

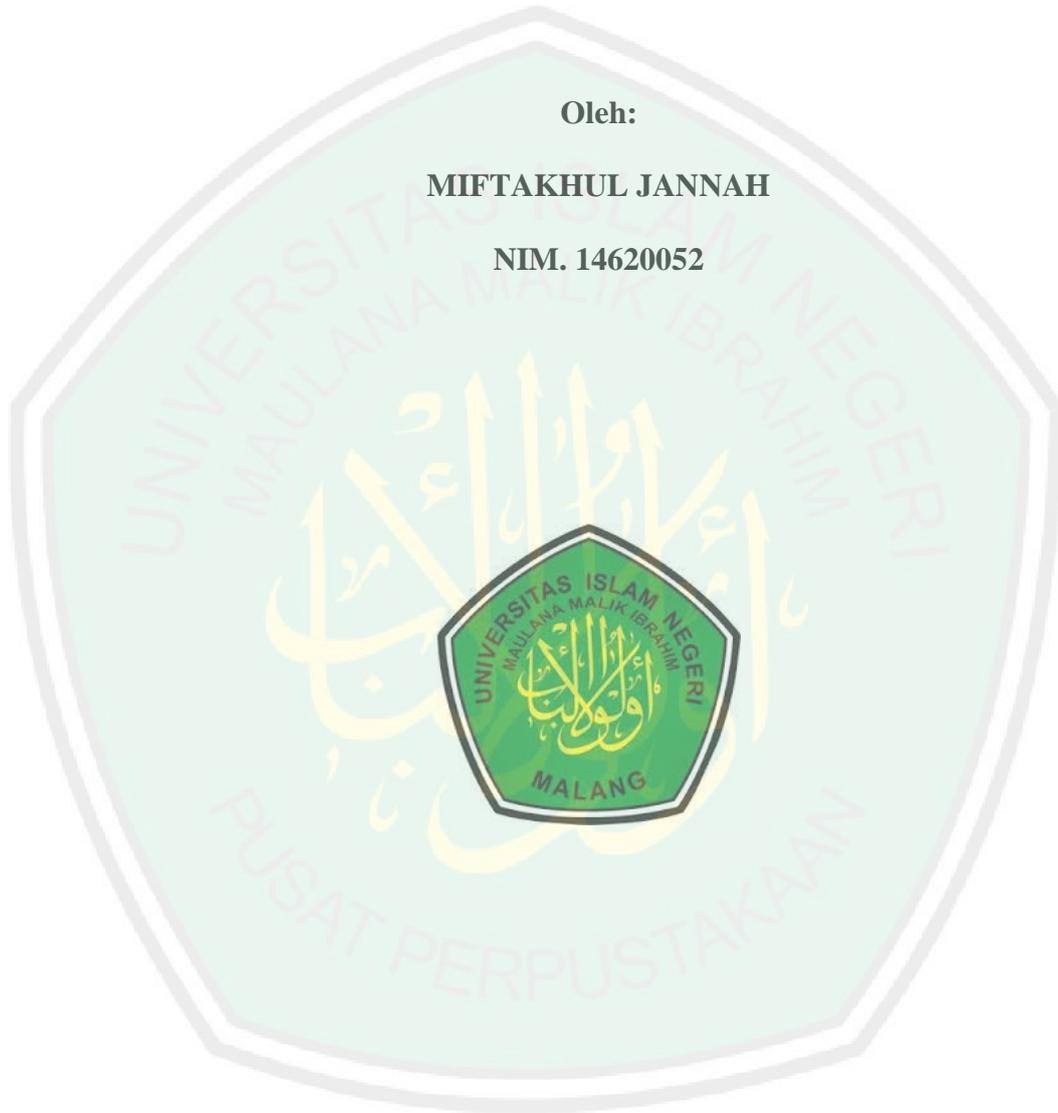
**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP
VIABILITAS DAN *NILAI POPULATION DOUBLING TIME* (PDT) SEL
OTAK TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

MIFTAKHUL JANNAH

NIM. 14620052



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP
VIABILITAS DAN NILAI *POPULATION DOUBLING TIME* (PDT) SEL
OTAK TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang untuk
Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam Memperoleh Gelar Sarjana Sains
(S.Si)**

Oleh:

MIFTAKHUL JANNAH

NIM. 14620052

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

HALAMAN PERSETUJUAN
PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP
VIABILITAS DAN NILAI *POPULATION DOUBLING TIME* (PDT) SEL
OTAK TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN VITRO*

SKRIPSI

Oleh:

MIFTAKHUL JANNAH
NIM. 14620052

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji

Tanggal: 14 Juni 2019

Pembimbing I,



Kholifah Holil, M.Si
NIP. 19751106 200912 2 002

Pembimbing II,



Umaiyatus Svarifah, M.A
NIP. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi



Romsidi, M.Si.,D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

iii

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP
VIABILITAS DAN NILAI *POPULATION DOUBLING TIME* (PDT) SEL
OTAK TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN VITRO***

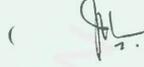
SKRIPSI

Oleh:

MIFTAKHUL JANNAH
NIM. 14620052

Telah Dipertahankan di Depan Penguji Skripsi
dan dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal: 14 Juni 2019

Penguji Utama	: Dr. Kiptiyah, M.Si NIP. 19731005 2002 12 2 003	()
Ketua Penguji	: Dr. drh. Hj. Bayyinatul M., M.Si NIP. 19710919 200003 2 001	()
Sekretaris Penguji	: Kholifah Holil, M.Si NIP. 19751106 200912 2 002	()
Anggota Penguji	: Umayyatus Syarifah, M.A NIP. 19820925 200901 2 005	()

Mengesahkan,

Ketua Jurusan Biologi



Romaidi, M.Si.,D.Sc

NIP. 19810201 200901 1 019

iii

iv

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah.. Alhamdulillah.. Alhamdulillah rabiil 'alamin..

Hanya kalimat hamdalah tersebut yang sanggup saya ungkapkan di atas kebahagiaan ini kepada Dzat Yang Maha Pemurah, Pengasih lagi Maha Penyayang, Allah SWT. karena tanpa kemurahan hati, kasih dan sayangnya saya tidak akan bisa berada di sini dengan sehat wal afiat dan dapat menyelesaikan tugas akhir ini. Serta selalu saya ungkapkan rasa syukur untuk segala ilmu yang telah saya dapatkan, mulai dari saya lahir hingga kini, baik ilmu yang diberikan di bangku kelas, maupun ilmu yang diberikan dalam kejadian kecil di kehidupan sehari-hari.

Serta tidak lupa saya ungkapkan rasa syukur atas nikmat berupa keluarga hebat yang Allah berikan. Ibu terhebat dengan segala keuletan dan kesabaran dalam membesarkan saya. Ayah terkeren sepanjang masa dengan segala kesabaran, kewelasan, humoris, dan cerita-cerita hebatnya. Adik yang sabar menghadapi saya yang bahkan tidak lebih dewasa darinya dan adik yang selalu dapat mencairkan suana. Dan keluarga besar yang selalu ada saat sedih maupun senang. Serta semua guru yang tidak pernah pelit berbagi ilmunya kepada saya, dari mulai saya kecil hingga sekarang.

Karya kecil ini saya persembahkan untuk mereka semua. Semoga Allah senantiasa Merohmati dan Meridhoi langkah kita. Amiin ya Rabbal 'alamin...

Special Thanks to:

1. Ibuku, Anna Sofiaty dan Ayahku, Sabrowi
2. Adikku, Nurul Mukaromah dan adikku, Liya Nurud Dzakiyah
3. Tanteuku yang juga Kakakku, Alm. Umi Salmah
4. Keluarga besar tercinta

“愛してくれてありがとう”

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Miftakhul Jannah

NIM : 14620052

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis Terhadap Viabilitas dan Nilai *Population Doubling Time* (PDT) Sel Otak Tikus (*Rattus norvegicus*) Secara *In Vitro*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar rujukan. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 10 Juni 2019

Yang membuat pernyataan,



Miftakhul Jannah
NIM. 14620052

MOTTO

كُلُّ عَمَلٍ فِي اللَّهِ

“行われるのは神のためであるに違いない”

“All activities carried out must be due to Allah”

"Semua yang dilakukan harus karena Allah"

Hidup di dunia ini, manusia tidak akan lepas dengan kegiatan-kegiatan duniawi. Yang terpenting dari kegiatan-kegiatan itu adalah jangan sampai lupa niat bahwa semua yang kita lakukan karena Allah SWT. agar kita tetap di jalan yang benar dan apapun yang kita lakukan dapat bernilai ibadah.

