

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Propolis

a. Pengertian



Gambar 1. Propolis *Apis Trigona*

Propolis berasal dari bahasa Yunani “*pro*” yang berarti sebelum atau pertahanan dan “*polis*” yang berarti kota. Propolis dapat diartikan sebagai pertahanan kota (Parolia dkk., 2010). Propolis digunakan sebagai pertahanan untuk melindungi sarang lebah dari ancaman organisme lain. Propolis adalah material yang dihasilkan oleh lebah dari getah tumbuh-tumbuhan, pucuk daun, dan kulit pohon (Grange & Dawey, 1990). Propolis dihasilkan oleh *Apis sp* dengan cara mensekresikan resin dari berbagai macam tumbuhan dengan enzim yang dihasilkan oleh kelenjar mandibular lebah. Pada umumnya propolis memiliki titik didih 100°C. Propolis memiliki

tekstur lengket dan kenyal pada 60°-70°C dan mengeras serta rapuh pada suhu -4°C. Warna, kualitas, dan kandungan pada propolis erat kaitannya dengan letak geografis, tempat tinggal, serta sumber vegetasi lebah (Kuropatnicki dkk., 2013).

b. Sejarah Penggunaan

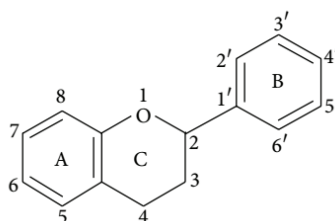
Propolis telah dikenal dan digunakan sejak berabad-abad yang lalu. Bangsa Romawi dan bangsa Arab menggunakan propolis sebagai bahan pengobatan. Bangsa Yahudi juga menggunakan propolis, yang mereka kenal dengan sebutan *tzori*, pada bidang pengobatan. Bangsa Mesir Kuno menggunakan propolis sebagai bahan untuk melukis pada ornamen, pengobatan, dan pembalsaman pada mumi. Sedangkan sekitar 400 tahun SM, bangsa Yunani menggunakan propolis sebagai bahan utama pembuatan parfum yang dikenal dengan sebutan *polyanthus*. Pada abad pertengahan, penggunaan propolis tidak lagi menjadi topik yang populer dalam bidang penelitian. Penggunaan propolis kembali menjadi pusat perhatian di Eropa bersamaan dengan munculnya teori *ad fontes* pada era *Renaissance*. Beberapa abad yang lalu, para ilmuwan akhirnya dapat benar-benar membuktikan bahwa propolis memiliki manfaat yang penting. Penelitian secara spesifik tentang kandungan kimia pada propolis dimulai pada abad ke-20 dan berlanjut hingga sekarang. (Kuropatnicki dkk., 2013).

c. Kandungan Propolis

Sejak tahun 2000, tercatat sekitar 300 senyawa kimia flavonoid, *terpenes*, dan *phenolic* yang teridentifikasi dalam propolis (Huang dkk., 2014). Greenaway dkk., (1991) sebelumnya juga telah melakukan analisis kimia dengan menggunakan GCMS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) untuk mengidentifikasi 150 kandungan dalam propolis yang memiliki efek antibakteri, antijamur, antioksidan, antivirus, dan antiinflamasi. Senyawa organik yang ditemui dalam propolis antara lain adalah senyawa fenol dan ester, flavonoid (*flavonol*, *flavones*, *flavanones*, *flavanonol*, *isoflavones*, *flavan-3-ols*), *terpenes*, *beta-steroids*, *aldehid aromatic*, alkohol, *sesquiterpenes*, dan *stilbene terpenes*. (Viuda-Martos dkk., 2008).

d. Flavonoid

Flavonoid merupakan komponen polifenol yang memiliki kerangka dasar C₁₅ (C₆C₃C₆) (Sisa dkk., 2010). Struktur dasar flavonoid adalah *2-phenyl-benzol[a]pyrane* atau *flavane nucleus* yang mengandung 2 cincin benzene (A dan B) yang dihubungkan melalui melalui cincin *heterocyclic pyrane* (Kumar & Pandey, 2013).



