

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Propolis

a. Pengertian

Propolis atau yang biasa disebut *bee glue* merupakan salah satu produk yang dihasilkan oleh lebah. Propolis berasal dari bahasa Yunani “*pro*” yang berarti perlindungan dan “*polis*” yang berarti kota. Istilah tersebut mencerminkan fungsi propolis bagi lebah, yaitu pelindung dari gangguan eksternal hewan lain dan dari penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme (Bankova, 2005).

Propolis adalah zat resin dan bersifat lengket yang dikumpulkan oleh koloni lebah dari getah pohon dan dicampur dengan lilin lebah/*bees wax* dan enzim lebah itu sendiri (Sforcin & Bankova, 2011). Lebah menggunakan propolis sebagai penutup lubang dan celah pada sarangnya, sebagai pelapis yang berfungsi melindungi sarang lebah dari gangguan eksternal misalnya serangga, ngengat, tikus, cuaca, dan sebagai antibakteri (Kwapong *et al.*, 2010).



Gambar 1. Propolis Mentah *Apis trigona*
Diambil dari : Kecamatan Nglipar, Kabupaten Gunungkidul, DIY

b. Sejarah Penggunaan

Propolis telah digunakan sejak zaman kuno, setidaknya ribuan tahun sebelum masehi oleh bangsa Mesir kuno. Orang-orang Mesir menggunakan propolis karena dapat mencegah pembusukan mayat, sehingga mereka menggunakan propolis untuk membalsam mayat (Lotfy, 2006). Ahli pengobatan dan ilmu kedokteran Yunani dan Romawi seperti Aristoteles, Dioscorides, Pliny, dan Galen mengetahui efek terapi yang dimiliki propolis, sehingga mereka menggunakan propolis sebagai antiseptik dan penyembuh luka (Toreti *et al.*, 2013).

Kemampuan antibakteri propolis membuat propolis menjadi populer di Eropa pada abad 17 hingga abad 20. Propolis terdaftar dalam daftar obat resmi di farmakope London pada abad ke-17. Pada akhir abad ke-19, propolis digunakan secara luas tepatnya pada masa perang dunia ke-2 sebagai obat tuberkulosis oleh beberapa klinik di Uni Soviet (Wagh, 2013).

Penggunaan propolis masih berlanjut hingga masa sekarang, dikarenakan propolis mempunyai kemampuan antiseptik, anti jamur, bakteriostatik, anti-inflamasi, anestesi, dan antioksidan. Propolis dibentuk menjadi sediaan pasta gigi dan obat kumur. Obat kumur yang mengandung propolis umumnya dijual di Amerika dan Eropa sebagai obat untuk penyembuhan gingivitis, cheilitis, dan stomatitis (Burdock, 1998).

