768	24.263	0.000
etanol,%	-0.002410	0.006562	-0.367	0.718
t,microwave	0.016813	0.006562	2.562	0.020
Daya,watt	0.004703	0.006584	0.714	0.485
etanol,%*etanol,%	-0.085585	0.011880	-7.204	0.000
t,microwave*t,microwave	-0.015259	0.011880	-1.284	0.216
Daya,watt*Daya,watt	-0.005368	0.011330	-0.474	0.642
etanol,%*t,microwave	-0.001378	0.007906	-0.174	0.864
etanol,%*Daya,watt	0.004914	0.007958	0.617	0.545
t,microwave*Daya,watt	0.010742	0.007958	1.350	0.195

S = 0.02775 R-Sq = 78.9% R-Sq(adj) = 67.8% CV=9,73%

Analysis of Variance for flavonoid,microwave

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	0.049098	0.049098	0.005455	7.08	0.000
Linear	3	0.005964	0.005562	0.001854	2.41	0.103
Square	3	0.041414	0.041414	0.013805	17.92	0.000
Interaction	3	0.001720	0.001720	0.000573	0.74	0.540
Residual Error	17	0.013093	0.013093	0.000770		
Total	26	0.062191				

Estimated Regression Coefficients for flavonoid,microwave using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-0.265871
etanol,%	0.0169963
t,microwave	0.00161212
Daya,watt	0.000165264
etanol,%*etanol,%	-1.36937E-04
t,microwave*t,microwave	-9.76564E-05
Daya,watt*Daya,watt	-3.72778E-07

(Lanjutan)

etanol,%*t,microwave -4.40812E-06
etanol,%*Daya,watt 1.63800E-06
t,microwave*Daya,watt 7.16130E-06

Predicted Response for New Design Points Using Model for flavonoid,microwave

Point	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
1	0.247279	0.0189061	(0.207391, 0.287168)	(0.176432, 0.318126)
2	0.267887	0.0160292	(0.234068, 0.301705)	(0.200271, 0.335502)
3	0.262177	0.0197193	(0.220572, 0.303781)	(0.190350, 0.334003)
4	0.241694	0.0157193	(0.208529, 0.274859)	(0.174403, 0.308985)
5	0.270895	0.0141646	(0.241010, 0.300780)	(0.205159, 0.336632)
6	0.278075	0.0161746	(0.243950, 0.312201)	(0.210306, 0.345845)
7	0.225373	0.0189061	(0.185485, 0.265262)	(0.154526, 0.296220)
8	0.263168	0.0160292	(0.229349, 0.296986)	(0.195552, 0.330783)
9	0.283238	0.0197193	(0.241634, 0.324842)	(0.211411, 0.355065)
10	0.324684	0.0160292	(0.290866, 0.358503)	(0.257069, 0.392300)
11	0.344410	0.0142106	(0.314428, 0.374392)	(0.278629, 0.410191)
12	0.337378	0.0165566	(0.302446, 0.372309)	(0.269198, 0.405557)
13	0.323031	0.0141646	(0.293146, 0.352915)	(0.257294, 0.388767)
14	0.351350	0.0141311	(0.321536, 0.381164)	(0.285645, 0.417054)
15	0.357208	0.0141751	(0.327301, 0.387114)	(0.291461, 0.422954)
16	0.310641	0.0160292	(0.276822, 0.344459)	(0.243025, 0.378256)
17	0.347553	0.0142106	(0.317572, 0.377535)	(0.281773, 0.413334)
18	0.366302	0.0165566	(0.331370, 0.401233)	(0.298122, 0.434481)
19	0.235387	0.0197193	(0.193783, 0.276991)	(0.163560, 0.307214)
20	0.253791	0.0165566	(0.218859, 0.288722)	(0.185611, 0.321970)
21	0.244774	0.0206083	(0.201295, 0.288254)	(0.171845, 0.317704)
22	0.239630	0.0161746	(0.205505, 0.273756)	(0.171860, 0.307400)
23	0.266627	0.0141751	(0.236720, 0.296534)	(0.200880, 0.332374)
24	0.270501	0.0167505	(0.235161, 0.305842)	(0.202111, 0.338891)
25	0.233137	0.0197193	(0.191533, 0.274741)	(0.161310, 0.304964)
26	0.268727	0.0165566	(0.233796, 0.303659)	(0.200548, 0.336907)
27	0.285492	0.0206083	(0.242012, 0.328972)	(0.212563, 0.358421)

Critical values; Variable: flavonoid,microwave (Spreadsheet42) Solution: maximum Predicted value at solution: ,3636469			
	Observed - Minimum	Critical - Values	Observed - Maximum
etanol,%	40,0000	64,6615	90,0000
t,microwave	5,0000	24,4242	30,0000
daya,watt	360,0000	520,8992	600,0000

Lampiran 3. Data Pengukuran Zona Hambat

Bahan Uji	Zona Hambat (mm)				
	1	2	3	4	Rataan
EEP	3,5	3,5	3,0	3,0	3,25
Sistem Air-Etilasetat:					
Fraksi etil asetat	3,0	4,0	4,0	3,5	3,63
Fraksi air	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sistem Air-Kloroform:					
Fraksi kloroform	5,0	4,5	4,5	5,0	4,75
Fraksi air	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Blanko (kontrol negatif)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Klorheksidin (kontrol positif)	8,0	6,5	7,0	6,0	6,88

Lampiran 4. Data Karakteristik *Adherence*

Adherence Media (*BHI* + sukrosa 1%)

No	Sampel	Absorbance	Perhitungan
1	Media-1a	0.146	$\% Adherence = [0.146/0.146+0.715+0.034] \times 100\%$ = 16.31
	Media-1b	0.715	
	Media-1c	0.034	
2	Media-2a	0.136	$\% Adherence = [0.136/0.136+0.798+0.030] \times 100\%$ = 14.11
	Media-2b	0.798	
	Media-2c	0.030	
3	Media-3a	0.152	$\% Adherence = [0.152/0.152+0.770+0.042] \times 100\%$ = 15.77
	Media-3b	0.770	
	Media-3c	0.042	
Rataan % <i>adherence</i>			15.40

Adherence Media (*BHI* + sukrosa 1%) + fraksi kloroform (50µg/ml)

No	Sampel	Absorbance	Perhitungan
1	Kloro 50-1a	0.004	$\% Adherence = [0.004/0.004+0.060+0.018] \times 100\%$ = 4.88
	Kloro 50-1b	0.060	
	Kloro 50-1c	0.018	
2	Kloro 50-2a	0.006	$\% Adherence = [0.006/0.006+0.072+0.012] \times 100\%$ = 6,67
	Kloro 50-2b	0.072	
	Kloro 50-2c	0.012	
3	Kloro 50-3a	0.006	$\% Adherence = [0.006/0.006+0.068+0.018] \times 100\%$ = 6,52
	Kloro 50-3b	0.068	
	Kloro 50-3c	0.018	
Rataan % <i>adherence</i>			6.02

(Lanjutan)

Adherence Media (BHI + sukrosa 1%) + pelarut (blanko)

No	Sampel	Absorbance	Perhitungan
1	BL Kloro -1a	0.140	
	BL Kloro -1b	0.730	$\% Adherence = [0.140/0.140+0.730+0.052] \times 100\%$
	BL Kloro -1c	0.052	$= 15,18$
2	BL Kloro -2a	0.126	
	BL Kloro -2b	0.678	$\% Adherence = [0.126/0.126+0.678+0.042] \times 100\%$
	BL Kloro -2c	0.042	$= 14,89$
3	BL Kloro -3a	0.136	
	BL Kloro -3b	0.702	$\% Adherence = [0.136/0.136+0.702+0.048] \times 100\%$
	BL Kloro -3c	0.048	$= 15,35$
	Rataan % <i>adherence</i>		15,14

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

728 formula(e) evaluated with 4 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

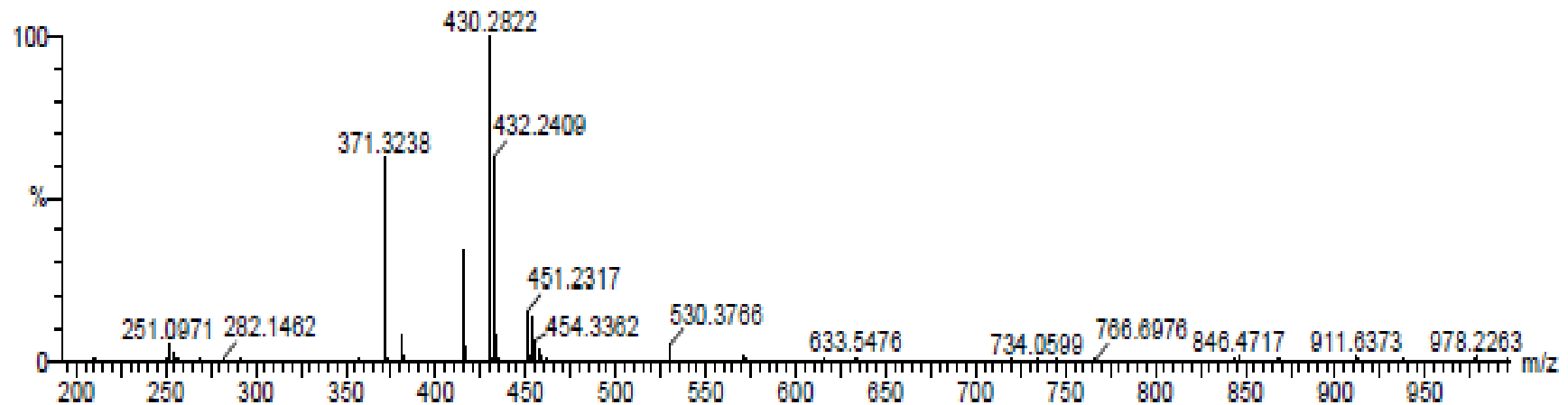
Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-15

