

Data dalam naskah ini merupakan bagian dari data tema payung peneliti dan nantinya akan di publikasikan dalam jurnal internasional, sehingga sudah sudah di repositori lebih dahulu.

THE INFLUENCE OF PROPOLIS ETHANOL EXTRACT (*Apis Trigona*) ON THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF ANAEROBIC SULCUS GINGIVA BACTERIAL CULTURES (*in vitro*)

Farina Sri Rahayu¹, Arya Adiningrat²

¹ Dentistry Student, Faculty of Medicine and Health Science UMY

² Oral Science Department, Faculty of Medicine and Health Science UMY

TTD

ABSTRACT

Background: Most of the anaerobic bacteria is the cause of the periodontal tissues damage which has proteinase as the virulence factors which are able to increase the bacterial pathogens. Propolis as a herbal medicine is not only used as an antibacterial but also used as enzyme inhibitor. **Objective:** This research aims to find out the influence of Propolis Ethanol Extract (*Apis Trigona*) on the proteolytic activity of anaerobic sulcus gingiva bacterial cultures. **Methods:** The design of the research used was *in vitro* laboratory experimental. The method used was liquid dilution in the media of Tryptose Phosphate Broth which was continued with a gelatin hydrolysis test. Propolis Ethanol Extract (*Apis Trigona*) which was tested to anaerobic sulcus gingiva bacterial cultures consisted of various concentrations: 0.8%; 0.4%; 0.2%; 0.1%; and 0.05% based on the weight/volume (w/v). **Results:** All concentrations tested have weak relations ($r = -0.589$) on the proteolytic activities. However, they have strong relations ($r = -0.950$) with the total of influence of 90.3% on the bacteria population number. **Conclusion:** Propolis Ethanol Extract (*Apis Trigona*) has weak relations on the proteolytic activity of anaerobic sulcus gingiva bacterial cultures.

Keywords: Propolis Ethanol Extract (*Apis Trigona*), Proteolytic Activity, Anaerobic Sulcus Gingiva Bacterial, Gelatin Hydrolysis Test

INTISARI

Latar belakang: Sebagian besar bakteri anaerob penyebab kerusakan jaringan periodontal memiliki *proteinase* sebagai faktor virulensi yang dapat meningkatkan patogenitas bakteri. Propolis sebagai obat herbal selain digunakan sebagai antibakteri juga memiliki manfaat untuk menghambat enzim. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) terhadap aktivitas proteolitik biakan bakteri anaerob sulkus gingiva. **Metode:** Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Metode yang digunakan adalah dilusi cair pada media *Tryptose Phosphate Broth* yang dilanjutkan dengan uji hidrolisis gelatin. Ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) yang diujikan pada biakan bakteri anaerob sulkus gingiva terdiri dari berbagai konsentrasi : 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%; dan 0,05% berdasarkan berat/volume (w/v). **Hasil:** Semua konsentrasi yang diujikan

memiliki hubungan lemah ($r = -0.589$) terhadap aktivitas proteolitik namun memiliki hubungan kuat ($r = -0.950$) dengan total pengaruh sebesar 90.3% terhadap jumlah populasi bakteri. **Kesimpulan:** Ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) memiliki hubungan yang lemah terhadap aktivitas proteolitik biakan bakteri anaerob sulkus gingiva.

Kata kunci : Ekstrak Etanol Propolis (*Apis Trigona*), Aktivitas Proteolitik, Bakteri Anaerob Sulkus Gingiva, Uji Hidrolisis Gelatin

Pendahuluan

Periodontitis terjadi karena adanya inflamasi kronis pada jaringan periodontal. Kerusakan jaringan periodontal disebabkan oleh proses kompleks yang melibatkan bakteri¹. Bakteri yang berkaitan erat dengan periodontitis adalah *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, dan *Tannerella forsythia*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Parvimonas micra*, *Selenomonas sp.*, *Eubacterium sp.* dan *Streptococcus intermedius*^{2,3}.