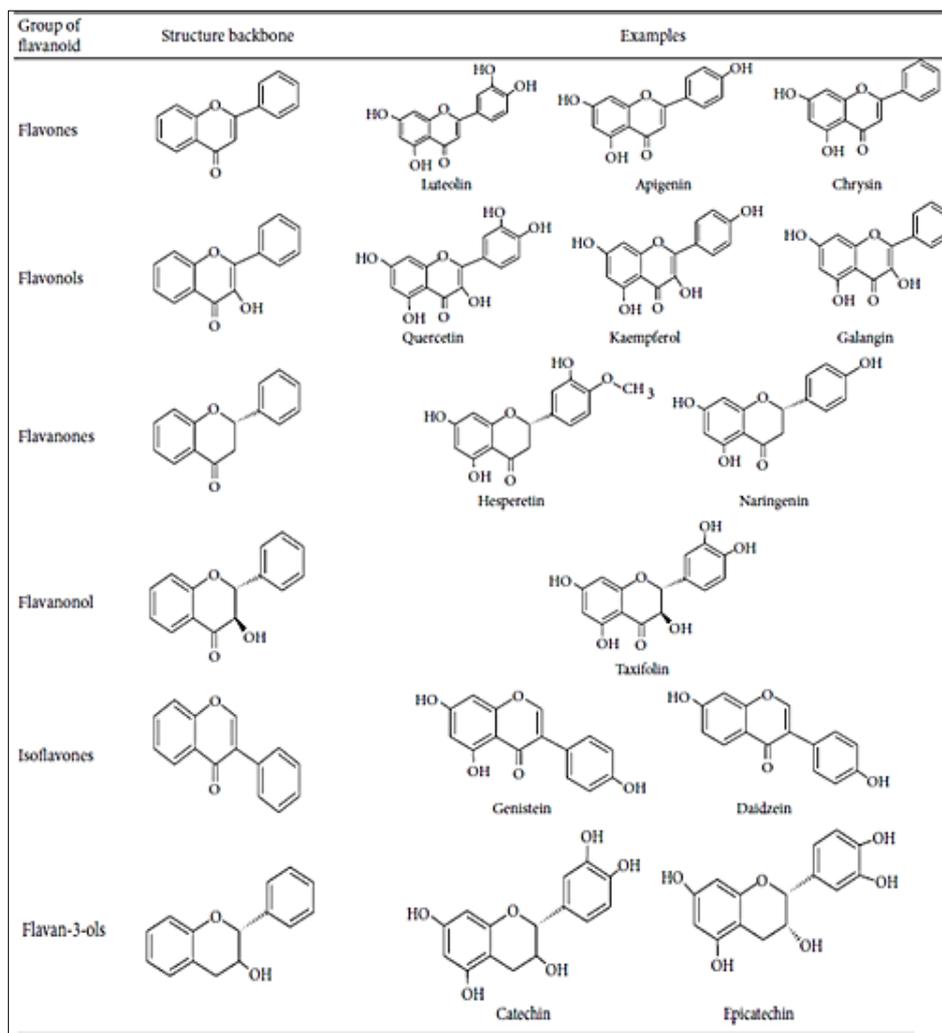
c. Kandungan

Umumnya propolis mengandung resin (50%), wax (30%), minyak esensial (10%), polen (5%), dan komponen organik lain (5%) (Ramos & Miranda, 2007; Viuda-Martos *et al.*, 2008). Rata-rata kandungan masing-masing senyawa dalam propolis dapat beragam tergantung dari : 1) Sumber makanan lebah penghasil propolis, 2) Iklim, 3) Kondisi lingkungan sekitar dimana lebah itu tinggal (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

Banyak metode analisis yang telah dilakukan untuk memisahkan dan mengidentifikasi komponen propolis. Diantara komponen organik ditemukan beberapa golongan senyawa polifenol seperti asam benzoat dan turunannya, alkohol sinamit, asam sinamit beserta turunannya, sesquiterpen dan hidrokarbon triterpen; benzaldehid dan turunannya; alkohol, keton, dan senyawa heteroaromatic; terpen, alkohol sesquiterpen dan turunannya; hidrokarbon alifatik; beberapa mineral; sterol dan hidrokarbon steroid; gula dan asam amino (Bankova, 2005; Viuda-Martos *et al.*, 2008; Wagh, 2013).

Mineral yang terkandung dalam propolis yaitu Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn, Mn, F dan beberapa vitamin seperti B1, B2, B6, C, E, dan asam lemak. Beberapa enzim berhasil diisolasi dari propolis yaitu suksinat dehidrogenase, glukosa-6-fosfat, adenosin trifosfat, dan asam fosfatase (Marcucci, 1995; Lotfy, 2006).

Senyawa terbanyak terkandung dalam propolis adalah *flavonoid* (Burdock, 1998; Huang *et al.*, 2014). *Flavonoid* merupakan senyawa turunan dari golongan polifenol. *Flavonoid* berkontribusi besar terhadap efek terapi dari propolis yaitu antioksidan, antibakteri, antivirus, antifungal dan antiinflamasi (Huang *et al.*, 2014). Menurut Huang *et al.* (2014), *flavonoid* dalam propolis diklasifikasikan berdasar struktur kimianya menjadi *flavones*, *flavonols*, *flavanones*, *flavanonols*, *isoflavones*, dan *flavan-3-ol*.