Sampel CHL-1

20120808_IPB_CHL 1 -2 55 (2.973) Cm (49:58-(60:115+7:47))

1: TOF MS ES+
1.88e+005



Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

791 formula(e) evaluated with 4 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

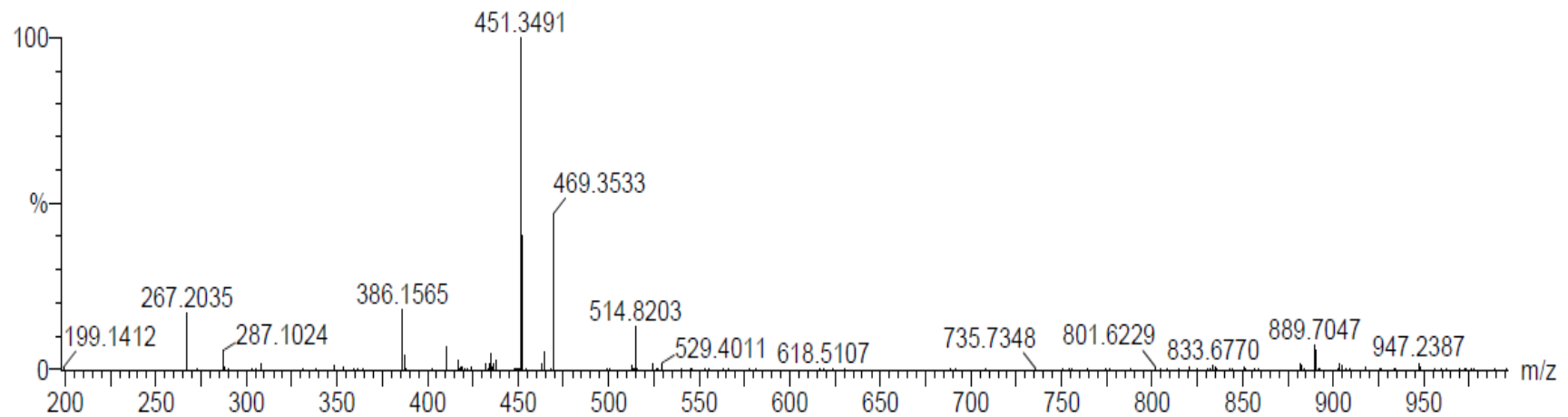
Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-15

Sampel CHL-1

20120608_IPB_CHL 1 -2 143 (7.783) Cm (139:145-(149:223+85:138))

1: TOF MS ES+
7.93e+04



(Lanjutan)

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

712 formula(e) evaluated with 9 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

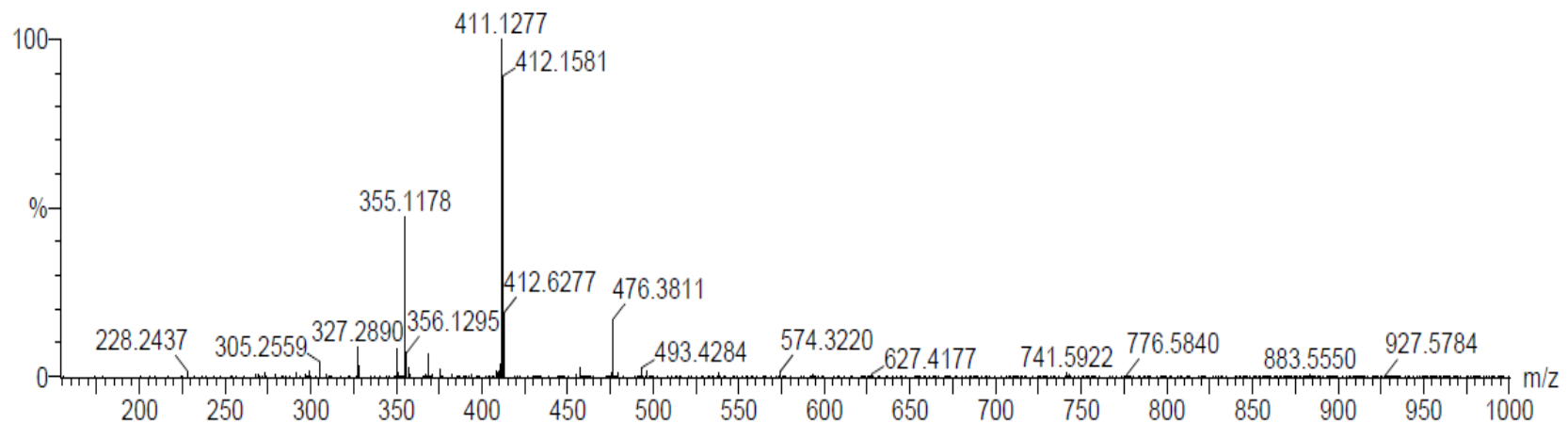
Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-15

Sampel CHL-1

20120608_IPB_CHL 1 -2 151 (8.220) Cm (146:156-(161:185+112:147))

1: TOF MS ES+
3.84e+005



(Lanjutan)

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

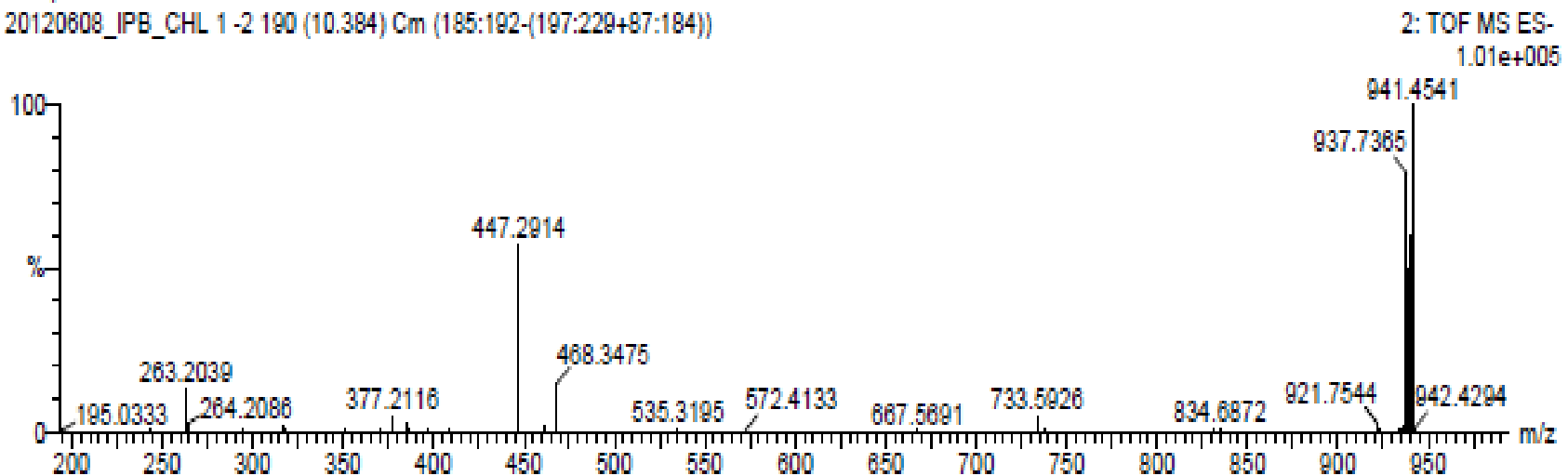
785 formula(e) evaluated with 7 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-15

Sampel CHL-1

20120808_IPB_CHL 1 -2 190 (10.384) Cm (185:192-(197:229+87:184))



(Lanjutan)

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

737 formula(e) evaluated with 9 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

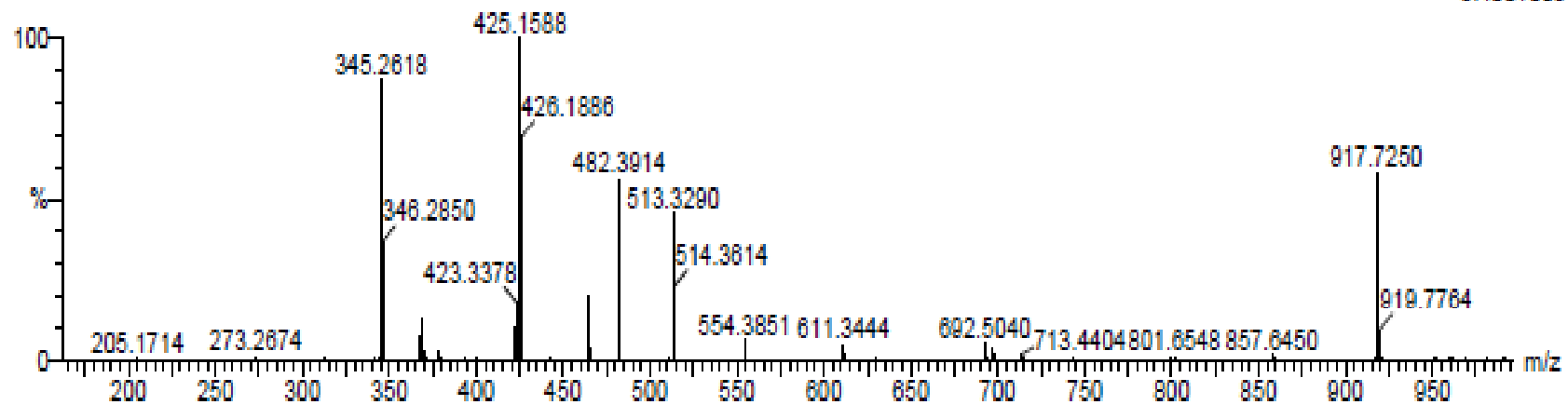
Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-15