Gambar 2. Struktur dasar flavonoid (Kumar & Pandey, 2013)

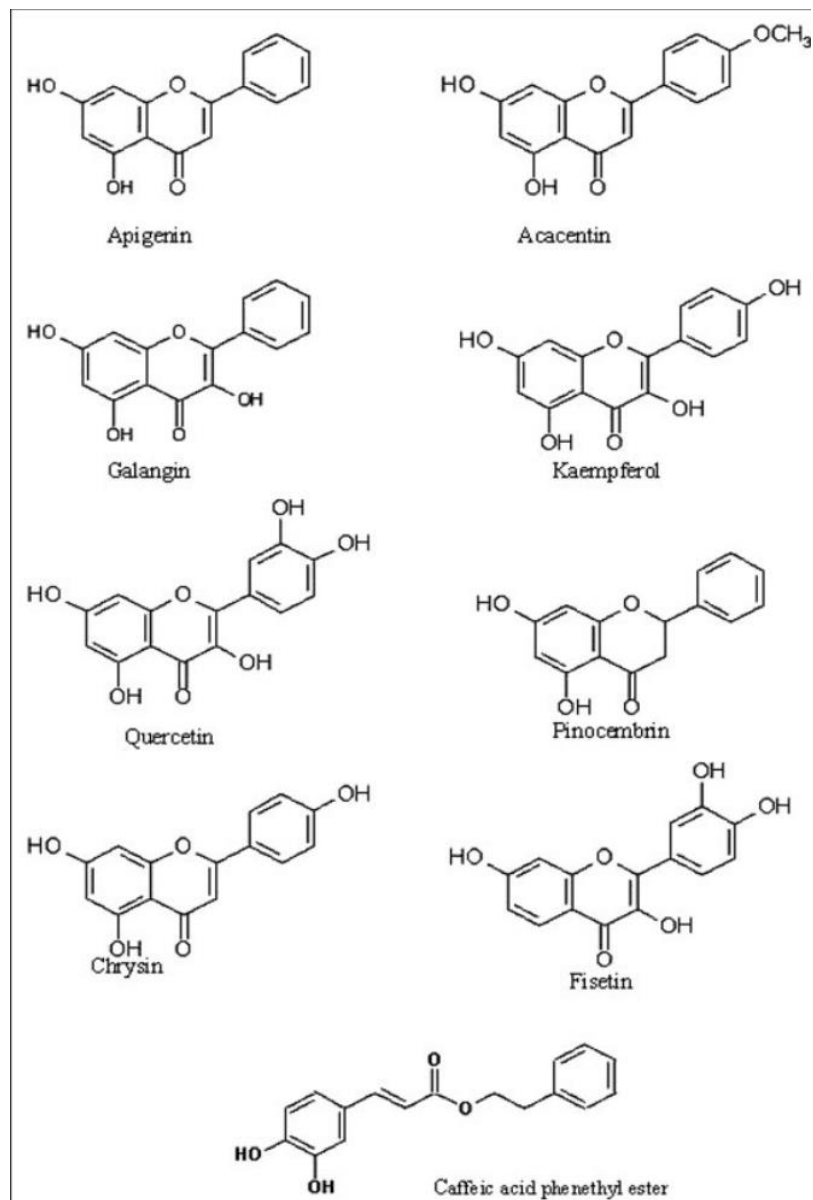
Mori dkk., (1987) menduga bahwa *B-ring* pada flavonoid dapat menginterkalasi atau membentuk ikatan hidrogen dengan susunan dasar asam nukleat yang dapat menghambat sintesis DNA dan RNA bakteri.