Sebagian besar bakteri anaerob penyebab kerusakan jaringan periodontal memiliki *proteinase* sebagai faktor virulensi yang dapat meningkatkan patogenitas bakteri³. *Arg-gingipain*, *lys-gingipains* dan *proteolytic enzymes* dapat mendegradasi protein *host* dan menyebabkan inflamasi⁴.

Propolis atau *bee glue* adalah *wax* alami seperti substrat resin yang ditemukan pada sarang lebah dan digunakan sebagai semen untuk menutup celah atau ruang terbuka. Propolis dimanfaatkan untuk mencegah dan mengobati pilek, ulkus, rheumatik, penyakit hati, diabetes dan gigi karies⁵. Propolis memiliki manfaat lain sebagai antioksidan, penghambat enzim, antiinflamasi, *vascular activity*, *oestrogenic activity*, *cytototoxic antitumour activity* dan antibakteri⁶. Terdapat lebih dari 300 senyawa yang terkandung dalam propolis. Sejauh ini terdapat 180 komponen propolis yang sudah teridentifikasi. Unsur utama propolis dari berbagai penelitian adalah flavonoid. Beberapa *phenolic esters* dan flavonoid seperti *caffeic acid phenethyl ester*, *quercetin*, *baicalin*, *pinocembrine*, *naringin*, *galangin*, dan *chrysin* telah ditemukan bertanggung jawab sebagai antimikroba, antiinflamasi dan antioksidan⁷.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) terhadap aktivitas proteolitik biakan bakteri anaerob sulkus gingiva.

Metode

Penelitian ini merupakan suatu penelitian eksperimental laboratoris *in vitro*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober hingga Desember tahun 2017.

Bakteri yang diujikan dalam penelitian ini adalah biakan bakteri anaerob sulkus gingiva yang berasal dari sulkus gingiva normal manusia. Beberapa koloni bakteri diambil dari strainnya,

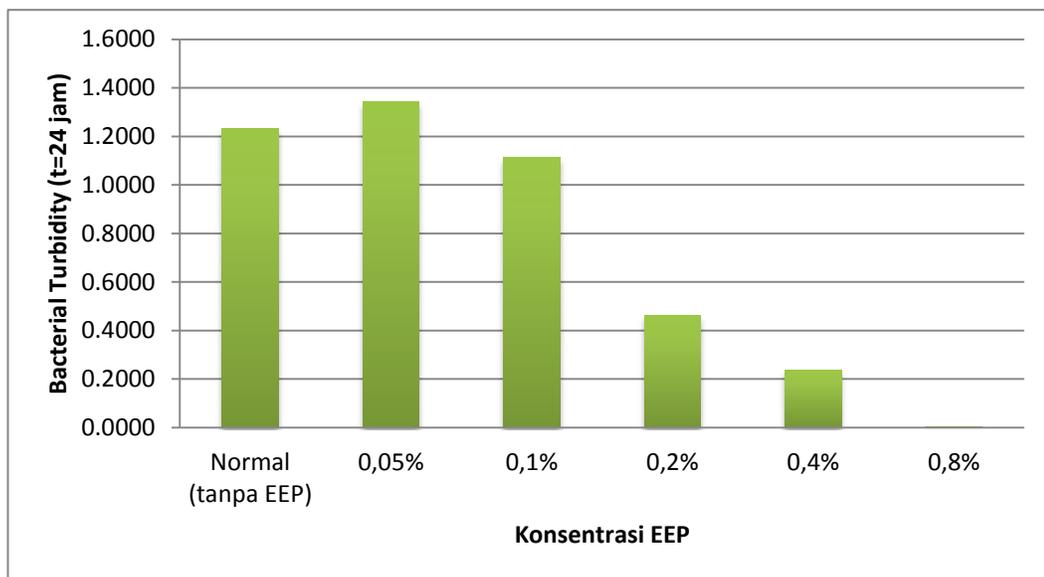
kemudian dimasukkan kedalam Erlenmeyer yang berisi media Tryptose Phosphate Broth. Erlenmeyer berisi bakteri dimasukkan kedalam *anaerobic jar* dan inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.