Sampel CHL-1

20120608_IPB_CHL 1 -2 257 (14.034) Cm (254:284-(271:352+173:252))

1: TOF MS ES+
3.40e+005



(Lanjutan)

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions

588 formula(e) evaluated with 6 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

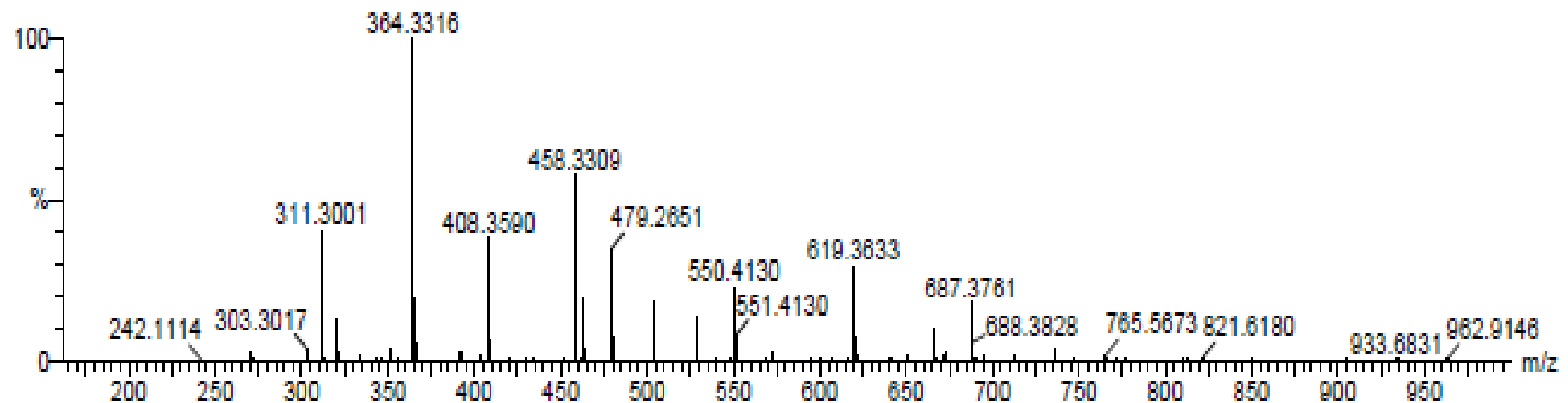
Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-15

Sampel CHL-1

20120608_IPB_CHL 1 -2 283 (15.433) Cm (281:299-(296:380+177:271))

1: TOF MS ES+
3.57e+005



(Lanjutan)

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

717 formula(e) evaluated with 5 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

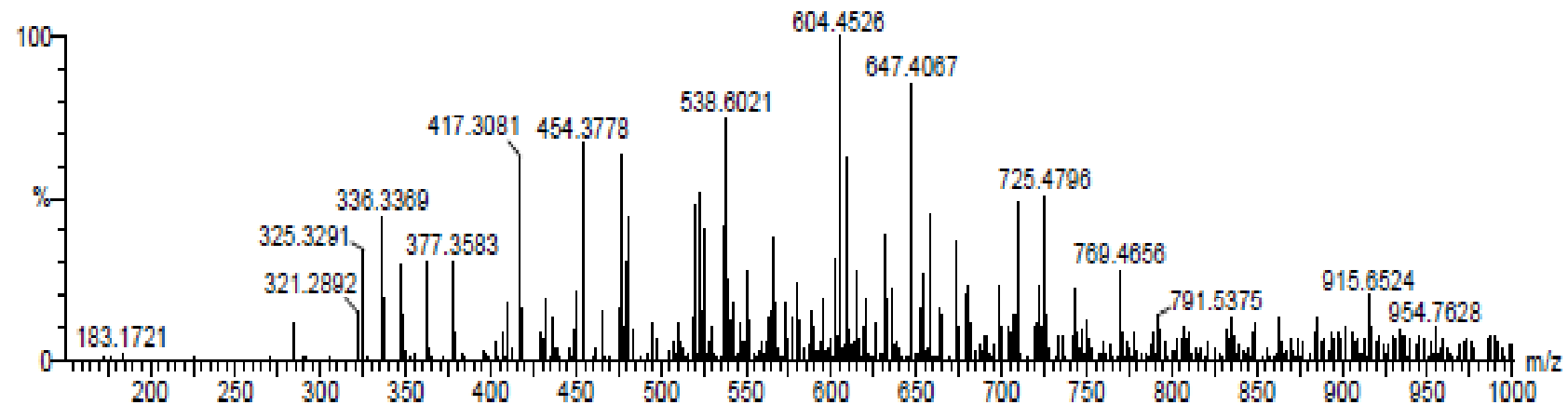
Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-15

Sampel CHL-1

20120608_IPB_CHL 1 -2 300 (16.352) Cm (293:352-(418:538+189:292))

1: TOF MS ES+
8.21e+004



(Lanjutan)

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

1006 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

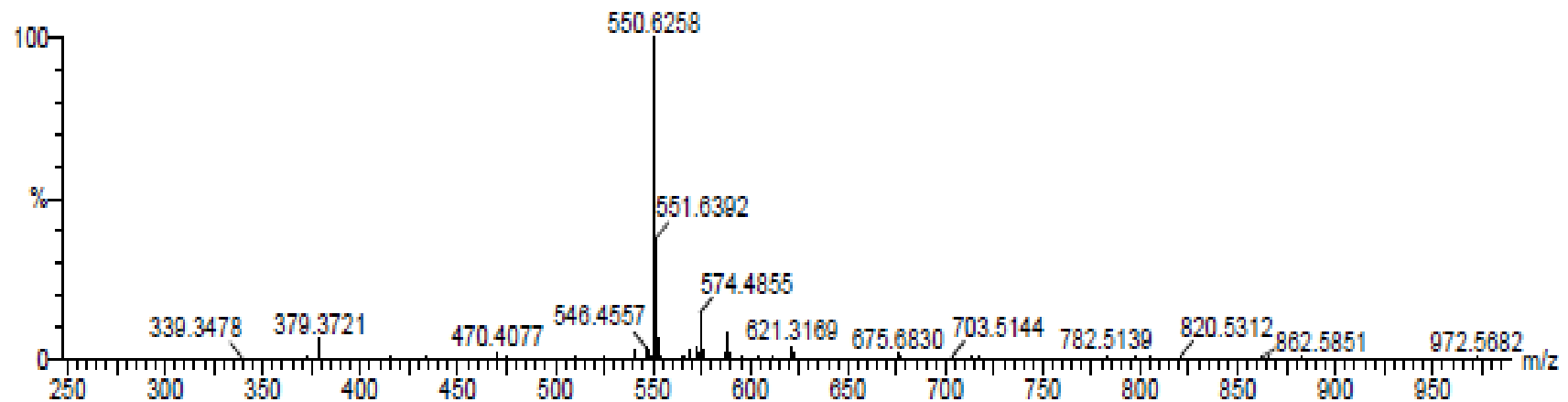
Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-15

Sampel CHL-1

20120808_IPB_CHL 1 -2 383 (19.805) Cm (353:378-(395:520+45:349))

1: TOF MS ES+
5.80e+005



(Lanjutan)

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 mDa / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

678 formula(e) evaluated with 9 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

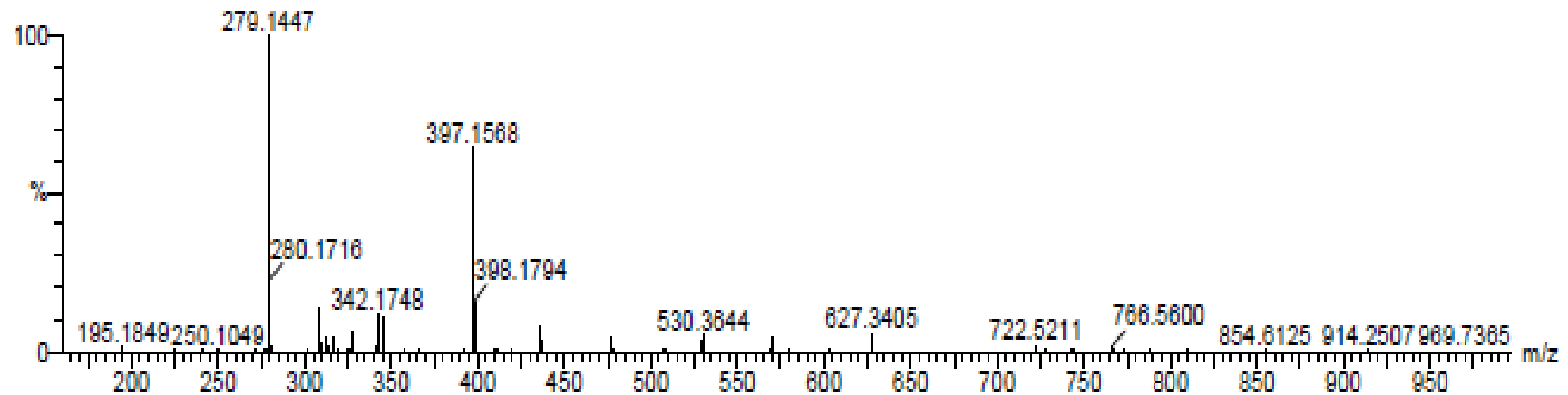
Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-10 O: 0-15

Sampel EEP

20120808_IPB_EEP 396 (21.598) Cm (390:399-(406:446+328:388))

1: TOF MS ES+
2.73e+005



(Lanjutan)

Lampiran 6. Publikasi (Journal of Natural Products, ISSN: 0974-5211)

To: Dr. Sudhanshu Tiwari
Editor-in-Chief
Journal of Natural Products
sudhansh4@rediffmail.com

Dear Sirs,

I am sending herewith a copy of the manuscript, which I would like to submit to Journal of Natural Products (ISSN:0974-5211).