Group of flavanoid	Structure backbone	Examples		
Flavones				
Flavonols				
Flavanones				
Flavanonol				
Isoflavones				
Flavan-3-ols				

Gambar 3. Struktur senyawa flavonoid (Kumar & Pandey, 2013)

e. Sifat Antibakteri Flavonoid pada Propolis

Grange & Davey (1990) mengemukakan bahwa kandungan flavonoid pada propolis memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri spektrum luas terutama bakteri gram positif. Burdock 1998 *cit.* Viuda-Martos dkk., (2008) berpendapat bahwa aksi tersebut dipengaruhi oleh adanya minyak aromatik dan ester, sementara Takaisi-Kikuni & Schilcher (1994) berasumsi bahwa hal tersebut dipengaruhi oleh flavonon *pinocembrin*, flavonol *galangin*, dan *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) yang bertindak menghambat proses transkripsi DNA bakteri. Cushnie & Lamb (2005) menduga bahwa *quercetin* memiliki kemampuan dalam menghambat DNA *gyrase*. Mekanisme antibakteri pada flavonoid menurut Mirzoeva dkk., (1997) melibatkan degradasi membran sitoplasma bakteri yang mengarahkan pada hilangnya ion-ion potasium sehingga memprovokasi autolisis pada bakteri. Scazzocchio dkk., (2006) juga menyatakan bahwa *quercetin*, *galangin*, *pinocembrin*, *caffeic acid*, *benzoic acid*, dan *cinnamic acid* yang terdapat pada ekstrak etanol propolis diduga memiliki aksi yang menyebabkan kerusakan pada struktur dan fungsi dinding sel bakteri.



Gambar 4. Struktur senyawa kimia flavonoid yang mayoritas ditemukan pada madu dan propolis (Viuda-Martos dkk., 2008)

Beberapa flavonoid seperti *apigenin flavone*, *flavonol glycosides isoflavones*, *flavonones*, dan *chalcones* memiliki potensi sebagai antibakteri. *Robinetin*, *myricetin*, dan *epigallocatechin* dapat menghambat sintesis DNA pada *Proteus vulgaris* (Kumar & Pandey, 2013).

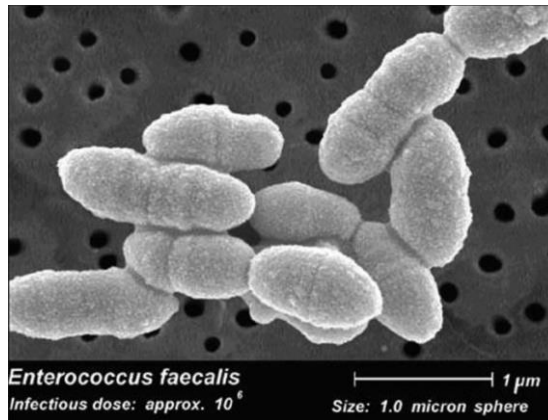
2. *Enterococcus faecalis*

Pada tahun 1930, Lancefield mengelompokkan *Enterococci* sebagai *Streptococci* grup D. Kemudian pada tahun 1984, *Enterococci* dikelompokkan ke dalam genusnya sendiri yaitu *Enterococcus* (Schleifer & Balz, 1984).

a. Fisiologi

Enterococcus faecalis adalah bakteri kokus, gram positif, fakultatif anaerob yang bersifat patogen oportunistik. Bakteri ini merupakan bakteri non-motil yang tidak memproduksi spora (Zhang dkk., 2013). *Enterococcus faecalis* toleran terhadap kondisi alkali, NaCl, dan suhu ekstrim hingga 60°C selama 30 menit (Ramsey dkk., 2014) dan dapat tumbuh pada NaCl 6.5% (Pinheiro & Mayer, 2014). Bakteri ini juga memiliki kation homeostatis yang diduga berkontribusi terhadap resistensi pH alkali, metal, dan proses desikasi atau pengeringan (Peciulienė dkk., 2008).

b. Klasifikasi Ilmiah



Gambar 5. *Enterococcus faecalis* (Moghadas dkk., 2013)