Gambar 2. Struktur Kimia Derivat *Flavonoid*
Sumber : (Kumar & Pandey, 2013)

d. Kemanfaatan dalam aspek kesehatan

1) Antioksidan

Salah satu peran penting yang dimiliki oleh makanan sehat adalah kemampuan antioksidan (antioksidan berkontribusi dalam pencegahan penyakit tertentu antara lain penyakit kardiovaskular, kanker, dan diabetes). Hal ini berkaitan dengan bagaimana menjaga sel tubuh agar tidak rusak oleh oksidan (radikal bebas). Radikal bebas atau agen oksidatif memiliki peran dalam pembentukan toksin (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

Radikal bebas adalah molekul, atom yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Molekul tersebut bersifat labil dan mudah membentuk senyawa baru. Radikal bebas ini menyebabkan kerusakan oksidatif pada tingkat biomolekul seperti karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat (Ames *et al.*, 1993). Kerusakan oleh radikal bebas berakibat pada penuaan sel, mutagenesis, karsinogenesis, berkembangnya penyakit Parkinson dan Alzheimer, meningkatnya resiko penyakit kardiovaskular dikarenakan oksidasi pada lipoprotein LDL (Gorecka *et al.*, 2014).

Kemampuan antioksidan dari propolis utamanya dikarenakan kandungan fenol dan *flavonoid* (Aljadi & Kamaruddin, 2004). Kandungan polifenol memiliki kemampuan menghambat enzim yang berperan dalam pembentukan oksigen yang reaktif. Polifenol

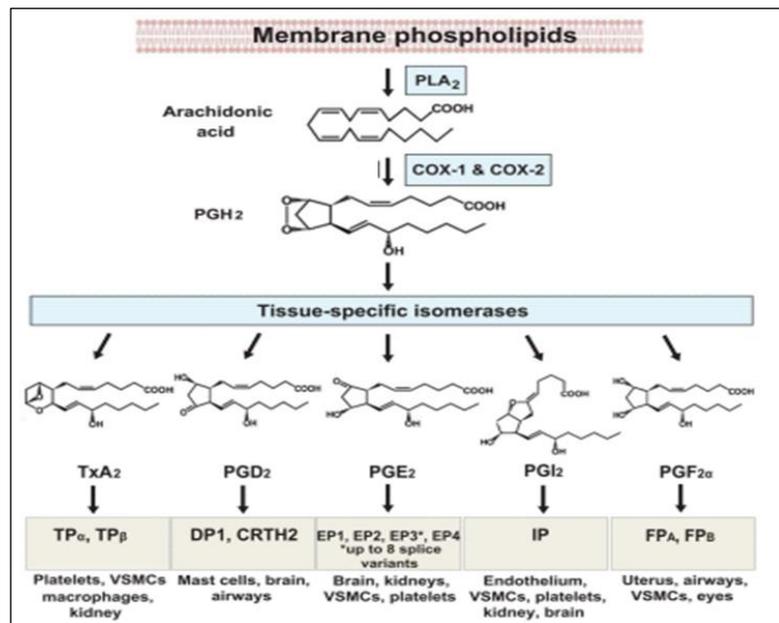
dapat menghambat aktivitas enzim *xanthine oxidase* yang berperan dalam pembentukan radikal bebas anion superoksida. Polifenol juga menghambat enzim lainnya, antara lain protein kinase C, asam askorbat oksidase, siklooksigenase (COX-1 dan COX-2), lipooksigenase, Na^+ / K^+ ATPase, cAMP phosphodiesterase. Aktivitas menghambat enzim oksidasi dapat menghambat pembentukan wujud oksigen yang reaktif (Gorecka *et al.*, 2014).

2) Anti-inflamasi

Inflamasi adalah respon biologis kompleks oleh jaringan vaskular dari stimulus yang membahayakan seperti patogen, sel yang rusak, iritan, dan radikal bebas. Reaksi inflamasi dalam tubuh makhluk hidup berperan dalam menyingkirkan stimulus yang membahayakan serta mengawali proses penyembuhan.

