

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Propolis



Gambar 1. Propolis *Apis Trigona*

a. Definisi

Propolis atau *bee glue* adalah zat resin alami berwarna gelap dan lengket yang dikumpulkan oleh lebah dari eksudat, tunas, bagian tanaman dan dicampur dengan lilin. Propolis berasal dari bahasa Yunani kuno “*pro*” yang berarti perlindungan dan “*polis*” yang berarti kota atau komunitas. Kota yang dimaksud adalah sarang lebah. Propolis digunakan sebagai pertahanan sarang lebah. Lebah mengaplikasikan propolis pada dinding bagian dalam sarang. Propolis digunakan untuk menutup lubang dan retakan, memperbaiki sarang, memperkuat batas sarang yang tipis dan untuk membuat pintu masuk sarang (Bankova, dkk., 2000).

Propolis akan menjadi liquid pada suhu 60-70°C (Kuropatnicki dkk., 2013). Pada suhu ruangan propolis menjadi lengket, namun akan menjadi keras dan rapuh pada suhu rendah. Propolis terdiri dari *resin* dan *balsams* (50-70%), *essential oil* dan *wax* (30-50%), *pollen* (5-10%) (Parolia, dkk., 2010).

b. Sejarah Penggunaan

Propolis sudah lama digunakan oleh orang-orang Mesir kuno, Persia dan Romawi. Dalam manuskrip Persia propolis digambarkan sebagai obat penyakit eksim, mialgia dan rematik. Penduduk Mesir kuno menggunakan propolis untuk mengobati penyakit dan sebagai zat pembalseman. Lebih dari 15 penulis Yunani dan Romawi melaporkan tentang persiapan dan penerapan propolis. Yunani menggunakan propolis sebagai bahan utama *polyanthus* atau parfum yang menggabungkan propolis, *olibanum*, *styrax*, dan ramuan aromatik. Hippocrates dilaporkan telah menggunakan propolis untuk menyembuhkan luka dan ulkus, baik secara eksternal maupun internal. Pada abad pertama Cornelius Celsus menulis tentang propolis sebagai obat untuk supurasi, membuka luka dan untuk pengobatan abses. Bangsa Yahudi kuno menyebut propolis dengan nama *tzori* yang dianggap sebagai obat. Bangsa Arab juga mengenal propolis. Misalnya, Avicenna menulis tentang dua jenis lilin yang berbeda, yaitu lilin bersih dan lilin hitam. Pengetahuan tentang sifat obat propolis bertahan dalam pengobatan tradisional di wilayah Eropa Timur.

Mereka menyebut propolis sebagai *Russian penicillin* (Kuropatnicki, dkk., 2013).

c. Kandungan

Sejak tahun 2000 lebih dari 300 senyawa kimia terkandung dalam propolis seperti *flavonoid*, *terpenes*, *phenolic*, *sugars*, *hydrocarbons* dan *mineral elements* (Bankova, dkk., 2000; Kumar dan Pandey, 2013; Huang, dkk., 2014;).

Flavonoid diklasifikasikan kedalam *flavones*, *flavonols*, *flavanones*, *flavanonols*, *chalcones*, *dihydrochalcones*, *isoflavones*, *isodihydroflavones*, *flavans*, *isoflavans* dan *neoflavonoids* (Huang, dkk., 2014).

Group of flavanoid	Structure backbone	Examples
Flavones		 Luteolin Apigenin Chrysin
Flavonols		 Quercetin Kaempferol Galangin
Flavanones		 Hesperetin Naringenin
Flavanonol		 Taxifolin
Isoflavones		 Genistein Daidzein
Flavan-3-ols		 Catechin Epicatechin

Gambar 2. Fraksi Etanolik Propolis (Kumar dan Pandey, 2013)

Monoterpenes yang diisolasi dari propolis termasuk *acyclic*, *monocyclic*, *dicyclic monoterpenes* dan turunannya. *Acyclic* dan *monocyclic monoterpenes* adalah *myrcenes*, *p-menthanes* dan *cineoles*. *Dicyclic monoterpenes* yang terkandung dalam propolis diklasifikasikan kedalam lima grup yaitu *thujanes*, *caranes*, *pinanes*, *fenchanes* dan *champhenes*. *Cembrane*, *labdane*, *abietane*, *pimarane* dan *totarane* dilaporkan sebagai komponen utama *diterpenes* dalam propolis (Huang, dkk., 2014).