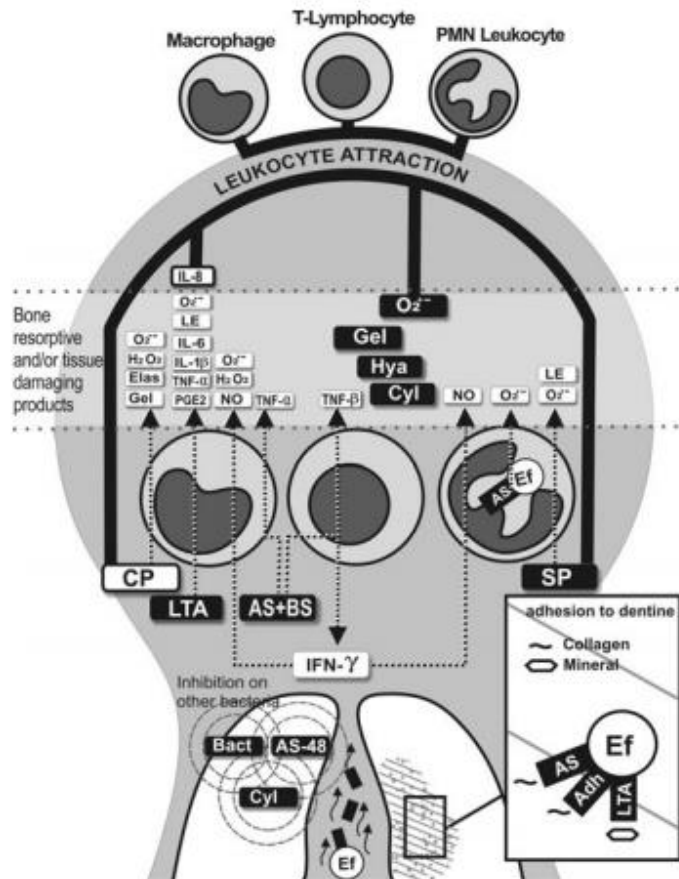
Berikut adalah taksonomi bakteri *Enterococcus faecalis* berdasarkan Schleifer & Kilpper-Balz (1984):

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Fillum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Lactobacillales</i>
Family	: <i>Enterococcacea</i>
Genus	: <i>Enterococcus</i>
Spesies	: <i>Enterococcus faecalis</i>

c. Patogenesis dan Faktor-faktor Virulensi

Enterococci dapat menjadi penyebab penyakit seperti endocarditis, septicemia, meningitis, dan infeksi lain pada manusia. *Enterococcus faecalis* memiliki kemampuan khusus dalam menginvasi tubulus dentinalis dan melekat pada permukaan dentin (Shailaja & Suresh, 2014).

Perubahan patologi pada bakteri *E. faecalis* dapat terjadi secara langsung melalui produksi toksin atau atau tidak langsung melalui induksi inflamasi (Kayaoglu & Orstavik, 2004).



Gambar 6. Model penyakit endodontik terkait dengan faktor virulensi *E. faecalis* (Kayaoglu & Orstavik, 2004)

Faktor-faktor virulensi yang terlibat dalam infeksi endodontik antara lain adalah *aggregation substance* (AS), *surface adhesins*, *sex pheromones*, *lipoteichoic acid*, *extracellular superoxide*, gelatinase, *hyaluronidase*, dan *cytolysin* (*hemolysin*). *Aggregation substance* (AS) merupakan faktor yang membentuk biofilm diduga menjadi faktor penyebab bakteri resisten terhadap kalsium hidroksida (Ca(OH)₂). *Lipoteichoic acid* (LTA) membantu bakteri *E. faecalis* dalam

membentuk koloni pada permukaan akar dan mengkontaminasi saluran akar. Selain itu, LTA yang ditemukan pada *E. faecalis* dan bakteri gram positif lainnya dapat menstimulasi leukosit melepaskan beberapa mediator yang diketahui berperan dalam fase respon inflamasi. AS (*Aggregation Substance*) dan Adh (*Surface adhesins*) memiliki peran pada perlekatan kolagen (Kayaoglu & Orstavik, 2004).