7 tabung bakteri yang sudah dilakukan *pre-treatment* di uji menggunakan *Ultraviolet-Visible* spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm untuk mendapatkan nilai *Optical Density (OD)*. Hasil pengukuran OD dijadikan acuan untuk menentukan volume setiap sampel yang merepresentasikan jumlah populasi bakteri. Penentuan volume dilakukan dengan perbandingan OD menggunakan rumus.

Pengamatan aktivitas proteolitik dilakukan menggunakan 21 tabung media dengan gelatin. Pada penelitian ini menggunakan gelatin dengan konsentrasi 8%. Setiap 3 tabung gelatin akan diinjeksikan bakteri yang sudah dilakukan *pre-treatment* menggunakan EEP dengan konsentrasi 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%; 0,05%; *doxycycline* 0,0025 µg/mL dan aquades steril 40 µl. Kemudian bakteri diinjeksikan kedalam gelatin sampai kedalam $\frac{3}{4}$ tabung menggunakan spuit. Semua tabung dimasukkan kedalam *anaerobic jar* dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 20 jam. Kemudian, semua tabung dimasukkan kedalam *freezer* selama 1 jam. Volume likuifaksi gelatin diukur menggunakan *Sliding caliper*. Hasil pengukuran data dicatat dan di analisis.

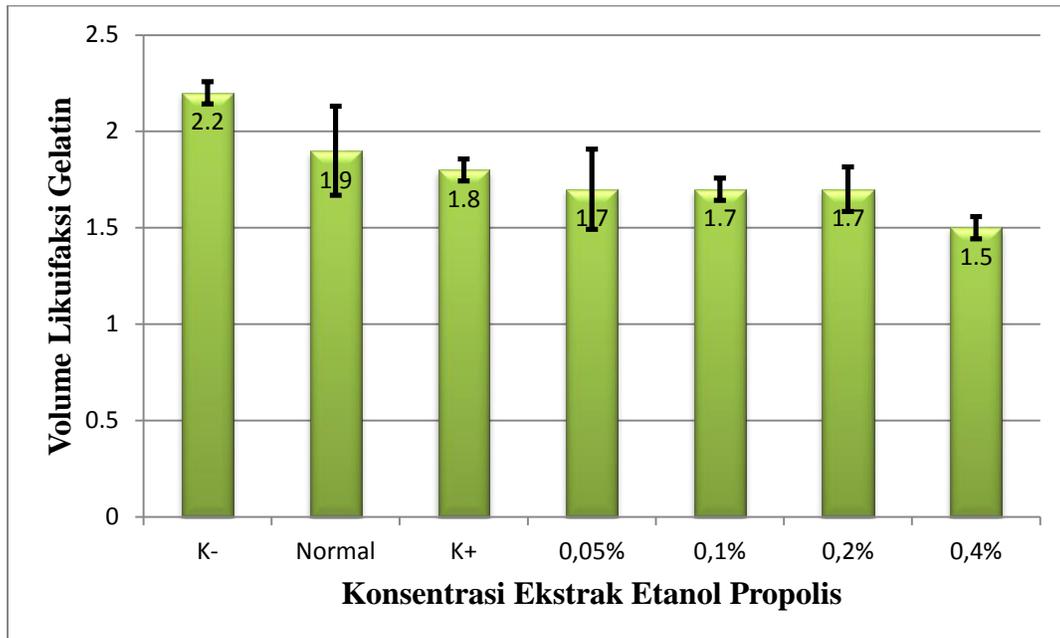
Hasil

Seluruh sampel yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan pengujian turbiditas bakteri menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.



Gambar 1. Turbiditas Bakteri

Setelah dilakukan uji turbiditas kemudian semua sampel dilakukan uji hidrolisis gelatin.



Gambar 2 Volume Likuifaksi Gelatin

Berdasarkan grafik diatas dapat disimpulkan bahwa EEP memiliki hubungan terhadap jumlah populasi dan aktivitas proteolitik bakteri.

