

Research Report

Penentuan konsentrasi hambat minimal (KHM) dan konsentrasi bunuh minimal (KBM) ekstrak Propolis terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis*

(The determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal Bactericidal concentration (MBC) against biofilm of *Porphyromonas gingivalis*)

Maria Istiqomah Marini¹, Dian Agustin W², Febriastuti Cahyani³

¹Mahasiswa Program Sarjana Kedokteran Gigi

²Staff pengajar Departemen Konservasi

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
Surabaya - Indonesia

ABSTRACT

Background: *Porphyromonas gingivalis* become one gram negative bacteria found in endodontic infections. *Porphyromonas gingivalis* is a persistent microorganisms that can cause failure of root canal treatment, because the bacteria can form biofilms that are more resistant microorganisms defense against antibiotics and the immune response. Back to nature, there is alternative material, one of them is propolis. Propolis active compounds like flavonoids, essential oils, terpenoids, saponins, and propolis ethanolic extracts are significant to exhibited antimicrobial activity. Propolis antimicrobial effects is directly proportional to its concentration. **Purpose:** The aim of this study is to know the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of propolis extract against biofilm of *Porphyromonas gingivalis*. **Method:** This study was an in-vitro experimental research laboratory with the post test only control group design. Propolis extracted by ethanol 70% on maceration method and dilute into several concentrations. Value of MIC and MBC were done by counting the biofilm bacteria colony in Tryptic Soy Agar (TSA) with Drop Plate Miles Misra method. Growth of bacteria colonies is calculated manually in colony forming unit (CFU)/ml. **Result:** There was no effect from the smallest concentration to the biggest concentration of propolis extract against biofilm of *Porphyromonas gingivalis*. **Conclusion:** There wasn't MIC and MBC of propolis extract to the biofilm of *Porphyromonas gingivalis*.

Key words: Propolis extract, Biofilm, *Porphyromonas gingivalis*, MIC, MBC

Korespondensi (correspondence): Maria Istiqomah Marini, Bagian Konservasi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: mariaistiqomahmarini@yahoo.com

PENDAHULUAN

Ada dua penyakit gigi dan mulut yang mempunyai prevalensi cukup tinggi di Indonesia yaitu karies dan penyakit periodontal.¹ Karies gigi adalah penyakit infeksi akibat bakteri pada biofilm yang

dominan dalam lingkungan patologis rongga mulut.²

Karies gigi merupakan salah satu penyebab utama terjadinya penyakit pulpa dan periapikal. Jika gigi dengan karies superfisial tidak dirawat, maka kerusakan akan terus berlanjut dari enamel ke dentin. Selanjutnya, perluasan dari karies dentin

akan masuk ke dalam ruang pulpa. Jaringan pulpa tersebut dapat mengalami kerusakan secara menyeluruh dan mengakibatkan pulpa menjadi nekrosis atau mati.³ Setelah nekrosis pulpa, cepat atau lambat, pintu masuk saluran akar akan menjadi terinfeksi.⁴ *Porphyromonas gingivalis* merupakan salah satu bakteri gram negatif yang terdapat dalam infeksi endodontik. *Porphyromonas gingivalis* ditemukan 30% pada gigi dengan infeksi saluran akar primer yang mempunyai sejumlah besar penentu virulensi termasuk *fimbriae*, *haemagglutinin*, kapsul, *outer membrane vesicles*, enzim hidrolitik yang sangat kuat dan kompleks *lipopolysaccharide* (LPS).⁵ *Porphyromonas gingivalis* merupakan mikroorganisme persisten yang dapat menyebabkan kegagalan perawatan saluran akar, karena bakteri tersebut dapat membentuk biofilm yang merupakan pertahanan mikroorganisme yang lebih resisten terhadap antibiotik dan respon imun.⁶

Eliminasi mikroorganisme dalam saluran akar telah menjadi prinsip utama dalam perawatan endodontik.⁷ Perawatan endodontik dapat dibagi dalam tiga fase (*triad endodontics*) yaitu: preparasi biomekanis saluran akar (pembersihan dan pembentukan), sterilisasi dan obturasi. Pada tahap preparasi diperlukan bahan irigasi saluran akar.⁸