Enterococcus faecalis dapat bertahan pada kondisi yang umumnya tidak menguntungkan bagi bakteri lain seperti lingkungan dengan kadar garam tinggi dan temperatur di atas 40°C. Di dalam rongga mulut, *E. faecalis* sering diisolasi pada pasien yang mengalami infeksi sekunder jaringan periradikuler. *E. faecalis* yang diisolasi dari rongga mulut memiliki elemen genetik yang berbeda dari *E. faecalis* yang diisolasi dari infeksi nosokomial. *E. faecalis* memiliki faktor virulensi yang berhubungan dengan adesi yaitu ekspresi gen *gelE* dan pembentukan biofilm yaitu Ace, Agg, dan EfaA (Pinheiro & Mayer, 2014).

Faktor virulensi *E. faecalis* lainnya adalah *bacteriocins*. *Bacteriocins*, disintesis dari ribosom, adalah peptida ekstraseluler yang melepaskan zat antimikroba sehingga ia mampu bersaing dengan mikroba lain. Selain itu *extracellular surface protein* (Esp), protein yang terdapat pada dinding sel, berkontribusi pada pembentukan biofilm (Fisher & Phillips, 2009).

d. Mekanisme Resistensi

Menurut Hollenbeck & Rice (2012) mekanisme resistensi pada bakteri *Enterococcus faecalis* terjadi melalui dua cara yaitu intrinsik dan diperoleh (*acquired*). Mekanisme secara intrinsik biasanya ditemukan pada genom spesies tertentu sedangkan secara *acquired* biasanya terjadi melalui pengambilan material genetik baru atau mutasi sporadik menjadi gen intrinsik.

3. *Trigona*

Dalam buku *The Little Book of Bees*, Weiss & Vergara (2002) menyebutkan bahwa terdapat lebih dari 20.000 spesies lebah di dunia. Diantara spesies tersebut, terdapat dua spesies lebah yang tidak memiliki sengat (*stingless bee*) yaitu *Melliponi sp* dan *Apis trigona*. Klasifikasi ilmiah lebah *Apis trigona*:



Gambar 7. Lebah *Apis Trigona*

Divisi : *Animalia*

Filum : *Arthropoda*

Kelas : *Insekta*

Ordo : *Hymenoptera*

Famili : *Apidea*

Genus : *Trigona*

Spesies: *Trigona sp.*

4. Ekstraksi

Ekstraksi adalah metode yang digunakan untuk memisahkan suatu zat kompleks dengan pelarut terhadap material yang memiliki kelarutan berbeda. Ekstrak adalah sediaan yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian hampir semua pelarut diuapkan dan massa yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Hal terpenting dari ekstraksi adalah metode dan pemilihan pelarut, karena hal tersebut erat kaitannya dengan senyawa yang akan kita pisahkan (Mohrig dkk., 2010).

Berikut ini adalah beberapa metode dipakai oleh Trusheva dkk., (2007) untuk mengekstrak propolis:

a. Maserasi

Merupakan metode ekstraksi sederhana yang sering digunakan. Maserasi membutuhkan waktu yang cukup lama yaitu sekitar 2 sampai 10 hari dan beberapa senyawa dapat hilang saat proses maserasi, namun metode ini dapat menghindari rusaknya senyawa yang bersifat termolabil. Metode ini dilakukan dengan cara merendam dan mengaduk pelarut dan material atau sampel ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Ketika kesetimbangan antara

konsentrasi pelarut dan konsentrasi dalam sel sampel dicapai, proses ekstraksi dihentikan. Selanjutnya pelarut dipisahkan dari sampel dengan pengeringan dan penyaringan (Raaman, 2006).

b. Ultrasound Assisted-Solvent Extraction (UAE)

Merupakan metode maserasi yang dimodifikasi menggunakan bantuan ultrasound (sinyal dengan frekuensi tinggi, 20 kHz). Wadah berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah ultrasonic dan ultrasound untuk memberikan tekanan mekanik pada sel hingga menghasilkan rongga pada sampel. Kerusakan sel menyebabkan peningkatan kelarutan dalam senyawa pelarut dan meningkatkan hasil ekstraksi (Trusheva dkk., 2007).

c. Microwave Assisted Extraction (MAE)