Reaksi inflamasi dimulai dari adanya agen kausa didalam tubuh. Pelepasan sitokin (IL-1, TNF- α) oleh makrofag menyebabkan pelebaran pembuluh darah dikarenakan relaksasi otot polos kapiler sehingga aliran darah pada daerah inflamasi meningkat (Armutcu *et al.*, 2015). Perubahan mikrovaskuler berupa meningkatnya permeabilitas kapiler berlangsung, menyebabkan akumulasi sel-sel fagositik (neutrofil, monosit, makrofag) (Ramos dan Miranda, 2007; Armutcu *et al.*, 2015). Secara bersamaan sel mast, sel fagosit, dan sel endotel menggunakan lipid membran plasma untuk menghasilkan mediator inflamasi penting. Pada tahap selanjutnya,

beberapa fosfolipase intraseluler dan ekstraseluler diaktifkan oleh membran fosfolipid dan mengaktifkan enzim yang lain, yaitu siklooksigenase-1 (COX-1), siklooksigenase-2 (COX-2), dan lipooksigenase (LOX). Enzim siklooksigenase dan lipooksigenase akan memetabolisme asam arakhidonat dan *eicosanoid* untuk menghasilkan mediator inflamasi (prostaglandin dan leukotrin). Mediator inflamasi bertugas mempertahankan terjadinya proses inflamasi (Ramos dan Miranda, 2007).



Gambar 3. Jalur Inflamasi
Modifikasi dari : Ricciotti & FitzGerald, 2011

Banyak studi yang mengemukakan bahwa propolis mempunyai kemampuan sebagai anti-inflamasi. Sifat ini pada dasarnya dikarenakan adanya beberapa turunan senyawa *flavonoid* yang terkandung pada propolis. Galangin dapat menghambat aktivitas siklooksigenase dan lipooksigenase, menekan ekspresi isoform

COX-2 (Viuda-Martos *et al.*, 2008). *Caffeic acid phenetyl ester* (CAPE) adalah turunan *flavonoid* lain yang memiliki kemampuan antiinflamasi dikarenakan CAPE menghambat pelepasan asam arakhidonat oleh membran sel, sehingga mediator inflamasi tidak akan terbentuk (Armutcu *et al.*, 2015).

3) Antivirus

Beberapa studi *in vitro* mengungkapkan bahwa propolis memiliki kemampuan untuk menghambat perkembang-biakan virus. Efek antivirus propolis meliputi mengurangi multiplikasi virus bahkan patogenitas virus tersebut.

Substansi yang diisolasi dari propolis memiliki sifat antiviral, sebagai contoh, isopentyl ferulat dapat menghambat aktivitas infeksi dari Hongkong virus A (Serkedjieva *et al.*, 1992). Dua senyawa golongan *flavonoid* yang ditemukan pada propolis yaitu chrysin dan campherol telah dipelajari dan terbukti aktif dalam menghambat replikasi herpes virus, adenovirus, dan rotavirus.

4) Antibakteri

Aktivitas antibakteri dari propolis bersifat spektrum luas melawan bakteri gram positif dan gram negatif berbentuk batang dan kokus. Aktivitas antibakteri propolis disebabkan oleh kandungan flavonon pinocembrin, flavonol galangin (Cushnie & Lamb 2005). Kandungan antibakteri propolis ditambahkan oleh Takaishi & Schilcer (1994), yang menyatakan bahwa *caffeic acid*

phenethyl ester (CAPE) yang dapat menghambat RNA polimerase bakteri.

Menurut Cushnie & Lamb (2005), galangin memiliki pengaruh terhadap integritas sitoplasma *S.aureus*. Penelitian dilakukan dengan menghitung jumlah kehilangan potassium interseluler. Ketika *S.aureus* dengan densitas tinggi diinkubasi selama 12 jam dalam media yang mengandung 50 g/ml flavonol, dapat dihitung bahwa ada penurunan jumlah CFU sebanyak 60 kali lipat dan sel kehilangan potassium 20% lebih banyak dibanding kelompok tanpa perlakuan. Data ini menunjukkan bahwa galangin dapat merusak membran sel bakteri dan menyebabkan sel kekurangan potassium.

5) Antifungal

Daya antifungal propolis melawan *dermatophytes* dan *Candida sp.* telah diketahui karena peran dari *flavonoid*, khususnya galangin. Galangin telah terbukti memiliki daya hambat terhadap *Aspergillus tamaris*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* (Cushnie & Lamb, 2005)

6) Antiprotozoa

Scheller *et al.* (1997), melaporkan kemampuan antiprotozoa dari ekstrak etanol propolis (EEP) *in vitro* pada tiga strain *Trichomonas*

vaginalis. Pemberian EEP memberikan efek lethal pada ketiga strain tersebut pada dosis 150 mg/ml.