Propolis banyak mengandung *phenylpropanoids* termasuk *cinnamic acid*, *p-coumaric acid*, *caffeic acid*, *ferulic acid*, *three quinic acid* dan turunannya (Huang, dkk., 2014).

Dalam Propolis teridentifikasi banyak *sugars*, *sugar alcohols* dan *uronic acid*. Kandungan yang pertama kali teridentifikasi adalah *galactitol*, *gluconic acid*, *galacturonic acid* dan *2-O-glycerylgalactose* (Huang, dkk., 2014). *Sugars* dan *sugar alcohols* yang telah teridentifikasi adalah *xylose*, *galactose*, *mannose*, *lactose*, *maltose*, *melibiose*, *erytritol*, *xylitol* dan *inositol* (Bankova, dkk., 2000).

Elemen mineral yang ditemukan oleh *atomic emission/absorption spectrometry* dalam propolis adalah Ca, K, Mg, Na, Zn (Bankova, dkk., 2000); Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Ni, Sr, As, Cd, Hg dan Pb (Huang, dkk., 2014).

d. Manfaat

Propolis memiliki manfaat sebagai *antioxidant activity*, *enzyme inhibition*, *anti-inflammatory activity*, *vascular activity*, *oestrogenic activity*, *cytototoxic antitumour activity* dan *antimicrobial activity* (Cushnie, dkk., 2003); *antiviral activity*, *anti fungal activity*, *antiprotozoan activity*, *therapeutic activity* (Marcucci, 1995).

Parolia, dkk (2010), melaporkan propolis bermanfaat sebagai *pulp capping agent*, irigasi intrakanal, obat kumur, *cariostatic agents*, *dentinal hypersensitivity*, obat periodontitis, obat *denture stomatitis*, *intra-canal medicament*, *treatment of recurrent aphthous stomatitis* dan obat *candidiasis*.

2. *Apis Trigona*

Apis Trigona banyak ditemukan pada daerah tropis dan subtropis, seperti di negara-negara kawasan Asia Tenggara. Lebah jenis ini tidak memiliki sengat atau *stingless bee* (Weiss dan Vergara, 2002).



Gambar 3. Lebah *Apis Trigona*

Berdasarkan taksonominya *Apis Trigona* diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : *Animalia*

Filum : *Arthropoda*

Kelas : *Insecta*

Ordo : *Hymenoptera*

Family : *Apidae*

Genus : *Apis*

Spesies : *Apis trigona*

3. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menemukan obat tradisional. Biasa digunakan untuk memisahkan suatu zat atau beberapa dengan bantuan bahan pelarut (Mukhriani, 2014).

a. Maserasi

Maserasi banyak digunakan untuk skala kecil maupun industri. Bahan mentah dan pelarut dimasukkan kedalam wadah *inert* kemudian ditutup rapat dan disimpan pada suhu kamar. Ekstraksi dilakukan sampai tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam bahan. Untuk memisahkan pelarut dari sampel digunakan teknik penyaringan (Mukhriani, 2014). Metode

tradisional (maserasi), membutuhkan waktu dari 2 sampai 10 hari (Trusheva, dkk., 2007).

b. Reflux dan Destilasi Uap

Untuk mendapatkan ekstrak, sampai dimasukkan kedalam labu bersama dengan pelarut yang terhubung dengan kondensor. Uap yang terkondensasi karena pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih akan kembali kedalam labu. Wadah yang terhubung dengan kondensor akan menampung destilat yang terkondensasi akibat pemanasan. Destilasi uap biasa digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial (Mukhriani, 2014).

c. *Ultrasound-Assisted Solvent Extraction*

Serbuk sampel dimasukkan kedalam wadah *ultra sonic* dan *ultrasound*. Hal tersebut akan menghasilkan rongga pada sampel akibat adanya tekanan mekanik. *Ultrasound* yang digunakan berfrekuensi 20 kHz (Mukhriani, 2014). Ekstraksi propolis menggunakan *Ultrasonic-Assisted Solvent Extraction* menunjukkan adanya peningkatan hasil konstituen aktif biologis seiring berjalannya waktu. *Sonication* selama 30 menit cukup untuk mengekstrak jumlah fenol dan flavonoid yang tersedia. Metode ini telah terbukti menjadi ekstraksi yang paling efisien, dengan mempertimbangkan hasil, waktu ekstraksi pendek (30 menit) dan selektivitas tinggi (Trusheva, dkk., 2007).