Merupakan proses ekstraksi menggunakan energi microwave untuk memanaskan pelarut dengan sampel untuk memisahkan beberapa kandungan kimia dari matriks ke dalam pelarut. Penggunaan MAE untuk mengekstrak propolis dapat menurunkan kandungan fenolik pada propolis karena pengaruh proses oksidasi (Trusheva dkk., 2007). Selain metode yang telah disebutkan di atas, terdapat beberapa metode ekstraksi lain diantaranya:

a. Sokletasi

Sokletasi adalah metode yang digunakan untuk memisahkan suatu komponen yang terdapat dalam zat padat dengan cara penyaringan berulang menggunakan suatu pelarut. Proses ekstraksi ini dilakukan

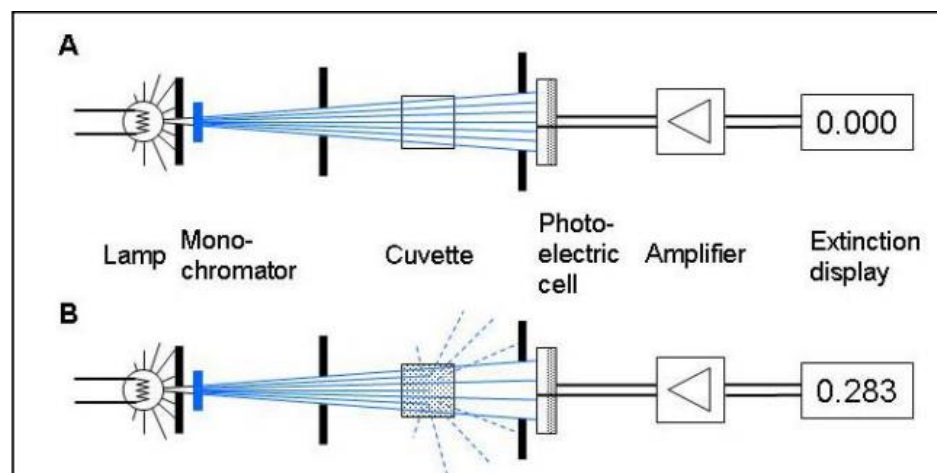
dengan alat yang disebut *thimble holder* (Waksmundzka-Hajnos dan Sherma, 2011).

b. Perkolasi

Perkolasi adalah penyarian yang dilakukan dengan suatu alat yang disebut *percolator*. Metode yang dilakukan adalah dengan cara mengalirkan cairan penyari melalui serbuk material yang telah dibasahi (Waksmundzka-Hajnos dan Sherma, 2011).

5. Spektrofotometer

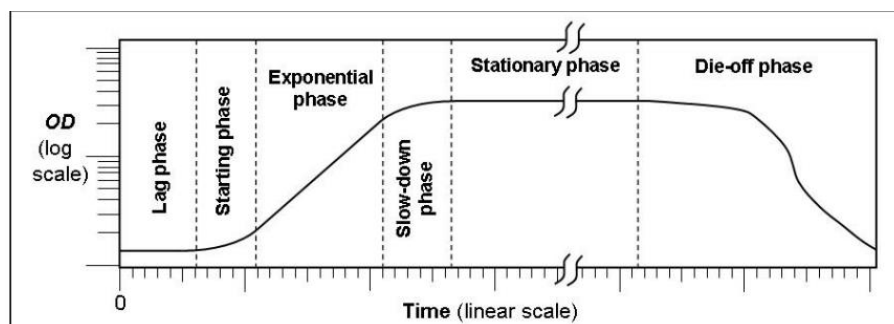
Populasi bakteri atau jumlah pertumbuhan bakteri dalam sebuah media larutan dapat diukur melalui turbiditas atau *optical density* (OD). Turbiditas dari sebuah media dapat diukur dengan suatu alat yaitu spektrofotometer (Aneja, 2003). Spektrofotometer adalah suatu alat yang digunakan untuk mengukur transmitan/ absorban sebuah sampel sebagai fungsi panjang gelombang (Ambasta, 2006). Prinsip penggunaan spektrofotometer adalah berdasarkan penangkapan cahaya dengan panjang gelombang tertentu melalui larutan yang mengandung kontaminan. Panjang gelombang yang dapat digunakan adalah cahaya tampak, gelombang ultraviolet, dan inframerah (Widdel, 2007). Menurut Todar (2005) metode pengukuran ini sangat sederhana, cepat, dan tidak destruktif, akan tetapi pada pengukuran bakteri sensitivitasnya terbatas hanya pada konsentrasi 10^7 sel/ml.