Pembahasan

Adanya tendensi penghambatan aktivitas proteolitik dapat disebabkan karena terjadi penghambatan interaksi substrat-enzim oleh senyawa fenolik. Peningkatan gugus hidroksil pada struktur flavonoid dapat mengurangi aktivitas enzimatis senyawa tersebut. Hal tersebut dipengaruhi oleh kompleksitas molekul flavonoid yang berkaitan dengan afinitas. Efek antagonis serupa juga dijumpai pada kondisi senyawa flavonoid yang mengalami glikosilasi sehingga lebih interaktif terhadap substrat⁸.

Hasil analisis data menunjukkan adanya hubungan yang kuat (-0.950) pada penurunan turbiditas bakteri pasca pemaparan EEP dengan total pengaruh sebesar 90.3%. Hasil ini menunjukkan semakin meningkatnya konsentrasi EEP maka akan berpengaruh terhadap penurunan turbiditas bakteri. Secara tidak langsung efek dari penggunaan dosis yang mempengaruhi kuantitas bakteri dapat mengurangi jumlah produksi enzim proteolitik yang disekresikan oleh bakteri¹.

Pada kondisi gingivitis dan periodontitis sebagian besar bakteri anaerob sulkus gingiva memiliki aktivitas virulensi yang dapat meningkatkan patogenitas bakteri³. Ekspresi faktor virulensi bakteri mempengaruhi tingkat keparahan infeksi. Pada penelitian ini bakteri yang

diujikan berasal dari sulkus gingiva normal, dimana bakteri tersebut tidak berada dalam kondisi patologis melainkan dalam kondisi fisiologis. Maka dapat diasumsikan bahwa selain jumlah produksi enzim yang berkurang karena efek penghambatan pertumbuhan populasi bakteri, aktivitas proteolitik yang lemah juga dapat disebabkan karena kondisi sebagian besar bakteri yang diujikan tidak memiliki aktivitas virulensi sehingga tidak bersifat patogen⁹.

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Semua konsentrasi EEP yang diujikan pada penelitian ini memiliki hubungan yang lemah terhadap aktivitas proteolitik biakan bakteri anaerob sulkus gingiva.
2. Semua konsentrasi EEP yang diujikan pada penelitian ini dapat menghambat pertumbuhan populasi bakteri anaerob sulkus gingiva.

Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas proteolitik bakteri yang diuji oleh ekstrak propolis menggunakan konsentrasi dan pelarut yang berbeda.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan dosis yang lebih ketat terhadap bias antara penghambatan pertumbuhan dan penghambatan aktivitas proteolitik biakan bakteri anaerob sulkus gingiva.

Daftar Pustaka

1. Grenier, D., Roy, E., Mayrand, D., 2003. Modulation of *Porphyromonas gingivalis* Proteinase Activity by Suboptimal Doses of Antimicrobial Agents. *J Periodontol* (74) : 9.
2. Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J., Duskova, J., 2014. *Porphyromonas gingivalis*: Major periodontopathic pathogen overview. *Journal of Immunology Research*, 2014 (47608): 1-8.
3. Dumitrescu, A.L., Ohara, M., 2010. *Etiology and Pathogenesis of Periodontal Disease*. Norway: Springer; 39-56.
4. Japoni, A., Vazin, A., Noushadi, S., Kiany, F., Japoni, S., Alborzi, A., 2011. Antibacterial susceptibility patterns of *Porphyromonas gingivalis* isolated from chronic periodontitis patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 16 (7): 1031-1035
5. Huang, S., Zhang, C.P., Wang, K., Li, G.Q., Hu, F.L., 2014. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19 (12): 19610–19632.
6. Cushnie, T.P.T., Hamilton, V.E.S., Lamb, A.J., 2003. Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol Res*, 158: 281–289.
7. Kuropatnicki, A.K., Szliszka, E. & Krol, W., 2013. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: 1-11.
8. Martinez-Gonzalez, A.I., Diaz-Sanchez, A.G., de la Rosa, L.A., Vargas-Requena, C.L., Bustos-Jaimes, I., Alvarez-Parrilla, E., 2017. Polyphenolic compounds and digestive enzymes : in vitro non-covalent interaction. *Molecules*, 22, 669 : 12.

9. Ramachandran, G., 2014. Gram-positive and Gram-negative Bacterial Toxins in Sepsis. *Virulence*, 5(1): 213-218.