Tindakan irigasi dilakukan selama dan sesudah pembersihan dan pembentukan saluran akar, dengan tujuan untuk menghilangkan kotoran fragmen jaringan pulpa dan serpihan dentin yang menumpuk.⁹ Bahan irigasi yang sering digunakan adalah *sodium hypochlorite* (NaOCl), *chlorhexidine*, *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), dan campuran dari *tetracycline*, asam dan detergen (MTAD).¹⁰ Beberapa larutan irigasi menunjukkan aktivitas anti mikroba dengan secara aktif membunuh bakteri dan jamur ketika kontak secara langsung dengan mikroorganisme, tetapi beberapa

bahan irigasi menunjukkan aktivitas sitotoksik dan dapat menyebabkan reaksi sakit yang parah jika bahan irigasi tersebut masuk ke dalam jaringan periapikal.⁹

Istilah kembali ke alam pun kemudian sering terdengar seiring dengan upaya pemanfaatan bahan alami dengan khasiat obat termasuk yang berkhasiat sebagai antibakteri dan antibiofilm.¹ Selain itu, pemanfaatan bahan alam yang digunakan sebagai obat jarang menimbulkan efek samping yang merugikan dibandingkan obat yang terbuat dari bahan sintesis.¹¹

Propolis merupakan produk alam campuran dari resin dan lilin lebah yang dikumpulkan dari bagian penting tumbuhan, khususnya bunga dan tunas daun oleh lebah perkerja. Riset ilmiah telah mengungkapkan bahwa propolis mempunyai efek spektrum yang luas yang termasuk sifat antioksidan, antibakteri, anti fungi, anti virus, dan anti inflamasi.¹¹ Antibakteri propolis terhadap beberapa patogen anaerob mulut tertentu dan ditemukan sangat efektif terhadap *Peptostreptococcus anaerobius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* dan *Veillonella parvula*.¹²

Pada penelitian sebelumnya tentang ekstrak propolis Lawang terhadap *Fusobacterium nucleatum*, telah diperoleh bahwa KHM dengan konsentrasi 1,48% dan KBM dengan konsentrasi 1,54%.¹³ Ekstrak *Brazilian Green Propolis* terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* memiliki KHM 0,03% dan KBM 0,2%.¹⁴ Sampai saat ini belum ada penelitian tentang KHM dan KBM ekstrak propolis terhadap biofilm *Porphyromonas gingivalis*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang berapa KHM dan KBM ekstrak propolis terhadap biofilm *Porphyromonas gingivalis*. Sehingga nantinya ekstrak

propolis dapat digunakan sebagai bahan alternatif untuk irigasi saluran akar.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di RSPTI Universitas Airlangga pada bulan Mei tahun 2013. Jenis penelitian adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *The Post Test-Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan Ekstrak propolis *Apis mellifera* dari perkebunan di Batu Kabupaten Malang yang diekstrak dengan metode maserasi dan menggunakan pelarut etanol 70%. Biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 adalah hasil biakan bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 pada media *Tryptic Soy Broth* (TSB) pada *microtiter plate*. Pengecekan terbentuknya biofilm dapat dilakukan dengan menggunakan simple staining dengan Crystal Violet pada fase pertumbuhan logaritme.

Bahan coba ekstrak propolis yang dipakai terdiri dari konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56% dan 0,78% diambil masing-masing sebanyak 1 bagian (100 µl) lalu dimasukkan ke dalam *microtiter plate* dengan suspensi biofilm yang telah dipersiapkan sebelumnya sebanyak 1 bagian (100 µl) kemudian diberi label sesuai konsentrasi. Selanjutnya *microtiter plate* tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diamati kekeruhan yang terjadi dengan membandingkan suspensi biofilm yang telah diberi perlakuan tersebut dengan kontrol. Penentuan KHM dan KBM dilakukan pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56% dan 0,78% sehingga semua kelompok larutan dilanjutkan dengan perhitungan jumlah koloni metode *Drop Plate Miles Misra*. Bahan coba dengan konsentrasi diatas diambil 50 µl untuk setiap konsentrasi, kemudian ditetaskan pada *Tryptic Soy Agar* (TSA) sebanyak 3 replikasi. Spesimen

diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri. Satuan yang dipakai adalah CFU (*Colony Forming Unit*) / ml cairan (suspensi).