Gambar 8. Pengukuran *Optical Density* (OD) sebuah kultur dengan spektrofotometer. (A) Hasil OD menunjukkan angka 0 apabila terdapat media yang steril dan jernih. (B) Apabila terdapat sel bakteri dalam kuvet maka hasil OD menunjukkan angka tertentu sesuai dengan cahaya yang dipencarkan (Widdel, 2007).

Pada penggunaan spektrofotometer terdapat beberapa hal yang perlu dijadikan pertimbangan diantaranya adalah (Widdel, 2007):

- a. Penggunaan panjang gelombang dalam pengukuran OD sangat mempengaruhi jumlah cahaya yang dapat dipencarkan. Panjang gelombang yang telah ditentukan harus digunakan secara konsisten pada pengukuran OD.
- b. *Optical Density* yang terukur tergantung pada geometri sinar, posisi kuvet, dan sel potoelektrik.
- c. *Optical Density* yang dihasilkan pada pengukuran sel bakteri merupakan hasil dari pengurangan OD media.
- d. Batas perbandingan antara OD dan kepadatan sel hanya terbatas pada $OD \leq 0,4$.



Gambar 9. Fase pertumbuhan bakteri dalam kultur (Widdel, 2007).

Waktu yang dibutuhkan oleh bakteri untuk membelah diri berbeda-beda tergantung dari karakteristik masing-masing bakteri. Bakteri pada umumnya melakukan reproduksi dengan cara membelah diri (*binary fission*). Saat bakteri diinokulasikan pertama kali pada media cair, bakteri akan mengubah metabolisme dan pola ekspresinya untuk beradaptasi dan tumbuh pada lingkungan yang baru. Tahap ini disebut juga dengan *lag phase*. Selanjutnya bakteri akan mulai membelah diri (*starting phase*) dan terus membelah (*exponential phase*). Kemudian bakteri mulai menghentikan aktivitas membelah diri ketika nutrisi dalam kultur mulai habis (*slow-down phase*) dan meningkatkan kemampuan bertahan hidup (*stationary phase*). Setelah nutrisi dalam kultur habis, bakteri akan mati (*die-off phase*) (Lamont dkk., 2006).

Hal terpenting yang harus diperhatikan dalam mengukur variabel pertumbuhan spesies *E. faecalis* menggunakan OD adalah kondisi bakteri pada fase-fase tertentu. Pada tahap *stationary phase*, hal utama yang harus diperhatikan adalah temperatur, karena sel bakteri akan mulai resisten terhadap temperatur tinggi pada tahap ini.

Selain itu, kondisi pH harus juga menjadi perhatian karena *E. faecalis* mampu bertahan pada pH basa. Resistensi *E. faecalis* terhadap pH basa diduga karena durabilitas dan impermeabilitas membran bakteri terhadap asam dan alkali. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa hal itu disebabkan oleh aktivitas membran terikat H^+ -ATPase (Fisher & Phillips, 2009).