7) Antidiabetik

Diabetes mellitus merupakan suatu kelainan metabolisme karbohidrat dalam tubuh. Diabetes ditandai dengan hiperglikemia dan glukosuria dikarenakan defisiensi hormon insulin yang bersifat relatif atau absolut. Hiperglikemia merupakan dampak dari berkurangnya glukosa yang masuk ke jaringan untuk dimetabolisme dan meningkatnya pelepasan glukosa ke peredaran darah dari hepar, sedangkan glukosuria disebabkan oleh berkurangnya kemampuan ginjal dalam reabsorpsi glukosa (Sforcin & Bankova, 2011).

Menurut Matsushige *et al.* (1996), ekstrak air propolis (200 mg/kgBB) menunjukkan adanya efek preventif pada kerusakan sel pankreas dengan menghambat sintesis IL-1 dan turunan *nitric oxide* (NO). Pada riset yang lain, Babatunde *et al.* (2015), mengemukakan bahwa EEP (200 dan 300 mg/kgBB) memiliki kemampuan menurunkan kadar gula darah pada tikus galur Wistar penderita diabetes yang diinduksi dengan *alloxan*. Penurunan kadar gula darah yang signifikan terlihat selama 28 hari pemberian EEP secara oral.

8) Antitumor

Aktivitas kemopreventif propolis pada hewan uji dan kultur sel kemungkinan dikarenakan kemampuan menghambat sintesis DNA pada sel tumor, kemampuan menginduksi apoptosis sel tumor, dan kemampuan mengaktifkan makrofag untuk menghasilkan faktor yang dapat mengatur fungsi sel B, T, dan NK. Kandungan polifenol pada propolis memiliki aktivitas antimetastasis (Wagh 2013).

2. Lanceng (*Apis trigona*)

Apis trigona adalah salah satu spesies lebah yang tidak memiliki sengat (*stingless bee*). Lebah tanpa sengat umumnya ditemukan di negara dengan iklim tropis dan subtropis di belahan bumi selatan, salah satunya Indonesia (Michener, 2007). Masyarakat pulau jawa umumnya menyebut lebah ini dengan sebutan lanceng, klanceng, atau kelulut.

Berikut ini adalah klasifikasi taksonomi dari lebah *Apis trigona*, yaitu (Weiss & Vergara, 2002) :

Kingdom : *Animalia*
 Filum : *Arthropoda*
 Kelas : *Insecta*
 Ordo : *Hymenoptera*
 Family : *Apidae*
 Genus : *Apis*
 Spesies : *Apis Trigona*



Gambar 4. *Apis trigona*
Diambil dari : Peternakan lanceng kecamatan Nglipar, kabupaten
Gunungkidul, DIY

3. Sitotoksisitas EEP

Propolis merupakan salah satu bahan obat herbal yang memiliki banyak efek terapi. Obat herbal sendiri merujuk kepada material yang berasal dari sebagian atau keseluruhan bagian tumbuhan untuk mengobati luka dan penyakit (Maiti *et al.*, 2011). Toksisitas oleh bahan herbal pertama kali dilaporkan oleh Galen, seorang dokter dan farmasis Yunani. Galen menyebutkan bahwa bahan herbal tidak hanya mengandung bahan yang berguna untuk kesehatan tetapi juga mengandung bahan yang berbahaya (Ifeoma & Oluwakanyinsola, 2013).

Tumbuhan herbal dapat bersifat toksik karena menghasilkan metabolik sekunder yang sifatnya toksik sebagai mekanisme pertahanan dari kondisi yang tidak diinginkan. Mekanisme ini berfungsi melindungi tumbuhan dari serangga herbivora yang mana juga dapat berdampak buruk bila dikonsumsi oleh manusia. (Ifeoma & Oluwakanyinsola, 2013).

Ifeoma & Oluwakanyinsola (2013), menambahkan bahwa penyebab lain bahan herbal dapat bersifat toksik karena memiliki kandungan logam berat seperti merkuri, arsen, timah dan kadmium.

Uji sitotoksitas EEP yang pernah dilakukan oleh Jahromi *et al.* (2014), pada kultur fibroblas menunjukkan bahwa EEP dengan konsentrasi 1mg/ml menyebabkan viabilitas kultur sebesar 75%. Persentase ini menurut Jahromi bersifat sitotoksik ringan.

4. Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas pada kultur sel (*in vitro*) adalah uji biokompatibilitas yang paling awal dilakukan untuk menilai toksisitas suatu bahan baru yang sedang dikembangkan (Dewi, 2007). Toksisitas dari suatu material yang digunakan dalam kedokteran gigi berkaitan dengan viabilitas sel (jumlah sel yang hidup). Pengamatan terhadap viabilitas sel fibroblas dalam kultur dapat digunakan sebagai salah satu indikator untuk mengetahui pengaruh konsentrasi dan waktu paparan suatu substansi, termasuk efek sitotoksiknya. Salah satu metode perhitungan untuk menentukan persentase viabilitas sel adalah *MTT assay*.

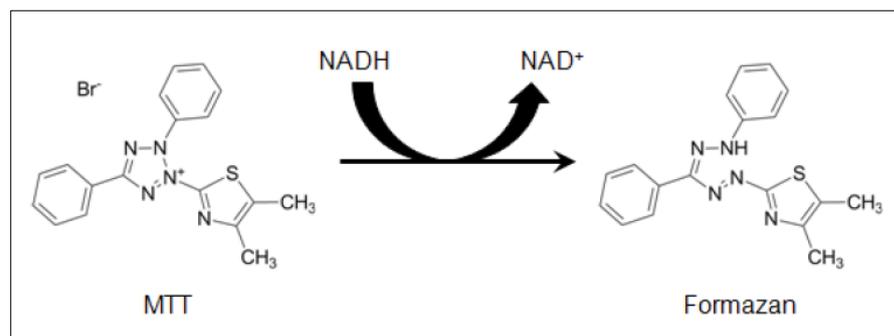
MTT assay adalah metode perhitungan kolorimetrik, yang berdasar pada reaksi reduksi garam tetrazolium kuning 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide menjadi kristal formazan ungu yang bersifat tidak larut. Reduksi ini hanya dapat terjadi pada sel yang hidup dan terjadi di mitokondria melibatkan enzim suksinat dehidrogenase

(Chung *et al.*, 2015; Gopakumar & Nair, 2015). Kristal formazan yang terbentuk dilarutkan terlebih dahulu dengan pelarut organik seperti isopropanol, kemudian dikuantifikasi dengan *ELISA Reader* dan diukur dalam bentuk absorbansi (Frión-herrera *et al.*, 2014). Hasil perhitungan viabilitas sel dinyatakan dalam bentuk persentase (%). Persamaan untuk menghitung viabilitas sel adalah sebagai berikut :

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\text{AER Kelompok Perlakuan}}{\text{AER Kontrol Sel}} \times 100\%$$

AER : Besar absorbansi menggunakan *ELISA Reader*

Prinsip uji sitotoksitas dengan metode MTT adalah kemampuan sel hidup merubah garam tetrazolium kuning 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide menjadi kristal formazan ungu. Reduksi ini hanya dapat terjadi oleh enzim suksinat dehidrogenase pada mitokondria sel yang hidup.



Gambar 5. Struktur MTT dan Formazan beserta reaksinya
Sumber : (Riss *et al.*, 2013)

Besarnya efek sitotoksik ketika pemberian paparan terhadap suatu kultur sel bersifat *dose-dependent*. *Dose-dependent* memiliki arti bahwa

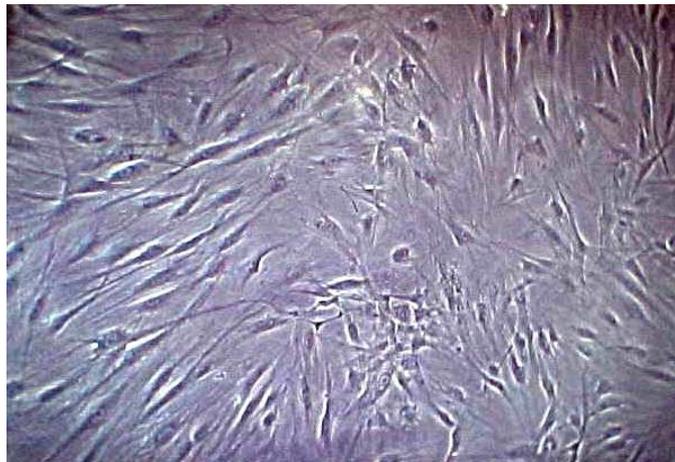
semakin besar konsentrasi paparan yang diberikan akan menyebabkan persentase viabilitas sel semakin kecil. Kriteria sitotoksitas berdasarkan persentase viabilitas menurut Jahromi *et al.* (2014), adalah sebagai berikut:

>90%	= biokompatibel
60-90%	= toksik ringan
30-59%	= toksik sedang
<30%	= toksik berat

5. Kultur Fibroblas

Teknik kultur sel biasa digunakan dalam studi mengenai ekspresi gen dan uji toksisitas (Wanichpakorn & Laggat, 2010). Sekarang ini, kultur sel primer dari jaringan yang ada di rongga mulut manusia memiliki banyak pengaplikasian untuk riset *oral biology*, termasuk studi tentang proses differensiasi sel, efek obat-obatan, dan analisa kromosom. Salah satu uji biokompatibilitas secara *in vitro* yang dapat digunakan dan memenuhi standar sesuai pertimbangan faktor etis, praktis dan ekonomis yaitu uji sitotoksitas pada kultur sel.

Fibroblas adalah sel utama jaringan ikat yang terdapat pada kulit, mukosa, jaringan pulpa, dan lain-lain. Sel fibroblas memiliki ciri-ciri berbentuk sel yang memanjang dengan batas sel yang tidak jelas (Badawy *et al.*, 2005).



Gambar 6. Sel Fibroblas
(Sumber : Badawy *et al.*, 2005)

6. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu atau beberapa zat dari suatu bentuk padat atau cair dengan bantuan bahan pelarut. Ekstraksi biasanya digunakan untuk mengambil saripati dari suatu substrat. Macam-macam metode ekstraksi antara lain, maserasi, *ultrasound - assisted solvent extraction*, perkolasi, soxhlet, serta reflux dan destilasi uap (Mukhriani, 2014)

a. Maserasi

Maserasi dilakukan dengan cara mencampur bahan mentah dan pelarut yang kemudian disimpan dalam wadah di ruangan tanpa cahaya. Penyimpanan dalam ruangan tanpa cahaya juga dilakukan pengendalian, dengan cara mengaduk campuran antara bahan mentah dan pelarut sehingga kandungan senyawa kimia dapat terambil seluruhnya.

b. Ultrasound - Assisted Solvent Extraction

Merupakan modifikasi dari teknik maserasi. Perbedaannya terletak pada alat yang digunakan. Alat yang digunakan dalam Ultrasound - Assisted Solvent Extraction adalah ultrasound.

c. Perkolasi

Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah wadah silinder yang memiliki kran pada bagian bawahnya (perkolator). Pelarut ditambahkan pada bagian atas sampel dan kemudian dibiarkan tetesannya mengalir ke bawah.

d. Soxhlet

Metode ini dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam kertas saring yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu pemanas diatur di bawah suhu Reflux.

e. Reflux dan Destilasi Uap

Pada metode Reflux, bahan mentah dimasukkan bersama pelarut ke dalam labu Erlenmeyer yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih, kemudian terkondensasi dan kembali ke dalam labu Erlenmeyer. Pada metode Destilasi uap, proses yang dilalui hampir sama dengan Reflux dan biasanya digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial. Selama pemanasan, uap terkondensasi dan destilat ditampung dalam wadah yang terhubung dengan kondensor.

B. Landasan Teori

Apis trigona adalah salah satu spesies lebah tanpa sengat. Lebah ini memproduksi madu, *bee pollen*, royal jelly, lilin lebah (*bees wax*), dan propolis. Propolis berasal dari getah pohon dan digunakan lebah untuk menutup lubang pada sarangnya.