HASIL

Berdasarkan hasil pengamatan dan penghitungan jumlah koloni biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis* untuk menentukan konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang terbagi atas kelompok control dan perlakuan, didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 1: Hasil Pengujian Ekstrak Propolis terhadap Biofilm Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Kelompok perlakuan	N	x	x
		Jumlah koloni (CFU/ml)	Jumlah koloni (%)
Kontrol (+)	3	2,96.10 ⁵	100
Kontrol (-)	3	0	0
Konsentrasi 0,781%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 1,562%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 3,125%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 6,25%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 12,5%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 25%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 50%	3	TBUD	TBUD
Konsentrasi 100%	3	TBUD	TBUD

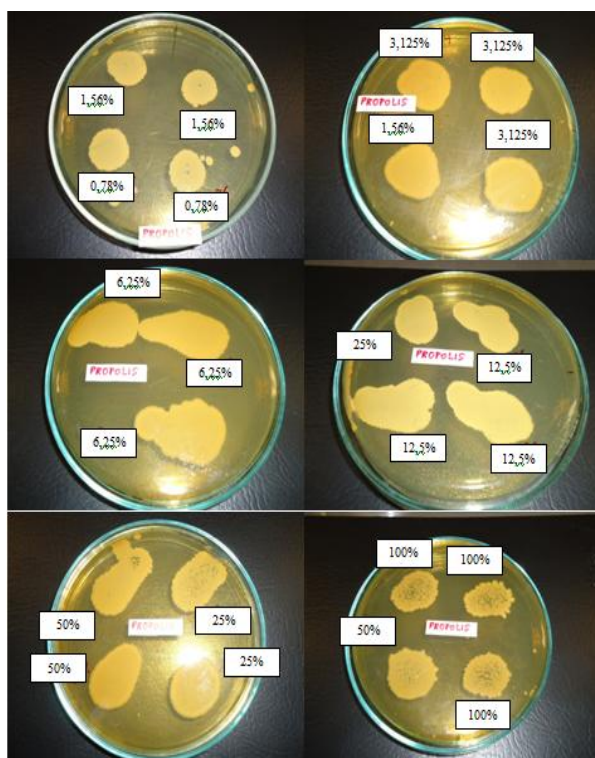
Keterangan:

Kontrol (+) = media cair TSB yang berisi biofilm bakteri tanpa penambahan ekstrak propolis

Kontrol (-) = ekstrak ditanam sebelum dikontakkan dengan kuman

TBUD = tidak bisa untuk dihitung (jumlah koloni > 300)

Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya pengaruh ekstrak propolis mulai dari konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56% dan 0,78% terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Hasil hitung koloni pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) sebanyak 3 replikasi menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang terkecil yaitu 0,89% sampai dengan konsentrasi yang terbesar yaitu 100% tidak ada pengaruh terhadap pertumbuhan biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang ditunjukkan oleh hasil perhitungan koloni bahwa tidak bisa untuk dihitung (TBUD) (Tabel 1).



Gambar 1: Hasil *Drop Plate Miles Misra* pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) sebanyak 3 replikasi pada konsentrasi terkecil 0,78% sampai dengan konsentrasi terbesar yaitu 100% juga menunjukkan tidak ada pengaruh terhadap pertumbuhan biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

PEMBAHASAN

Saluran akar dan jaringan periapikal yang mengalami infeksi merupakan media yang mendukung bagi bakteri untuk berkoloni menjadi struktur biofilm. *Porphyromonas gingivalis* menjadi salah satu bakteri gram negatif yang terdapat dalam infeksi endodontic.¹⁵ *Porphyromonas gingivalis* merupakan mikroorganisme persisten yang dapat menyebabkan kegagalan perawatan saluran akar.⁶ Bakteri *Porphyromonas gingivalis* juga dapat ditemukan dalam biofilm yang mengakibatkan penyakit gigi dan mulut.¹⁵ Biofilm merupakan suatu agregat mikroba sejenis atau berbeda jenis yang berkoloni maupun melekat pada permukaan solid, dengan perantara suatu matriks lipopolisakarida (LPS).¹⁶

Eliminasi mikroorganisme dalam saluran akar telah menjadi prinsip utama dalam perawatan endodontic.⁷ Perawatan endodontic dapat dibagi dalam tiga fase (*triad endodontics*) yaitu: preparasi biomekanis saluran akar (pembersihan dan pembentukan), sterilisasi dan obturasi. Pada tahap preparasi diperlukan bahan irigasi saluran akar.⁸ Tindakan irigasi adalah salah satu kunci keberhasilan dalam perawatan endodontic.¹⁷

Riset ilmiah telah mengungkapkan bahwa propolis mempunyai efek spektrum yang luas yang termasuk sifat antioksidan, antibakteri, anti fungi, anti virus, dan anti inflamasi.¹¹ Daya antibakteri ekstrak propolis dapat diketahui dengan melakukan penelitian laboratoris untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Berdasarkan informasi tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui KHM dan KBM ekstrak propolis terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Penentuan KHM dan KBM ekstrak propolis terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis* dilakukan pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56% dan 0,78%, kemudian semua

kelompok larutan dilanjutkan perhitungan jumlah koloni dengan metode *Drop Plate Miles Misra*.