The paper is entitled:

Optimization and comparative study of different extraction methods of biologically active components of Indonesian propolis *Trigona* spp.

by Irene Margeretha, Dewi Fatma Suniarti, Ellyza Herda, and Zainal Alim Mas'ud

Corresponding Author:

Dewi Fatma Suniarti, drg., MS, PhD.

Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry University of Indonesia

Jalan Salemba Raya No.4 Jakarta Pusat 10430, Indonesia

E-mail: dewisuniarti@yahoo.com.

I hereby certify that "The submission has not been previously published nor is it before another journal for consideration; or an explanation has been provided in Comments to the Editor".

I hope your favorable consideration for publication to Journal of Natural Products.

Sincerely,

Dewi Fatma Suniarti

Optimization and comparative study of different extraction methods of biologically active components of Indonesian propolis *Trigona* spp

Irene Margeretha¹, Dewi Fatma Suniarti^{2,*}, Ellyza Herda³, Zainal Alim Mas'ud⁴

¹ Resident Doctoral Program University of Indonesia, e-mail: irenemarg@yahoo.com

^{2,*} Corresponding author, Department of Oral Biology Faculty of Dentistry University of Indonesia, Jalan Salemba Raya No.4 Jakarta Pusat 10430, Indonesia, e-mail: dewisuniarti@yahoo.com

³ Department of Dental Materials University of Indonesia, e-mail: ellyza_herda@yahoo.com

⁴ Department of Chemistry, Bogor Agricultural University, e-mail: zainalalimm@yahoo.com

ABSTRACT

Application of propolis as a medicinal agent is not usually in the form raw material, but it must be purified by extraction with solvents. This extraction process should remove the inert material and preserve the polyphenolic (flavonoid and other phenolic compounds) fraction, which is considered to contribute more to the observed healing effects than the other propolis constituents. The aim of the present study was to compare three methods of extraction: maceration, reflux, and microwave-assisted extraction (MAE), to extract polyphenolic fraction from Indonesian propolis *Trigona* spp. All of the methods were carried out in optimal conditions. Response surface methodology (RSM) was used to optimize the parameters of extraction such as extraction time, the concentration of solvent (ethanol), and microwave power. Total phenolic and flavonoid contents were determined by spectrophotometric method. The results showed that the relationship between the response (flavonoid and total phenolic yields) and the parameters of extraction followed significantly a second order polynomial models ($P < 0.05$). Under optimal conditions, the method of maceration and reflux gave a similar yield, ie about 0.2% and 4% of flavonoid and total phenolic, respectively. The increase of yield was observed in MAE method that was 0.4% and 5.8% of flavonoids and total phenolics, respectively. On the basis of yield, extraction time and solvent consumption, MAE method was more efficient and selective in extracting flavonoid and total phenolic than those of two other methods.

KEYWORDS: Optimization, extraction, polyphenolic fraction, propolis

INTRODUCTION

Propolis is a natural substance collected by bees from various plant sources which have been used since ancient times, such as traditional medicine, bio-cosmetics, and food supplementary material for human health (Bankova et al., 2000; Palombo, 2011). The composition of propolis varies depending on the source, in general, propolis contains 50% resin, 30% wax, 10% essential oils and aromatic, 5% pollen, and 5% other materials (Burdock, 1998; Sforcina, 2007). Propolis has a biological activity with a very broad spectrum, including antimicrobial, antiviral, antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, immunomodulatory, and agents anticaries (Burdock, 1998; Sforcina and Bankova, 2011). Flavonoids and other phenolic derivatives have been considered as the main biologically active compounds in propolis (Burdock, 1998; Ghisalberti, 1979). Banskota et al. (2001) studied Brazilian propolis in order to identify the substances with hepatoprotective activity and those active against *Helicobacter pylori*. They found that these activities were due mainly to phenolic components, but diterpenic acids also contributed to hepatoprotective activity. In a study of Brazilian propolis, it discovered a new antibacterial compounds with the main compounds in the form of phenolic derivatives, such as the 3,5-diprenyl-*p*-coumaric acid, lignans, diterpenic hydroxylated acid, and the other was non-phenolic compounds, such as acid diterpenat with labdane skeleton (Bankova, 2000; Bankova et al., 2000).

The chemical composition (quantitative and qualitative) of propolis plays an important role in its biological activity. Therefore, the extraction methods should be developed not to damage the bioactive compounds, especially flavonoids and other phenolic. The most often utilized solvent is a aqueous solution of alcohol (ethanol or methanol) with various concentrations (Park et al., 1998; Cunha et al., 2004). The 70% ethanol was found to extract most of the active components of propolis but not waxes (Bankova et al., 1992). Because propolis might contain up to 20-30% of wax, this solvent has been applied in many studies. Water has also been used in many occasions; however, it is important to note that in general, water dissolves a small part of propolis constituents, about 10% of its weight, whereas 70% ethanol may dissolve 50–70% of it, depending on the wax amount.

Propolis extracts are prepared by maceration or some cases with Soxhlet extraction. Ultrasonic-assisted extraction appears to give excellent results, spectacularly accelerating the process, while the microwave treatment can cause a decrease in phenolic content due to the oxidation processes (Trusheva et al., 2007). On the basis of this description, it indicated that the need for optimization of extraction process prior to further study the bioactivity of the propolis was required. Response surface methodology (RSM) is a collection of statistical and mathematical techniques, which is effective for the optimization process that is influenced by many factors and their interactions (Myers and Montgomery, 1995). Many reports have been published on the extraction of polyphenols from natural materials using this method (Singh et al., 2011; Bai et al., 2010; Kim et al., 2009). In this study, three extraction methods ie without heating (maceration), with heating (reflux) and microwave (MAE) were evaluated. All of the method was carried out in an optimal conditions to extract of flavonoid and other phenolic substances from propolis *Trigona* spp which are often found in Indonesian forests.

MATERIALS AND METHODS

Raw Materials and Chemicals

Propolis samples collected from the area Pandeglang Banten, West Java province of Indonesia was stored in a plastic container and was kept in a refrigerator (-10 ° C) before used. The following analytical grade chemicals were used: ethanol, sodium bicarbonate, aluminum nitrate, potassium acetate and Folin-Ciocalteu reagent were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Gallic acid and quercetin were obtained from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA).

Maceration extraction

Extraction of propolis was carried out using a method described by Trusheva et al. (2007) with minor modifications. The propolis sample (5g) was extracted with 50 ml of ethanol at a variety of concentrations (55-85% v/v), and was periodically shaken at room temperature for various times (14-82 h). The extract was separated from the residue by centrifugation at 1,500 g for 5 min. The residue was washed with 2 x 10 ml of extracting solution, centrifuged and combined with the initial supernatant. Furthermore, the samples were preserved at 4°C until analysis.

Reflux extraction

Reflux extraction was performed using a method described by Park et al. (1995) and Alencar et al., (2007) with minor modifications. The propolis sample (5g) was added to 50 ml of ethanol 55-85% (v / v). The sample was then refluxed in a water bath (70 ° C) for 10-140 min. The extract was separated from the residue by centrifugation at 1,500 g for 5 min. The residue was washed with 2 x 10 ml of extracting solution, centrifuged and combined with the initial supernatant. Furthermore, the samples were preserved at 4°C until analysis.

Microwave-assisted extraction (MAE)

Microwave-assisted extraction was performed using a method of Trusheva et al. (2007) [13]. About 5g of the propolis sample was added 50 ml of extracting solvent (ethanol 55-85% v / v) in an extraction vessel and was then irradiated with microwaves at different power levels (420 – 600 watts) over different periods of time (5-30 min). The extract is separated from the residue by centrifugation at 1,500 g for 5 min. The residue was washed with 2 x 10 ml of extracting solution, centrifuged and combined with the initial supernatant. Furthermore, the samples were preserved at 4°C until analysis.

Determination of flavonoid content

Flavonoid content in the extracts were determined according to the method used by Park et al. (1995), with some modifications. The sample (0.5 mL aliquot 1/10) was mixed with 4.3 mL of 80% ethanol, 0.1 mL of 10% aluminum nitrate and 0.1 mL of 1M potassium acetate. After 40 min at room temperature, absorbance was measured at 415 nm with a UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-1700 Pharma Spec). The flavonoid content was calculated as quercetin equivalents (gQE / 100 g sample) from a calibration curve.