d. Perlokasi

Sampel dimasukkan kedalam perlokator. Kemudian, ditambahkan pelarut sedikit demi sedikit dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian wadah (Mukhriani, 2014).

e. Soxhlet

Sampel ditempatkan pada sarung selulosa atau kertas saring dalam klonsong yang ditempatkan dibawah kondensor dan di atas labu. Suhu penangas diatur dibawah suhu reflux (Mukhriani, 2014).

f. *Microwave Assisted Extraction* (MAE)

Microwave Assisted Extraction (MAE) merupakan proses penggunaan energi *microwave* untuk memanaskan pelarut yang kontak dengan sampel secara berurutan untuk mempartisi beberapa komponen kimia dari matriks ke dalam pelarut. Adanya *cycle of irradiation* tambahan pada ekstraksi propolis menghasilkan penurunan drastis *phenolics* dan *flavanones/ dihydroflavonols*. Kenaikan kecil persentase *flavones / flavonols* yang diekstraksi tidak signifikan secara statistik. Masuknya energi tinggi menyebabkan perubahan kimia (kemungkinan oksidasi) *phenolic compounds* (termasuk flavonoid) (Trusheva, dkk., 2007).

4. Faktor Virulensi Bakteri Anaerob Sulkus Gingiva

Virulensi merupakan kemampuan relatif organisme untuk menyebabkan penyakit, mengganggu fungsi metabolisme atau fisiologis sel *host*. Virulensi mengacu pada kemampuan mikroba untuk mengekspresikan patogenisitas. Virulensi merupakan interaksi yang kompleks antara mikroba dan sel *host*. Interaksi ini tergantung pada banyak faktor diantaranya karakteristik *endproducts* dari metabolisme bakteri dan komposisi kimia komponen bakteri. Beberapa fungsi dari faktor virulensi adalah untuk menginduksi interaksi mikroba-*host*, menyerang *host*, tumbuh dalam sel *host* dan menghindari atau mengganggu pertahanan *host* (Dumitrescu dan Ohara, 2010).

Tabel 1. Faktor Virulensi Bakteri (Holt, 2000; Dumitrescu dan Ohara 2010; Bostanci dan Belibasakis, 2012)

No.	Bakteri	Faktor Virulensi	Keterangan
1.	<i>A.actinomycetem-comitans</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Poli-Nacetylglucosamine</i> (PGA) • <i>Collagenase</i> • <i>Cytotoxins</i> • <i>Leukotoxin</i> • <i>Fc-binding component</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Adhesi interseluler, pembentukan biofilm dan resistensi deterjen. • Menurunkan densitas serat kolagen gingiva. • Berdampak pada viabilitas sel fibroblast. • Membunuh <i>polymorphonuclear leukocytes</i> (PMNs) dan makrofag. • Mengganggu aktivitas fagositik (90%), mengganggu fungsi

			komplemen dan regulasi turunan proliferasi sel B di infiltrat periodontal.
	<ul style="list-style-type: none"> • Lipopolisakarida 		<ul style="list-style-type: none"> • Merangsang makrofag untuk memproduksi interleukin (<i>interleukin-1α</i> dan <i>interleukin-1β</i>), <i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF) serta sitokin yang terlibat dalam jaringan peradangan dan resorpsi tulang.
2.	<i>Tannerella forsythia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enzymatic peptidase activity (trypsin-like enzyme)</i> • Lipoprotein (BfLP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Mendegradasi <i>benzoyl-DL arginine-naphthylamide</i> (BANA), aktivitas yang muncul terkait dengan kerusakan jaringan periodontal. • Mengaktifkan fibroblas gingiva untuk menghasilkan lebih banyak <i>interleukin-6</i> dan <i>TNF-α</i>. <i>Interleukin-6</i> menginduksi resorpsi tulang oleh osteoklas
3.	<i>Treponema denticola</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Proteinase (chemotaxis protein, chymotrypsin-like protease dan dentilisin)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Menurunkan komponen matriks manusia yang akan meningkatkan penetrasi jaringan.
4.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Biofilm dan <i>coadhere</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Memungkinkannya menempel pada sel epitel dan kolagen gingiva.
5.	<i>Prevotella intermedia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Proteinase (trypsin-like serin)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi

		<i>protease, dipeptidyl peptidase IV dan cysteine protease baru dari kelas cysteine-histidine-dyad)</i>	pada sel epitel gingiva manusia dan ligamentum periodontal manusia
6.	<i>Campylobacter rectus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • GroEL-like protein (GroEL) • Lipopolisakarida 	<ul style="list-style-type: none"> • Menginduksi berbagai mediator inflamasi dan merangsang produksi IL-6 dan IL-8 oleh sel gingiva manusia. • Menstimulasi produksi PGE2, interleukin-1β (IL-1β), dan IL-6 dengan fibroblas gingiva, sedangkan permukaan kristal lapisan merangsang sekresi IL-6, IL-8, dan TNF-α oleh sel HEp-2.
7.	<i>Parvimonas micra</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Proteinase (gelatinase dan hyaluronidase)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivitas proteolitik
8.	<i>Eikenella corrodens</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>N-asetil-D-galaktosamin (GalNAc)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Menginduksi produksi ICAM-1 melalui sel epitel oral manusia, merangsang proliferasi murine B sel dan mendorong sekresi serta ekspresi IL-8
9.	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Lipopolisakarida 	<ul style="list-style-type: none"> • Merangsang produksi <i>cytokine proinflamator</i>, sebagai stimulator respon antiinflamasi dan resorpsi tulang serta merangsang produksi prostaglandin E2 dari fibroblast gingiva manusia

-
- | | |
|---|--|
| • Kapsul | • Memberikan perlindungan dari <i>host defenses</i> |
| • <i>Fimbriae</i> | • Interaksi dengan sel inang spesifik, memproduksi dan menyalurkan toksin serta sebagai <i>colonization antigens</i> . |
| • <i>Proteinase (hydrolytic, proteolytic, lypolytic enzyme, trypsin-like protein)</i> | • Berperan dalam perkembangan penyakit periodontal, diseminasi bakteri ke jaringan inang yang lebih dalam, invasi jaringan serta penghancuran <i>host tissue</i> |
-

5. Mekanisme Penghambatan Enzim

Cara penghambatan utama terhadap *polyphenolic compound-digestive enzyme* adalah non-kompetitif. Penurunan nilai V_{max} *polyphenolic compound* dan tanpa adanya perubahan signifikan nilai K_M menunjukkan bahwa afinitas enzim terhadap substrat tidak terpengaruh sehingga penghambatan non-kompetitif terjadi. Nilai V_{max} berubah tergantung pada konsentrasi *polyphenolic compound*. Ikatan antara enzim-substrat yang kompleks terjadi ketika flavonoid *Tartary buckwheat bran* berinteraksi dengan *lipase* yang menunjukkan jenis penghambatan non-kompetitif. Penghambatan *mixed-type* untuk semua derivat *chlorogenic acid* diuji selama aktivitas α -amilase dan *polyphenolic compound* memberikan

afinitas yang lebih tinggi untuk *enzyme-substrate complex*. *Quercetin* menunjukkan jenis inhibisi kompetitif (V_{max} tidak berubah) saat berinteraksi dengan α -*glycosidase*. Studi lain melaporkan bahwa *caffeoylquinic acid* dan isomer menunjukkan penghambatan tipe kompetitif terhadap *lipase*. Salah satu *binding site* terletak di sekitar *active site*. Prediksi *polyphenolic compound binding site* mempertimbangkan aspek-aspek karakteristik *ligand (polyphenolic compound)*, untuk mendapatkan perubahan *minimal energy free* (memperkecil *energy building*) dan struktur *ligand-protein complex*. Pada interaksi flavonoid *baicalein* dengan *pepsin*, flavonoid berinteraksi dengan *hydrophobic cavity* enzim. Penghambatan non-kompetitif *acteoside* pada *lipase* disebabkan oleh perubahan konformasi molekul enzim yang mengurangi aktivitas katalitik. Ikatan hidrogen adalah interaksi utama yang terjadi antara *acteoside* dan *lipase*. Pengikatan hidrogen *acteoside* dengan satu residu *amino acid* dari *catalytic triad pepsin (Asp32)* dan *chymotrypsin (Ser195)* tidak terkait dengan jenis penghambatan kompetitif. Jumlah dan kekuatan ikatan hidrogen antara residu *amino acid* dan *polyphenolic compound* harus dipertimbangkan dengan cermat, karena ikatan afinitas terkuat dan *inhibitory activity* tertinggi secara langsung berhubungan dengan residu *amino acid* dan *polyphenolic compound* (Martinez-Gonzalez, dkk., 2017).