Pada hasil penelitian menunjukkan bahwa ternyata ekstrak propolis tidak memiliki daya antibakteri terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Hal ini ditunjukkan melalui hasil hitung koloni mulai dari konsentrasi ekstrak yang terkecil yaitu 0,78% sampai dengan konsentrasi yang terbesar yaitu 100% yang dinyatakan tidak bisa untuk dihitung (TBUD). Hasil perhitungan koloni TBUD karena jumlah koloni lebih dari 300 pada *plate* yang akan cenderung menghasilkan koloni terlalu dekat satu sama lain yang harus dibedakan sebagai unit pembentuk koloni (CFU). Asumsinya adalah bahwa setiap sel bakteri terpisah dari sel bakteri yang lainnya dan akan berkembang menjadi koloni tunggal terpisah (CFU). *Plate* dengan lebih dari 300 CFU sangat sulit untuk dihitung.¹⁸

Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya daya antibakteri ekstrak propolis terhadap biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis* terjadi kemungkinan karena ekstrak propolis tersebut memiliki komposisi atau senyawa aktif yang tidak mampu untuk menembus dinding biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Hasil uji senyawa aktif pada ekstrak propolis yang digunakan pada penelitian ini menyatakan bahwa senyawa tt-farnesol terpenoid 1,69%, apigenin 0,32%, flavonoid 5,06% dan saponin 2,21%. Tt-farnesol memiliki sifat hidrofobik yang dapat menyebabkan gangguan membran biofilm, jika konsentrasi tt-farnesol terlalu sedikit, maka kemungkinan tidak dapat menyebabkan gangguan membran biofilm, sehingga tidak dapat membunuh bakteri penghasil biofilm. Disamping itu, mekanisme antibakteri senyawa flavonoid bisa melalui berbagai macam cara seperti inhibisi asam nukleat, inhibisi fungsi membran sitoplasma, dan penghambatan metabolisme energi. Mekanisme antibakteri senyawa flavonoid tersebut dapat terhambat kemungkinan

karena kandungan flavonoid yang tidak adekuat pada ekstrak propolis tersebut. Kandungan saponin semestinya dapat menyebabkan penurunan tegangan permukaan membran lipid bakteri, namun kandungan saponin pada ekstrak propolis ini tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak propolis hanya mampu menghambat dan membunuh bakteri planktonik. Pada penelitian sebelumnya tentang ekstrak propolis Lawang terhadap *Fusobacterium nucleatum*, telah diperoleh bahwa KHM dengan konsentrasi 1,48% dan KBM dengan konsentrasi 1,54%.¹³ Ekstrak *Brazilian Green Propolis* terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* memiliki KHM 0,03% dan KBM 0,2%, pada bakteri *Streptococcus mutans* KHM 0,025% dan KBM 0,2%, kemudian pada bakteri *Tannerella forsythia* KHM 0,03% dan KBM 0,3%.¹⁴

Ekstrak propolis yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak propolis lebah *Apis mellifera* dari perkebunan di Batu Kabupaten Malang yang diekstrak dengan metode maserasi dan menggunakan pelarut etanol. Perbedaan yang terjadi dengan penelitian yang sebelumnya disebabkan oleh adanya perbedaan komposisi atau senyawa aktif yang terkandung dalam propolis. Beberapa faktor yang mempengaruhi komposisi propolis yaitu spesies lebah, jenis dan umur tumbuhan, iklim, dan waktu di mana propolis tersebut diperoleh.¹⁹ Sifat antimikroba yang dimiliki ekstrak propolis kemungkinan juga dipengaruhi oleh suhu, bahan dan metode ekstraksi. Selain itu, biofilm mampu membentuk pertahanan mikroorganisme yang lebih resisten terhadap pemberian antibiotik dan respon imun. Sel-sel yang terdapat dalam biofilm memproduksi baik matriks yang terbuat dari *extracellular polymeric substances* (EPS) atau struktur permukaan sel (kapsul). EPS melindungi biofilm bakteri dari tekanan lingkungan