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP
VIABILITAS DAN NILAI *POPULATION DOUBLING TIME* (PDT) SEL
OTAK TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN VITRO***

Miftakhul Jannah, Kholifah Holil, Umaiyatus Syarifah

ABSTRAK

Sel otak merupakan sel yang rentan mengalami kerusakan dalam kondisi *in vitro* karena memiliki kelangsungan hidup yang singkat dan selektif mengenai lingkungan tempat tumbuhnya. Oleh sebab itu, viabilitas dan nilai *Population Doubling Time* (PDT) atau waktu proliferasi sel otak dapat menurun. Ekstrak propolis diduga mampu melindungi sel otak dari kerusakan dan mampu meningkatkan viabilitas serta mempercepat nilai PDT secara *in vitro*. Hal ini dikarenakan ekstrak propolis memiliki senyawa aktif yang berpotensi sebagai neuroprotektif, antioksidan, dan stimulator pertumbuhan sel. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap viabilitas dan proliferasi sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah P1 (kontrol) dan perlakuan pemberian ekstrak propolis yaitu P2 (20 µg/mL), P3 (40 µg/mL), P4 (60 µg/mL), P5 (80 µg/mL), dan P6 (100 µg/mL). Sampel yang digunakan adalah sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) umur 3-4 hari yang dikultur dalam media DMEM 10% FBS dan diinkubasi dalam inkubator bersuhu 37°C dengan CO₂ 5% selama 10 hari. Ekstraksi propolis menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Data hasil penelitian berupa nilai viabilitas (%) dan nilai PDT (hari) sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) dianalisis menggunakan *one way ANOVA* ($\alpha=0.05$). Berdasarkan hasil analisis menggunakan *one way ANOVA*, dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap viabilitas dan nilai PDT sel otak tikus ($p<0.05$). Akan tetapi, rata-rata nilai viabilitas tertinggi ($90.3 \pm 3.09\%$) dan nilai PDT tercepat (2.88 ± 0.66 hari) dicapai oleh sel otak yang dikultur dengan pemberian perlakuan P5 (80 µg/mL).

Kata kunci: *ekstrak propolis, in vitro, viabilitas, proliferasi, PDT, sel otak tikus*

**EFFECT OF PROPOLIS EXTRACT ON THE VIABILITY AND
POPULATION DOUBLING TIME (PDT) VALUE OF RAT (*Rattus
norvegicus*) BRAIN CELL IN VITRO**

Miftakhul Jannah, Kholifah Holil, Umaiatus Syarifah

ABSTRACT

Brain cells are susceptible cell in *in vitro* conditions because of their short life span and highly specialized and choosy about their environment, so cell viability and *Population Doubling Time* (PDT) value or time for brain cells to proliferation has the potential to decrease. Propolis extract is expected to be able to protect brain cells from damage and able to increase viability and accelerate PDT values because it has active compounds which are potentially to be neuroprotective, antioxidants, growth cell stimulator. The purpose of this research were to determine the effect of propolis extract on the viability and proliferation of rat (*Rattus norvegicus*) brain cells *in vitro*. This research was an experimental study which was using Completely Randomized Design (CRD) with 6 treatments and 4 replications. The treatments were P1 (control) and treatments with additions of propolis extract i.e. P2 (20 $\mu\text{g/mL}$), P3 (40 $\mu\text{g/mL}$), P4 (60 $\mu\text{g/mL}$), P5 (80 $\mu\text{g/mL}$), dan P6 (100 $\mu\text{g/mL}$). Sample of this research was 3-4 day rat (*Rattus norvegicus*) brain cells which were cultured in DMEM 10% FBS and incubated in a 37°C incubator with 5% CO₂ for 10 days. Propolis extraction was using maceration method with 96% ethanol. Data of this research were viability (%) and PDT values (days) of rat (*Rattus norvegicus*) brain cells which were the analyzed using *one way* ANOVA ($\alpha=0.05$). Based on *one way* ANOVA, it was concluded that additions of propolis extract did not affect brain cell viability and PDT values ($p < 0.05$). However, the highest average of viability ($90.3 \pm 3.09\%$) and the fastest PDT value (2.88 ± 0.66 days) achieved by brain cells cultured by addition of P5 (80 $\mu\text{g/mL}$).