6. Spektrofotometri

Ultraviolet Visible spektrofotometri merupakan salah satu alat yang digunakan dalam analisis farmasetika. Pengukuran ini melibatkan sinar ultraviolet atau sinar tampak yang diserap oleh zat dalam larutan. Kuantifikasi zat dapat dilakukan dengan menyiapkan larutan *solvent* dan mengukur absorbansi pada panjang gelombang yang sesuai (Behera, dkk., 2012).

Spektrofotometri dapat digunakan untuk mengukur kepadatan sel. Sampel yang berada didalam kuvet akan dilewati oleh cahaya yang menyebar tergantung dengan kepadatan sel. Kepadatan sel sebanding dengan *turbidity* (kekeruhan) atau *optical density* (OD). Maka dari itu, kepadatan sel dapat ditentukan dari OD. *Optical Density* pada pengukuran kultur bakteri bukan absorbansi, seperti dalam kasus pewarna terlarut (Widdel, dkk., 2010).

7. Uji Hidrolisis Gelatin

Gelatin adalah protein yang berasal dari kolagen. *Gelatinase* berasal dari enzim ekstraselular yang diproduksi dan disekresikan oleh beberapa bakteri untuk menghidrolisis gelatin. Kehadiran *gelatinase* dapat dideteksi dengan menggunakan media *nutrient* gelatin. *Nutrient* gelatin merupakan media uji sederhana yang tersusun dari gelatin, *peptone*, dan *beef extract* (Leboffe dan Pierce, 2011). Menurut Lay (1994), hidrolisis gelatin diuji

dengan menggunakan bakteri yang diinjeksikan kedalam media *nutrient* gelatin, kemudian diinkubasi pada suhu 35° C dan dimasukkan kedalam *freezer*. Apabila media *nutrient* gelatin telah terhidrolisis oleh enzim *gelatinase*, maka jika dimasukkan kedalam *freezer* media *nutrient* gelatin akan tetap bersifat cair.