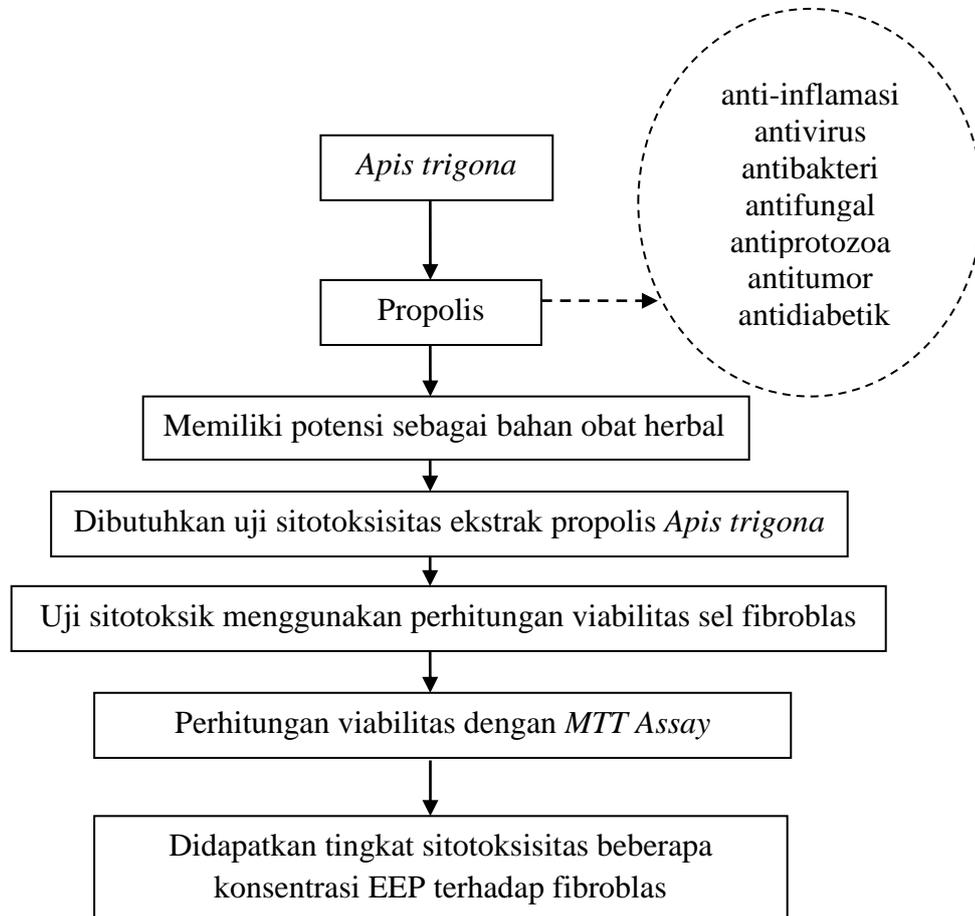
Kandungan propolis utamanya mengandung resin (50%), *wax* (30%), minyak esensial (10%), polen (5%), dan komponen organik lain (5%). Diantara komponen organik ini dapat ditemukan fenol dan ester, *flavonoid* dalam berbagai macam bentuk (*flavonol*, *flavon*, *flavonon*, *dihydroflavonol*, dan *kalkon*), terpen, beta-steroid, aldehyd aromatik, dan alkohol.

Berbagai penelitian membuktikan propolis memiliki kemampuan anti-inflamasi, antivirus, antibakteri, antifungal, antiprotozoa, antitumor dan antidiabetik (Viuda-Martos *et al.*, 2008; Wagh, 2013). Propolis *Apis trigona* memiliki potensi dijadikan bahan obat karena manfaatnya yang sangat besar. Semua material yang digunakan sebagai bahan obat wajib dilakukan uji toksisitas.

Uji toksisitas awal yang biasa dilakukan yaitu uji sitotoksitas dengan mengamati viabilitas sel dalam kultur. Salah satu jenis sel yang bisa digunakan yaitu fibroblas. Fibroblas adalah sel utama jaringan ikat yang terdapat pada kulit, mukosa, jaringan pulpa, dan lain-lain. Fibroblas dikultur dalam *96-well plate*, kemudian kultur diberi perlakuan dengan

pemberian EEP berbagai konsentrasi. Perhitungan viabilitas fibroblas dilakukan dengan teknik *MTT assay*. Jumlah viabilitas sel dinyatakan dalam bentuk persentase.

C. Kerangka Konsep



Keterangan:

- = Variabel diteliti
 = Variabel tidak diteliti

D. Hipotesis

Terdapat *dose-dependent cytotoxicity* EEP *Apis trigona* terhadap sel fibroblas jaringan periodontal.