Keywords: *propolis extract, in vitro, viability, proliferation, PDT, rat brain cell*

ملخص البحث

الجنة ,مفتاح , 2018 , تأثير استخراج البروبوليس على الجودة و التكاملالخلايا الدماغ الفئران (*Rattus norvegicus*) خلال في المختبر (*In Vitro*) المشرفة الاءولى : خليفة خليل الماجستير ، والمشرفية الثاني أمية الشرفية الماجستير

الكلمات المفتاحية: استخراج البروبوليس ، في المختبر ، و التكاثر ، و الخلايا الدماغ ، و الحيوية خلايا الدماغ هي خلايا عرضة للهجوم من قبل الجذور الحرة والتي تتعرض لخطر كبير من تلف مؤكسد في ظروف المختبر لأن لديهم بقاء قصير وانتقائي فيما يتعلق ببيئة النمو. يُعتقد أن مستخلص البروبوليس قادر على حماية خلايا المخ من التلف ، كما أنه قادر على زيادة حيوية وانتشار خلايا المخ (في المختبر) لأنه يحتوي على مركبات نشطة لديها القدرة على أن تكون واقية وقوية للأوكسدة. كان الغرض من هذه الدراسة هو تحديد تأثير مستخلص البروبوليس على حيوية وانتشار خلايا دماغ الفئران (*Rattus norvegicus*) في المختبر. كانت هذه الدراسة دراسة تجريبية باستخدام تصميم عشوائي تماما (CRD) مع 6 علاجات و 4 مكررات. كانت المعالجات المستخدمة P1 (التحكم) والعلاج بإعطاء مقتطفات دنج وهي P2 (20 µg / مل) ، P3 (µg / 40 مل) ، P4 (60 µg / مل) ، P5 (80 µg / مل) ، P6 (100 µg / مل).

كانت العينات المستخدمة عبارة عن خلايا دماغية الفئران لمدة 3-4 أيام (*Rattus norvegicus*) التي تم تربيتها في 10% FBS/DMEM وحضنت في حاضنة 37 درجة مئوية مع 5% CO2 لمدة 10 أيام. استخراج دنج باستخدام طريقة maceration مع 96% من الإيثانول. نتائج البحث هي قابلية البقاء (%) *Population Doubling Time* (PDT) (أيام) لخلايا دماغ الفئران (*Rattus norvegicus*) والتي يتم تحليلها بعد ذلك باستخدام طريقة ANOVA ($\alpha = 0.05$). أظهرت النتائج أعلى متوسط للحياة (90.3 ± 3.09 %) وأدنى متوسط لقيمة PDT (2.88 ± 0.66) يوم) التي حققتها خلايا الدماغ المستزرعة بواسطة P5 (80 µg / مل). إحصائيا ، خلصت الدراسة إلى أن تناول مستخلص البروبوليس لم يؤثر بشكل كبير على قابلية خلايا الدماغ وانتشارها ($P < 0.05$).

KATA PENGANTAR

Assalaamu 'alaikum warahmatullaahi wabarakaatuh

Alhamdulillahirobbil 'aalamiin, puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala Rohman dan Rohim-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan segala rangkaian penyusunan skripsi dengan judul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis Terhadap Viabilitas dan Nilai *Population Doubling Time* (PDT) Sel Otak Tikus (*Rattus norvegicus*) secara *In Vitro*”**. Sholawat dan salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW, yang telah membawa cahaya terang bagi peradaban, termasuk dalam bidang pendidikan.

Selesainya penyusunan skripsi ini tentu tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dukungan, serta do' a dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag., selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M.Si., D.Sc., selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Kholifah Holil, M.Si., selaku dosen pembimbing utama yang dengan penuh keikhlasan, kesabaran dalam memberikan bimbingan, pengarahan, dan motivasai selama penyusunan skripsi ini.
5. Umaiyatus Syarifah, M.A., selaku dosen pembimbing agama yang dengan senyum kesabaran telah membimbing dan mengarahkan penyusunan skripsi ini pada kajian al-Quran dan as-sunnah.
6. Mujahidin Ahmad, M.Sc. selaku dosen wali yang senantiasa memberikan pengarahan dan nasehat.
7. Seluruh dosen, staf dan administrasi, serta laboran Jurusan Biologi yang telah banyak membantu selama proses penyusunan skripsi ini.
8. Ayahku tercinta Sabrowi dan Ibuku tercinta Anna Sofiati yang dengan penuh perjuangan, keikhlasan dan kesabaran telah memberikan segala bentuk dukungan serta do'a kepada penulis untuk menyelesaikan studi samapai penulisan skripsi ini.