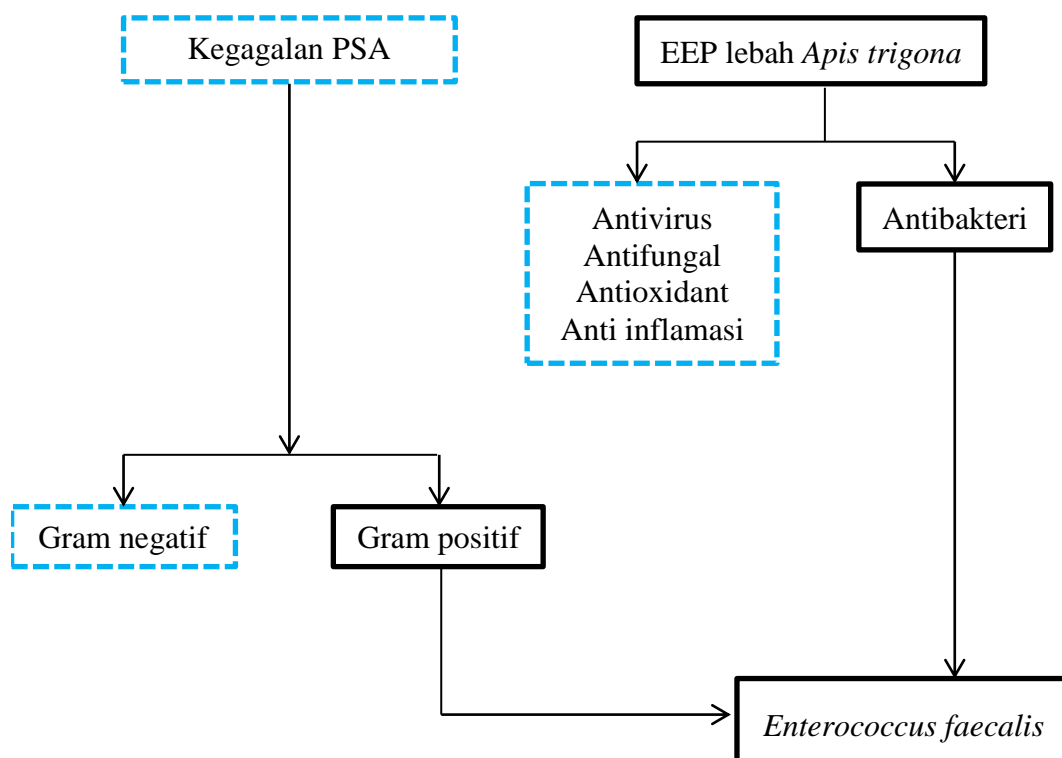
B. Landasan Teori

Perawatan saluran akar merupakan solusi untuk mempertahankan gigi yang terkena infeksi hingga jaringan pulpa, vital maupun non vital. Keberhasilan perawatan endodontic ditentukan oleh berbagai faktor. Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan PSA adalah eliminasi semua mikroorganisme yang terdapat dalam saluran akar. Apabila terdapat kesalahan dalam melakukan PSA, maka infeksi sekunder akan terjadi. Infeksi sekunder pada saluran akar didominasi oleh bakteri *Enterococcus faecalis*.

Enterococcus faecalis merupakan bakteri kokus Gram positif fakultatif anaerob. Bakteri ini dapat bertahan hidup dan berkembang biak dalam kondisi yang tidak menguntungkan bagi mikroorganisme lain seperti suhu ekstrim, pH lingkungan yang basa, dan kurangnya nutrisi. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa bakteri ini resisten terhadap beberapa agen antimikroba sedangkan beberapa agen antimikroba lain yang efektif membunuh *Enterococcus faecalis* menyebabkan iritasi terhadap host.

Propolis dapat berfungsi sebagai antijamur, antibakteri, antioksidan, antivirus, dan antiinflamasi. Senyawa dalam propolis yang berfungsi sebagai antibakteri adalah flavonoid. Fraksi flavonoid yang sering ditemukan dalam propolis adalah flavonol, *flavones*, *flavanones*, *flavanonol*, *isoflavones*, dan *flavan-3-ols*. Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa propolis memiliki daya hambat terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif.

C. Kerangka Konsep



Keterangan:

Variabel tidak diteliti : - - - - -

Variabel diteliti : _____

D. Hipotesis

Berdasarkan teori di atas didapatkan hipotesis bahwa ekstrak etanol propolis lebah *Apis trigona* dapat menghambat laju pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*.