Determination of total phenolic

Total phenolic content in the extracts of propolis was determined by Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton et al, 1999) by mixing 0.5 mL aliquot (1:25) with 2.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent diluted to 1:10 and 2.0 mL of 4% Na₂CO₃. Absorbance was measured at 740 nm after two hours of incubation in the dark at room temperature. Total phenolics content expressed as gallic acid equivalents (g GAE/100g acid sample).

Experimental design and statistical analysis

Optimization of extraction parameters for maceration and reflux was performed on the basis of response surface methodology with central composite design. The concentration of ethanol as a solvent and extraction time were taken as the variables tested in a 10-run experiment. As shown in Table 1, The two factors chosen for this study were designated as x_1 and x_2 , and were prescribed into five levels, coded with -1.414, -1, 0, +1 and +1.414 from lowest to highest, respectively. The response used to determine the effect of both variables on the extraction process was a total phenolic and flavonoid content of the resulting extract.

In terms of MAE, the optimization of extraction parameters was carried out using a full factorial design involving three independent variables, namely the concentration of ethanol

(x_1), extraction time (x_2), and the power of microwave irradiation (x_3) were tested in a 27-run experiment. These three variables were formulated into three levels, coded with +1, 0, -1 for the highest, intermediate and low value, respectively. The range and level of independent variables in the optimization of the method were presented in Table 2.

All experiments were performed in duplicate and the averages of total phenolic and flavonoid yields were taken as response.

Minitab 14 software was used for design and analysis of experimental data. To predict the optimal point, second-order polynomial models fitted to correlate relationship between independent variables and the response (total phenolic and flavonoid yields) as shown in the following equation

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 \quad (1)$$

where Y was the total phenolic or flavonoid levels and k was the number of variables (k = 2 for maceration and reflux methods, and k = 3 for MAE). The regression coefficients of variables were intercept (b_0), linear (b_i), quadratic (b_{ii}), and interaction between variables i and j (b_{ij}). The independent variables were x_i and x_j ($i \neq j$). The quality of the developed model was determined by the coefficient of determination (R^2), while the statistical significance of the model was evaluated using analysis of variance (ANOVA). Model and the regression coefficient was considered significant if the p-value was less than 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of extraction parameters with RSM

In all three extraction methods the ratio of propolis/solvent used was constant (1:10) refers to Trucheva et al. (2007) which stated that the use of propolis/solvent ratios larger than 1:10 (w/v) was unnecessary, leading only to solvent and energy loss.

Optimization of extraction parameters of maceration

The response values at different experimental combination of variables were presented in Table 3. The range of total phenolic and flavonoid yielded from 3.24% to 4.56% and 0.14% to 0.22%, respectively.

By applying multiple regression analysis on experimental data, the response (total phenolic, Y_1 , and flavonoids, Y_2) and the test variables were related to the following second-order polynomial equation:

$$Y_1 = 4.49 + 0.103x_1 + 0.06x_2 - 1.09x_1^2 - 1.10x_2^2 + 0.26x_1x_2 \quad (2)$$

$$Y_2 = 0.21 + 0.01x_1 + 0.01x_2 - 0.05x_1^2 - 0.06x_2^2 + 0.01x_1x_2 \quad (3)$$

Significance and suitability of the model could be evaluated using analysis of variance (ANOVA) (Fu et al., 2007). ANOVA results (Table 4) showed that the regression model was

significant ($p < 0.05$). The coefficient of determination (R^2) and the adjusted determination coefficient (Adj R^2) for total phenolics were 0.930 and 0.843, respectively and for flavonoid 0.952 and 0.893, which were suggested that there were high degree of correlation between the observed and predicted values. Moreover, a low value of coefficient of the variation ($CV < 10\%$) illustrated that the model was considered to be reproducible. In addition, the value of P for the lack of fit ($P > 0.05$) implied that the model of correlation between variables and the response was significant.

Equation (2) and (3) allowed the prediction of the effects of ethanol concentration and extraction time on total phenolic and flavonoid content in the extract of propolis samples. Visualization of the influence of ethanol concentration and extraction time, presented in the response surface plot (Figure 1), were almost symmetrical shape with circular contours. Plot the response also shows a clear peak, implying the optimum conditions for maximum values of the response associated with the ethanol concentration and extraction time in the design space. This optimal condition could also be demonstrated through the contour plot, which was at the center of the circle contour.

Under this design, the optimum conditions to obtain maximum total phenolic were as followed: ethanol concentration 70.72% and extraction time 49.21 hours with the predicted total phenolic content 4.50%. In the case of optimum parameters to obtain maximum yield of flavonoid were as: ethanol concentration 71.99% and the extraction time 50.03 hours with the predicted flavonoid content 0.21% .

Ethanol concentration and extraction time by maceration method to gave the maximal yield of total phenolics and flavonoid were relatively similar so that the optimal extraction can be performed on the same conditions. Trusheva et al., (2007) has done extracted propolis by maceration with 70% of ethanol for 72 hours, whereas Shouqin et al (2005) have used 70% of ethanol for 7 days. Mărghitas et al., (2007) also have been using 70% of ethanol with extraction time of 24 hours to validate analytical methods for determination of total phenols and flavonoid in romanian propolis. Miguel et al., (2011) has done extracted by maceration with 70% ethanol for 96 hours to identify the antioxidan activity of propolis from Algarve. All of these researchers did not give a description about the conditions used by the optimization process. However, the ethanol concentration used by these researchers was the same and also similar to the optimal solvent conditions were evaluated. In contrast, the optimum extraction time obtained in this study was shorter than the time of extraction carried out by these researchers. From this picture, the optimization of the extraction method needs to be done to get the maximal of bioactive components in order to further exploration of the bioactive component is also optimal, in addition to more efficient extraction process takes place.

Optimization of extraction parameters of reflux

Optimization data of extraction parameters by the reflux method were presented in Table 5. Regression equation that connects the experimental response (total phenolic, Y1, and flavonoids, Y2) with variable test were as followed:

$$Y_1 = 4.25 + 0.09x_1 + 0.04x_2 - 0.79x_1^2 - 0.86x_2^2 - 0.11x_1x_2 \quad (4)$$

$$Y_2 = 0.239 + 0.002x_1 + 0.006x_2 - 0.074x_1^2 - 0.074x_2^2 - 0.003x_1x_2 \quad (5)$$

ANOVA summary, presented in Table 6, indicate that the regression model was significant for the total phenolic and flavonoid ($P < 0.05$). Likewise, the lack of fit ($P > 0.05$) indicates that the model of correlation between variables and the response was significant. The coefficient of determination (R^2) and the adjusted determination coefficient (Adj. R^2) for total phenolics were 0.949 and 0.886, respectively, and for flavonoid were 0.933 and 0.849. There showed a high degree of correlation between the predicted and observed values. In addition, a smaller CV value of 10% implies that the model was considered reproducible.

Evaluation for interaction between variables and determination of optimum value for each variable was described by three-dimensional response surface and contour graphs which were plotted according to equation (4) and (5). It is presented in Figure 2. On the basis of Figure 2, the increase in total phenolic and flavonoid content occur with the increase of ethanol concentration and extraction time until a threshold level achieved and then it decreased again. The optimum conditions of independent variable to obtain the maximum total phenolic yield, were as: the concentration of ethanol 70.79% and the extraction time 77.37 minutes with a phenolic content predicted 4.25%. In the case of optimum parameters to obtain the maximum flavonoid were as: ethanol concentration 70.25% and extraction time 78.76 minutes with the flavonoid content predicted 0.24%. Based on these results, it appears that the extraction conditions to obtain maximum yield of total phenolics and flavonoids were similar.

Various studies on propolis using extraction methods which are stimulated by heat showed that the extraction conditions (ethanol concentration and extraction time) were more varied than maceration. Shouqin et al. (2005) has conducted the extraction of polyphenols from propolis by refluxing with 95% ethanol for 4 hours, whereas the extraction conditions that have been used by Alencar et al. (2007) were 80% ethanol for 30 minutes. As with maceration technique, various studies using heat-assisted extraction technique (reflux) did not highlight that the conditions used have been through the process of optimization.

Optimization of extraction parameters of MAE

Table 7 presents the responses to various combinations of experimental parameters of microwave-assisted extraction. Regression equation that connects the experimental response (total phenolic, Y_1 , and flavonoids, Y_2) with variables test obtained from the optimization process were as followed:

$$Y_1 = 5.59 - 0.46x_1 + 0.32x_2 + 0.09x_3 - 1.37x_1^2 - 0.16x_2^2 - 0.27x_3^2 - 0.11x_1x_2 + 0.21x_1x_3 + 0.09x_2x_3 \quad (6)$$

$$Y_2 = -0.358 - 0.002x_1 + 0.017x_2 + 0.005x_3 - 0.086x_1^2 - 0.015x_2^2 - 0.005x_3^2 - 0.001x_1x_2 + 0.005x_1x_3 + 0.011x_2x_3 \quad (7)$$

ANOVA summary (Table 8) showed that the regression model was significant for the total phenolic and flavonoid ($P < 0.05$). In addition, the predicted and observed values has a high degree of correlation as indicated by the parameter R^2 and Adj. R^2 (total phenolic: $R^2 =$

0.917, Adj. $R^2 = 0.872$ and flavonoid: $R^2 = 0.789$, Adj. $R^2 = 0.872$). In addition, the value of CV <10% illustrates that the obtained models were reproducible.