B. Landasan Teori

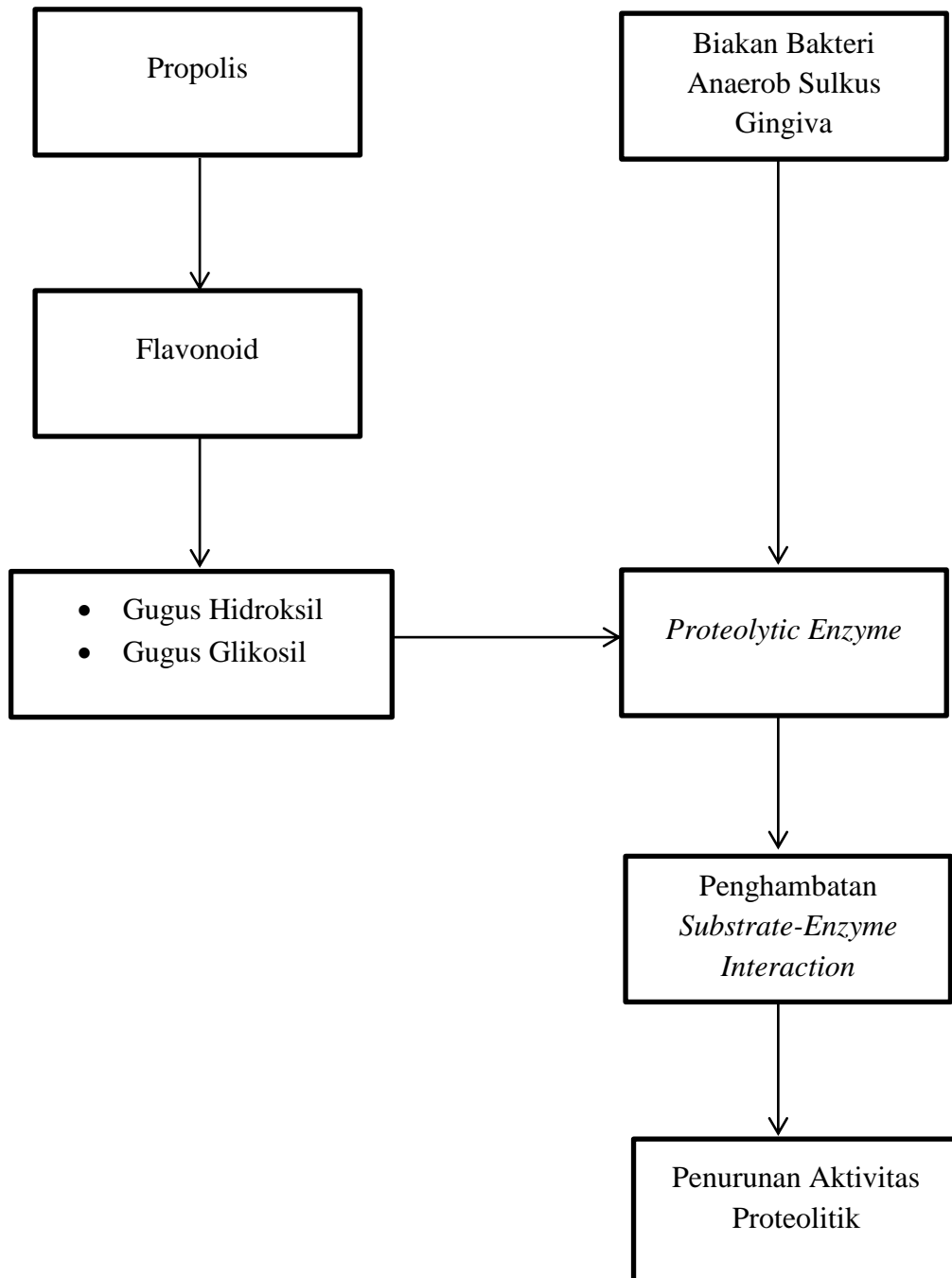
Terdapat ribuan mikroorganisme dalam rongga mulut manusia. Bakteri merupakan salah satu flora normal. Bakteri tersebut ada yang bersifat patogen dan dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Bakteri penyebab periodontitis diantaranya adalah *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella Forsythia* dan *Agregatibacter Actinomycetemcomitans*. Bakteri tersebut memiliki *proteinase* sebagai faktor virulensi yang berperan penting pada *proteolytic activity* dan *hydrolytic activity*.

Indonesia memiliki sumber daya alam yang melimpah. Lebah merupakan fauna yang memiliki banyak manfaat, seperti tertulis dalam Al-Quran surat An-Nahl ayat 68 dan 69 mengenai lebah. Salah satu produk yang dihasilkan oleh lebah adalah propolis. Propolis mengandung flavonoid, senyawa fenol dan terpenoid. Propolis memiliki manfaat sebagai anti bakteri, anti virus, anti jamur dan antiinflamasi. Penambahan gugus glikosil pada flavonoid memberikan kemungkinan lebih tinggi flavonoid untuk berinteraksi dengan enzim. *Glycolisation* flavonoid dapat mengganggu kontak *enzyme-substrate* dengan cara mengikat substrat. Hal tersebut dilakukan dengan meningkatkan polaritas *polyphenolic compound-protein adduct*, pembentukan ikatan

hidrogen, dan penurunan lingkungan hidrofobik dekat *catalytic site*. Sementara itu pengikatan *flavonoid-enzyme* meningkat dengan adanya peningkatan jumlah gugus hidroksil. Sejumlah besar gugus hidroksil dalam *polyphenolic compound* menggambarkan manfaat untuk mengikat enzim dan mengurangi aktivitas enzimatik.

Berdasarkan landasan teori ini peneliti ingin mengetahui pengaruh ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) terhadap aktivitas proteolitik biakan bakteri anaerob sulkus gingiva.

C. Kerangka Konsep



D. Hipotesis

Berdasarkan teori di atas didapatkan hipotesis bahwa ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) memiliki pengaruh terhadap aktivitas proteolitik biakan bakteri anaerob sulkus gingiva.