seperti radiasi UV, perubahan pH, perubahan osmotik dan pengeringan. EPS dapat menelan logam, kation dan toksin. EPS juga berperan sebagai pusat pertukaran ion. Aktivitas muatan positif agen antimikroba dihambat oleh EPS yang bermuatan negatif. Konsentrasi yang tinggi dari enzim yang dilepaskan oleh bakteri dapat menginaktivasi antibiotik.²⁰ Namun, pada penelitian sebelumnya tentang KHM ekstrak propolis terhadap biofilm bakteri *Enterococcus faecalis* diperoleh bahwa KHM 5,75%.²¹ Hal ini terjadi karena bakteri gram positif lebih sensitif daripada bakteri gram negatif terhadap ekstrak propolis. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel lipopolisakarida yang secara kimia lebih kompleks dan mengandung lemak lebih tinggi yang membuat bakteri bersifat lebih patogen dan menghasilkan endotoksin yang sangat toksik, karena itu dapat menjelaskan resistensi yang lebih tinggi.¹⁴

DAFTAR PUSTAKA

1. Inna M, Atmania N, Priskasari S. Potential use of Cinnamomum burmanii essential oil-based chewing gum as oral antibiofilm agent. *Journal of Dentistry Indonesia* 2010; 17(3): 80-6
2. Hurlbutt M, Novy B, Young D. Dental Caries: A pH-mediated disease. *CDHA Journal* 2010; 25(1): 9-15
3. Torabinejad M & Walton RE. *Endodontics: Principles and Practice*. 4th ed. Elsevier; 2009. p. 38-46
4. Chong BS. *Harty's endodontic in clinical practice*. 6th ed. Elsevier; 2010. p. 113
5. Ferraz CCR, Diogenes A, Henry MA, Hargreaves KM. LPS from *Porphyromonas gingivalis* sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors. *J Endod* 2007; 1(37): 45-8
6. Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71(12): 8738-43
7. Jahromi MZ, Tahmourespour A, Foroughi R. Comparison of antimicrobial effect of sodium hypochlorite (5,25%) and Irania propolis on bacteria isolated from necrotizing single canal tooth with chronic apical periodontitis. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012; 6(16): 1216-21
8. Grossman, Louis I. *Ilmu endodontik dalam praktek*. Edisi 11. Jakarta: EGC; 1995. p. 196-211
9. Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC. *Ingle' Endodontic* 6. BC Decker Inc; 2008. p. 992
10. American Associations of endodontists. *root canal irrigants and disinfectants. endodontics: Colleagues for Excellence*; 2011. p. 1-8
11. Surendra NS, Bhusshanam M, Ravikumar H. Antimicrobial activity of propolis of trigona sp. and apis mellifera of karnataka, india. *prime Journal of Microbiology Research (PJM)* 2012; 2(2): 80-5
12. Parolia A, Thomas MS, Kundabala M, Mohan M. Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine Sciences* 2010; 2(7): 210/15
13. Mayangsari A. Konsentrasi hambat minimal (KHM) dan konsentrasi bunuh minimal (KBM) ekstrak propolis Lawang terhadap *Fusobacterium nucleatum*. Skripsi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya; 2013. p. 38
14. Santos VR. Propolis: Alternative medicine for the treatment of oral microbial disease. *INTECH*; 2012. p. 133-69

15. Thomas F. Flemming & Thomas Beikler. Control of oral biofilms. *Periodontology* 2000. 2011; 55: 9-15
16. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. 25th ed. Access Medicine: Mc-Graw Hill; 2010
17. Haapasalo M et al., Irrigations in endodontics. *Dent Clin N Am*; 2010. p. 291-312
18. Reynolds J & Farinha M. Counting bacteria. Richland College; 2005. p. 1-10
19. Suranto, A. Dahsyatnya Propolis untuk Menggempur Penyakit. *Agro Media*; 2010. h. 90-100
20. Usha HL, Kaiwar A, Mehta D. Biofilm In Endodontics: New Understanding To An Old Problem. *International Journal of Contemporary Dentistry* 2010; 1(3): 44-51
21. Megantara, RWA. Penentuan konsentrasi hambat minimum ekstrak Propolis terhadap biofilm bakteri *Enterococcus faecalis*. Skripsi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya;2013.