Visualization of equation (5) and (6) given in the form of three-dimensional response surface and contour graphs, as shown in Figures 3 and 4. Each three-dimensional surface involves two variables and the other variables held constant at zero level.

Unlike the method of extraction by maceration and reflux, the influence of ethanol concentration with MAE had a negative impact on response rates as shown in term x_1 in equation (5) and (6). Dielectric properties of the solvent towards microwave heating play an important role in microwave extraction (Letellier et al., 1999; Kiss et al., 2000). In this case, with increasing concentrations of ethanol will cause a decline in its the dielectric constant, reducing its ability to absorb microwaves and to extract the phenolic components. Two important things that need to be compromised in the solvent mixture, namely the extraction ability and dielectric properties of each individual solvent. Figure 5b and 6b illustrates this compromise is an increase in total phenolic and flavonoid content occurs with increasing concentrations of ethanol up to a certain level and then decreased again.

The optimum parameters obtained for maximum total phenolic, which is the concentration of ethanol 60.85%, extraction time 30.57 minutes, Power 495.4 watts with predicted total phenolic content 5.81%. In the case of optimum parameters to obtain maximum levels of flavonoid, namely the concentration of ethanol 64.66%, extraction time 24.4 min, power 520.9 watts with the predicted flavonoid content of 0.36% .

Comparison of extraction methods

Summary of the three optimal conditions of extraction methods were presented in Table 9. The optimal conditions showed total phenolic and flavonoid yield relatively similar to maceration and reflux techniques, namely 0.2% to 4% for flavonoids and total phenolics. Increase in yield was observed in MAE technique that is 0.4% and 5.8% respectively for total phenolic and flavonoid.

Effect of the extraction time and concentration of ethanol factors for extraction by maceration method on the total phenolic and flavonoid yields were relatively equal. Instead, it appears that both factors influence the differences in the presence of heat stimulation (reflux) and especially microwave irradiation. In addition, the extraction time for the flavonoids in the presence of these was shorter than the extraction of total phenolic which illustrates that the flavonoid fraction was easily degraded / oxidized by thermal effects. This phenomenon was in accordance with the results found by Trucheva et al., (2007). Nevertheless, this phenomenon can be suppressed by working at optimal conditions. Of the three methods tested, MAE method is more effective (based on the extraction yield, extraction time and solvent consumption) in extracting total phenolics and flavonoids than the two other methods. In addition, MAE method also showed high selectivity in extracting flavonoid fraction than the other methods tested..

CONCLUSION

Extraction time, ethanol concentration and microwave power factors were significantly influenced the yield of total phenolic and flavonoid in the propolis sample tested and these factors were related by the second-order polynomial model.

On the basis of yield, extraction time and solvent consumption, MAE method was more efficient in extracting flavonoid and total phenolic than the two other methods. Further MAE method also showed high selectivity (through setting extraction time and ethanol concentration) than the other methods in extracting flavonoid.

By working in optimal conditions, the influence of thermal and microwave irradiation on the oxidation bioactive components of propolis could be controlled.

REFERENCES

- Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., (2007): Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Science Direct*, Elsevier, online at www.sciencedirect.com.
- Bai, X-L., Yue, T-L., Yuan, Y-H., Zhang, H-W., (2010): Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis. *J. Sep. Sci.*, 33: 3751-3758.
- Bankova, V., Christov, R., Stoev, G., Popov, S., (1992): Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 607:150–153
- a. Bankova, V., (2000): Determining quality in propolis samples. *J. Amer. Apitherapy Soc.* 7(2): 1102-1109.
b. Bankova, V.S., De Castro, S.L., Marcucci, M.C., (2000): Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3-15.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S., (2001): Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, 8: 16-23
- Burdock, G.A., (1998): Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis), *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363.
- Cunha, I.B.S., Sawaya, A.C.H.F., Caetano, F.M., Shimizu, M.T., Marcucci, M.C., Drezza, F.T., Povia, G.S., Carvalho, P.O., (2004): Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J. Braz. Chem.Soc.*, 15:964-970
- Ghisalberti, E.L., (1979): Propolis: a review. *Bee world*, 60: 59-84.
- Kim, S-H., Kim, I-H., Kang, B-H., Lee, K-H., Lee, S-H., Lee, D-S, Cho, S.K., Hur, S-S., Kwon, T-K, Lee J-M., (2009): Optimization of ethanol extraction conditions from propolis (a bee product) using response surface methodology. *Korean J. Food Preserv.* 16 (6): 908-914.
- Mărghitas, L., Dezmirean, D., Laslo, L., Moise, A., Popesca, O., Maghear, O., (2007): Validated method for estimation of total flavonoids in Romanian propolis. *Bull. USAMV-CN*, 63-64.
- Miguel, M.G., Nunes, S., Dandlen, S.A., Cavaco, A.M., Antunes, M.D., (2011): Antioxidant activity of propolis from Algarve. *Adv. Environ. Biol.*, 5(2): 345-350
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., Response Surface Methodology (1995): Process and Product in Optimization using Designed Experiments, Wiley, New York

13. Palombo E.A., (2011): Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; Volume 2011, Article ID 680354, 15 pages
14. Park Y.K., Koo, H., Sato, H.H., Contado, J.L., (1995): Survey of some components of propolis which were collected by *Apis mellifera* in Brazil. *Arquivos de biologia e Tecnologia*, 38: 1253-1259
15. Park, Y.K., Ikegaki, M., (1998): Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. *Biosi. Biotech. Biochem.*, 62:2230-2232.
16. Sforcina J.M., (2007): Propolis and the Immune System: a review, *Journal of Ethnopharmacology*. 113: 1-14.
17. Sforcina J.M., Bankova, V., (2011): Propolis: is there a potential for the development of new drugs?, *Journal of Ethnopharmacology* 133:253-260.
18. Shouqin, Z., Jun, X., Changzeng, W., (2005): High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 80: 50-54
19. Singh, A., Sabally, K., Kubow, S., Donnelly, D.J., Garipey, Y., Orsat, V., Raghavan, G.S.V., (2011): Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from potato peels. *Molecules*, 16: 2218-2232.
20. Singleton, V.L, Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*; 299: 152-178.
21. Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V., (2007): Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 7: 1-13.

Table 1. The range and level of independent variables in the optimization of extraction by maceration and reflux methods

Independent variables	Symbol	Level				
		-1.414	-1	0	+1	+1.414
Ethanol concentration, %	x ₁	56	60	70	80	84
Extraction time, h (maceration)	x ₂	14	24	48	72	82
Extraction time, min (reflux)	x ₂	12	30	75	120	140

Table 2. The range and level of independent variables in the optimization of MAE

Independent variables	Symbol	Level		
		-1	0	+1
Ethanol concentration, (%)	x ₁	40	60	90
Extraction time, (min.)	x ₂	5	15	30
Microwave power, (watt)	x ₃	360	480	600

Table 3. Central composite design matrix of extraction parameters by the maceration method and the experimental response.

No.	Ethanol,%, (code)	Extraction time,h,(code)	experimental response	
			Total phenolic,%	Flavonoid, %
1	56 (-1.414)	48 (0)	3.26	0.14
2	60 (-1)	24 (-1)	3.36	0.15
3	60 (-1)	72 (1)	3.83	0.15
4	70 (0)	14 (-1.414)	3.83	0.15
5	70 (0)	48 (0)	4.44	0.21
6	70 (0)	48 (0)	4.56	0.22
7	70 (1.414)	82 (1.414)	3.24	0.15
8	80 (1)	24 (-1)	3.20	0.16
9	80 (1)	72 (1)	3.86	0.18
10	84 (-1.414)	48 (0)	3.36	0.17

Tabel 4 ANOVA for response surface second-order polynomial model of maceration method

Response	Sources	Adj. Sum of Squares	Degree of Freedom	Adj. Mean Squares	F	P _{value}
Total	Regression	2.0573	5	0.4115	10.69	0.020
Phenolic	Linear	0.0600	2	0.0300	0.78	0.518
	Square	1.9292	2	0.9646	25.06	0.005
	Interaction	0.0681	1	0.0681	1.77	0.254
	Residual Error	0.1540	4	0.0385		
	Lack-of-Fit	0.1474	3	0.0491	7.43	0.262
	Pure Error	0.0066	1	0.0066		
	Total		2.2113	9		
Flavonoid	Regression	0.0058	5	0.0012	15.99	0.009
	Linear	0.0009	2	0.0005	6.34	0.058
	Square	0.0048	2	0.0024	32.89	0.003
	Interaction	0.0001	1	0.0001	1.47	0.293
	Residual Error	0.0003	4	0.0001		
	Lack-of-Fit	0.0002	3	0.0001	0.97	0.615
	Pure Error	0.0001	1	0.0001		
Total		0.0061	9			

Total phenolic: $R^2 = 0.930$, $Adj.R^2 = 0.843$, $CV = 5.42\%$

Flavonoid : $R^2 = 0.952$, $Adj.R^2 = 0.893$, $CV = 5.10\%$

Tabel 5. Central composite design matrix of extraction parameters by the reflux method and the experimental response.

No	Ethanol,%, (code)	Extraction time,min.,(code)	Experimental response	
			Total phenolic,%	Flavonoid, %
1	56 (-1.414)	75 (0)	3.29	0.16
2	60 (-1)	30 (-1)	3.28	0.15
3	60 (-1)	120 (1)	3.56	0.18
4	70 (0)	12 (-1.414)	3.31	0.16
5	70 (0)	75 (0)	4.30	0.23
6	70 (0)	75 (0)	4.20	0.25
7	70 (1.414)	140 (1.414)	3.31	0.16
8	80 (1)	30 (-1)	3.54	0.16
9	80 (1)	120 (1)	3.59	0.18
10	84 (-1.414)	75 (0)	3.46	0.16

Tabel 6. ANOVA for response surface second-order polynomial model of maceration method

Response	Sources	Adj. Sum of Squares	Degree of Freedom	Adj. Mean Squares	F	P _{value}
Total	Regression	1.1740	5	0.2348	14.97	0.020
Phenolic	Linear	0.0416	2	0.0208	1.33	0.518
	Square	1.1132	2	0.5566	35.48	0.005
	Interaction	0.0131	1	0.0131	0.84	0.254
	Residual Error	0.0627	4	0.0157		
	Lack-of-Fit	0.0577	3	0.0192	3.85	0.355
	Pure Error	0.0050	1	0.0050		
	Total		1.2368	9		
Flavonoid	Regression	0.0091	5	0.0018	11.15	0.018
	Linear	0.0002	2	0.0001	0.61	0.589
	Square	0.0088	2	0.0044	27.05	0.005
	Interaction	0.0001	1	0.0000	0.07	0.802
	Residual Error	0.0006	4	0.0002		
	Lack-of-Fit	0.0004	3	0.0001	0.76	0.667
	Pure Error	0.0002	1	0.0002		
Total		0.0098	9			

Total phenolic: $R^2 = 0.949$, $Adj.R^2 = 0.886$, $CV = 3.50\%$

Flavonoid : $R^2 = 0.933$, $Adj.R^2 = 0.849$, $CV = 7.13\%$

Table 7. Full Factorial design matrix of MAE and the experimental response

No	Ethanol,%, (code)	Time,min, (code)	Power, watt, (code)	experimental response	
				Total phenolic, %	Flavonoid, %
1	40 (-1)	5 (-1)	360 (-1)	4.02	0.25
2	40 (-1)	15 (0)	360 (-1)	4.64	0.28
3	40 (-1)	30 (1)	360 (-1)	4.32	0.23
4	40 (-1)	5 (-1)	480 (-1)	4.09	0.26
5	40 (-1)	15 (0)	480 (-1)	4.20	0.23
6	40 (-1)	30 (1)	480 (-1)	5.57	0.29
7	40 (-1)	5 (-1)	600 (1)	3.93	0.24
8	40 (-1)	15 (0)	600 (1)	4.00	0.23
9	40 (-1)	30 (1)	600 (1)	4.59	0.32
10	60 (0)	5 (-1)	360 (-1)	4.80	0.29
11	60 (0)	15 (0)	360 (-1)	5.95	0.37
12	60 (0)	30 (1)	360 (-1)	5.29	0.36
13	60 (0)	5 (-1)	480 (-1)	5.13	0.33
14	60 (0)	15 (0)	480 (-1)	5.41	0.37
15	60 (0)	30 (1)	480 (-1)	5.58	0.36
16	60 (0)	5 (-1)	600 (1)	4.68	0.31
17	60 (0)	15 (0)	600 (1)	5.17	0.33
18	60 (0)	30 (1)	600 (1)	5.92	0.34
19	90 (1)	5 (-1)	360 (-1)	2.85	0.21
20	90 (1)	15 (0)	360 (-1)	2.97	0.27
21	90 (1)	30 (1)	360 (-1)	3.23	0.25
22	90 (1)	5 (-1)	480 (-1)	3.27	0.25
23	90 (1)	15 (0)	480 (-1)	3.89	0.28
24	90 (1)	30 (1)	480 (-1)	3.94	0.22
25	90 (1)	5 (-1)	600 (1)	3.52	0.23
26	90 (1)	15 (0)	600 (1)	3.75	0.27
27	90 (1)	30 (1)	600 (1)	3.73	0.31

Tabel 8. ANOVA for response surface second-order polynomial model of MAE

Response	Sources	Adj. Sum of Squares	Degree of Freedom	Adj. Mean Squares	F	P _{value}
Total	Regression	18.8656	9	2.0962	20.76	0.000
Phenolic	Linear	5.8104	3	1.9368	19.18	0.000
	Square	10.8231	3	3.6077	35.73	0.000
	Interaction	0.7843	3	0.2614	2.59	0.087
	Residual Error	1.7166	17	0.1010		
	Total	20.5822	26			
Flavonoid	Regression	0.0491	9	0.0055	7.08	0.000
	Linear	0.0056	3	0.0018	2.41	0.103
	Square	0.0414	3	0.0138	17.92	0.000
	Interaction	0.0017	3	0.0006	0.74	0.540
	Residual Error	0.0131	17	0.0008		
	Total	0.0622	26			

Total phenolic: $R^2 = 0.917$, $Adj.R^2 = 0.872$, $CV = 7.24\%$

Flavonoid : $R^2 = 0.789$, $Adj.R^2 = 0.678$, $CV = 9.73\%$

Table 9. Summary of the total phenolic and flavonoid levels in the optimal conditions of maceration, reflux and MAE

Method	Extraction time		Ethanol conc., %		Power, watt		Flav., (%)	TP, (%)
	Flav.	TP	Flav.	TP	Flav.	TP		
Maceration	50,03 h	49,21 h	71,99	70,72	-	-	0,21	4,50
Reflux	78,76 m	77,37 m	70,25	70,79	-	-	0,24	4,25
MAE	24,42 m	30,57 m	64,66	60,85	520,9	495,4	0,38	5,81

Flav : flavonoid, TP: total phenolic, h: hour, m: minute

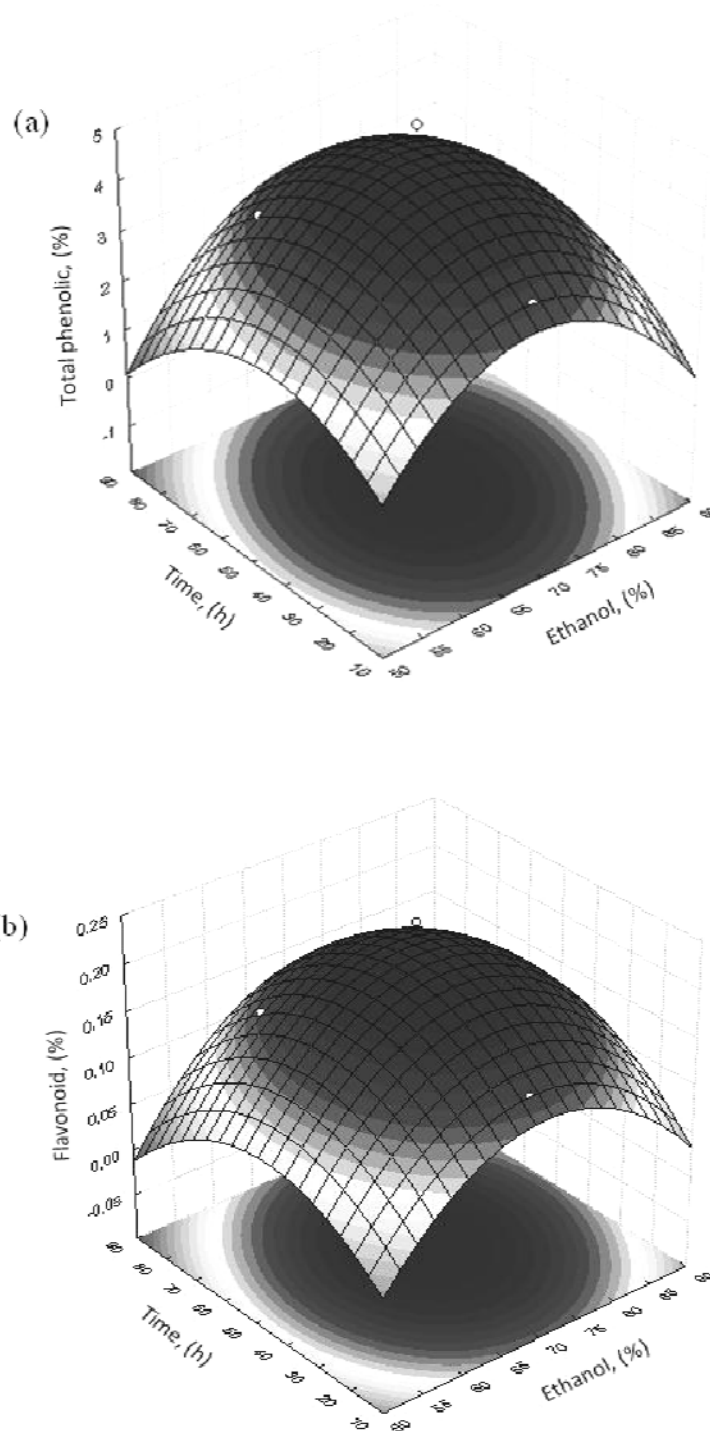


Figure 1. Response surface and contour plots for the effect of independent variables on the total phenolic yield (a) and flavonoid yield (b) by the method of maceration

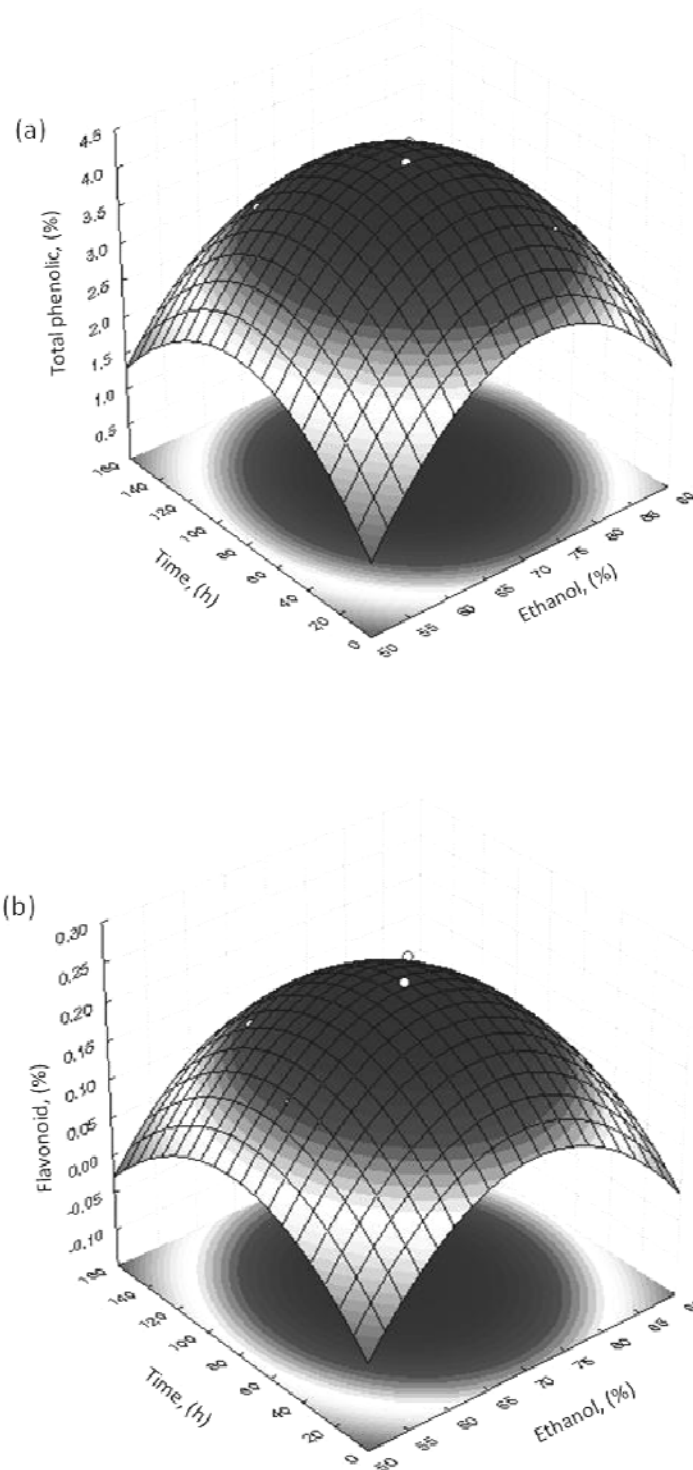


Figure 2. Response surface and contour plots of the effect of independent variables of the total phenolic (a) and flavonoid (b) by the reflux method

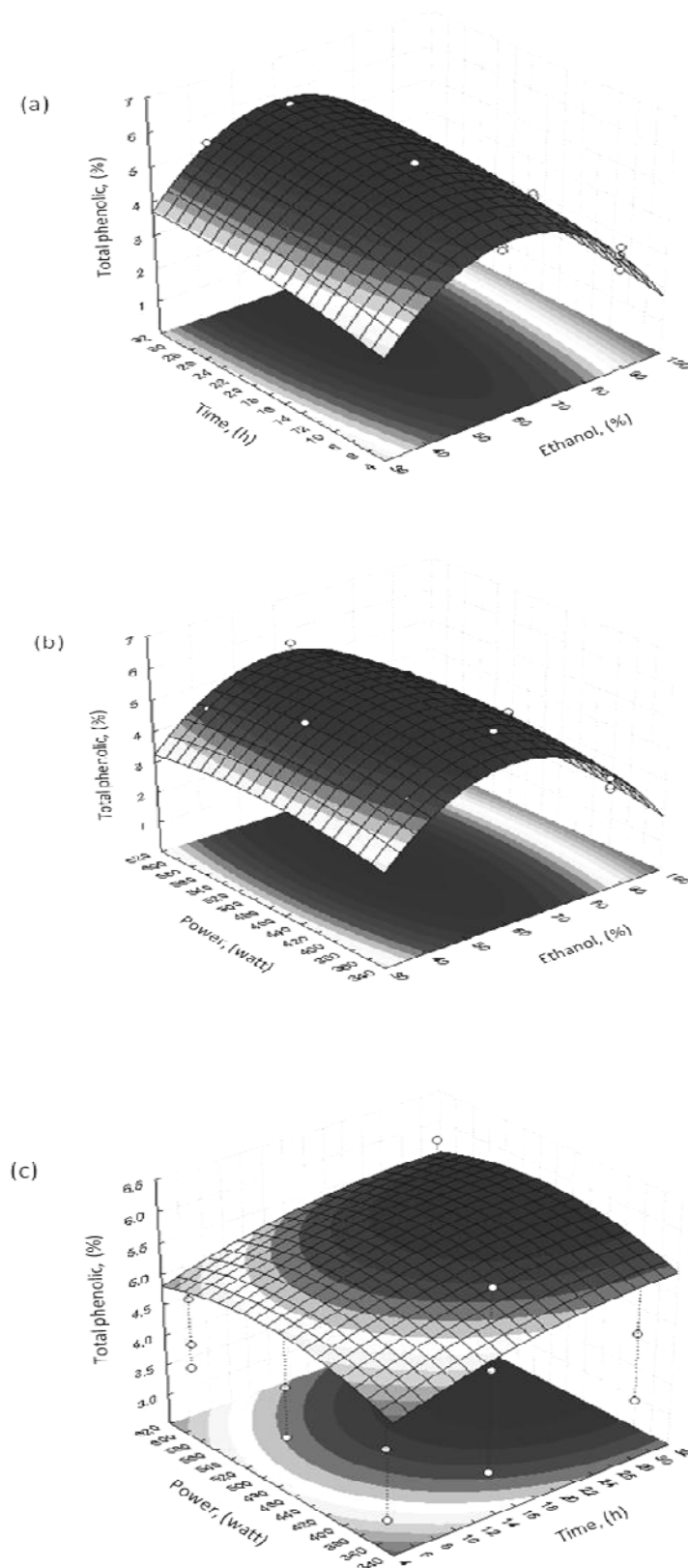


Figure 3. Response surface and contour plots for the effect of independent variables on the total phenolic yield

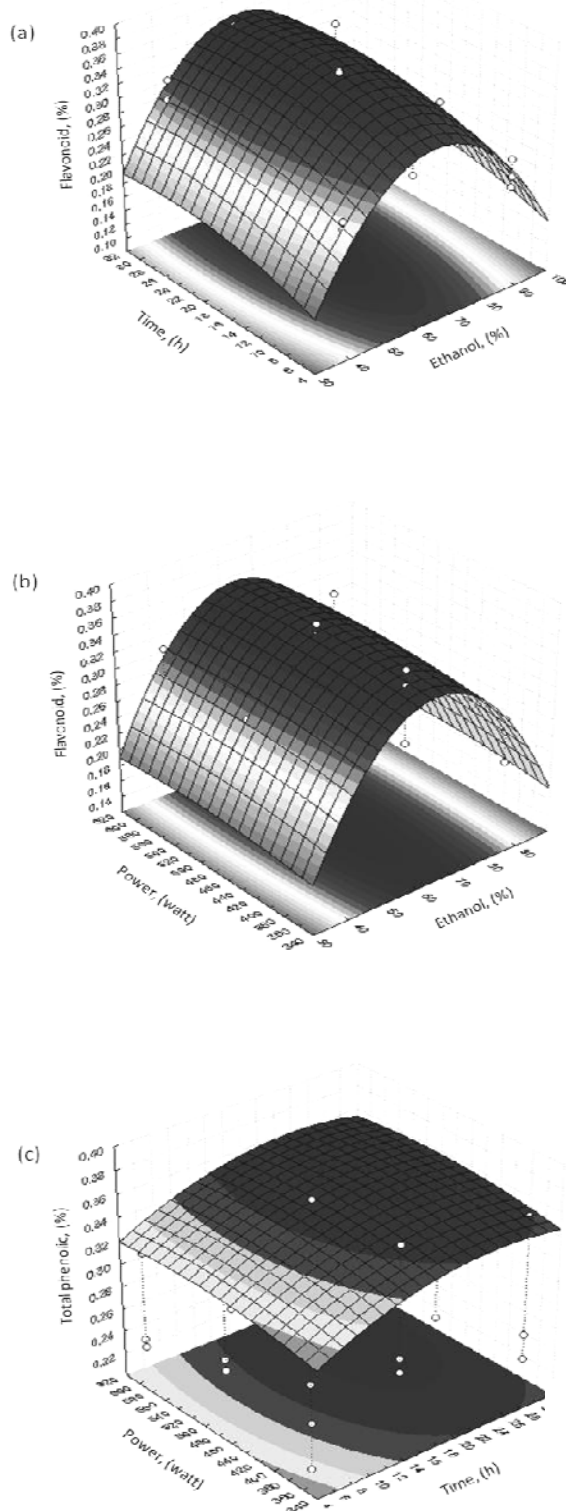


Figure 4. Response surface and contour plots for the effect of independent variables on the flavonoid yield