9. Adik-adikku tercinta Nurul Mukaromah dan Liya Nurud Dzakiyah yang senantiasa memberikan do'a, semangat serta dukungan kepada penulis.
10. Seluruh keluarga besar yang selalu memberikan dukungan materil maupun moril kepada penulis dalam menyelesaikan proses belajar dan skripsi.
11. Siti Kolippatus Sadiyah, S.Si., Almeris Hanifah B, S.Si., Khalimatus Sa'diyah, S.Si., Noer Istiana, S.Si., Ermaswati Lamadike, S.Si., selaku rekan penelitian di *Aniaml Cell Culture (ACC)* yang selalu memberikan dukungan, motivasi dan do'a kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi, serta Mbak Lil Hanifah, S.Si yang hobi membully saya tapi sebenarnya sayang yang selalu siap menyediakan alat dan bahan untuk keperluan penelitian dan menjawab pertanyaan-pertanyaan saya.
12. Fifith Maulidatul Mahfudhoh, S.Si., Amiliyatul Hidayah, S.Si., Aisyah Silmi Kaffah, S.Si., Hari Ismail, S.Si., Fika Arzaquna Alfaruq S.Si. yang selalu menyemangati dengan do'a dan senyuman.
13. Teman-teman Biologi khususnya angkatan 2014 yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terimakasih telah menjadi teman dan saudara selama 4 tahun perkuliaan, hingga berjuang bersama menyelesaikan tugas akhir untuk memperoleh gelar S.Si.
14. Prof. Kunifumi Tagawa, Prof. Tatsuya Ueki, Tri Kustono Adi, M.Sc., Dewi Yuliani, M.Si., Fathia Rahmatul Azizah, S.Si., Rhesma Sylvia, Esamada Rose, Sindhi, Azizah, Nuril, dan Haikal selaku rekan dalam program *Japan-Asia Youth Exchange Sakura Science 2018* dan menjadi motivasi saya dalam menyelesaikan skripsi.
15. Abi Imam Muslimin, Ibu Chusnul Haidaroh, Ning Nur Miya Dzakiyah, dan seluruh keluarga ndalem Pesantren Mahasiswa (Pesma) Al-Adzkiya' Nurushofa (ANSHOFA), serta teman-teman pondok Rahma, Anja, Mbak Ummil, Mbak Leli, Mbak Napis, Mbak Lilis, Mbak Sitqom, Mbak Mia, Mbak Indah, dan teman-teman yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terimakasih telah menjadi teman dan saudara dalam menjaga Al-Qur'an.
16. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini, baik materil maupun moril.

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang lebih baik atas bantuan, dukungan, pemikiran, dan do' a terbaiknya. Sebagai akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi para pembaca. *Aamiin yaa robbal 'alamiin.*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

Malang, 24 Mei 2019

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
MOTTO	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
ملخص البحث	ix
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan	7
1.4 Hipotesis	7
1.5 Manfaat	7
1.6 Batasan Masalah	7
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Jenis dan Deskripsi Sel Otak	9
2.2 Kultur Primer Sel Otak <i>In Vitro</i>	12
2.3 Viabilitas dan Nilai <i>Population Doubling Time</i> (PDT)	
Otak <i>In Vitro</i>	18
2.4 Propolis	23
2.4.1 Tinjauan Umum Propolis	23

2.4.2 Komposisi dan Kandungan Senyawa Aktif Ekstrak Propolis	25
2.5 Peran Ekstrak Propolis Terhadap Kultur Sel Otak	27

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian	31
3.2 Variabel Penelitian	31
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	32
3.4 Alat dan Bahan	32
3.5 Prosedur Penelitian	33
3.5.1 Pembuatan Ekstrak Propolis	33
3.5.2 Preparasi Alat	33
3.5.3 Pembuatan Media	34
3.5.3.1 Media Stok DMEM	34
3.5.3.2 Media Pencuci	34
3.5.3.3 Media Kultur dan Perlakuan	34
3.5.4 Isolasi dan Kultur Sel Otak	35
3.5.5 Pengamatan Hasil Kultur	35
3.6 Analisis Data	36

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis Terhadap Viabilitas Sel Otak Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Secara <i>In Vitro</i>	39
4.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis Terhadap Nilai <i>Population Doubling Time</i> (PDT) Sel Otak Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Secara <i>In Vitro</i>	46

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53

DAFTAR PUSTAKA	54
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rata-rata viabilitas (%) sel otak tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) secara <i>in vitro</i> dengan dan tanpa pemberian ekstrak propolis	40
4.2 Ringkasan analisis ANOVA <i>one way</i> mengenai pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap viabilitas sel otak tikus (<i>Rattus novergicus</i>) secara <i>in vitro</i>	44
4.3 Rata-rata nilai PDT (hari) sel otak tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) secara <i>in vitro</i> dengan dan tanpa pemberian ekstrak propolis	46
4.4 Ringkasan analisis ANOVA <i>one way</i> mengenai pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap nilai PDT sel otak tikus (<i>Rattus novergicus</i>) secara <i>in vitro</i>	49

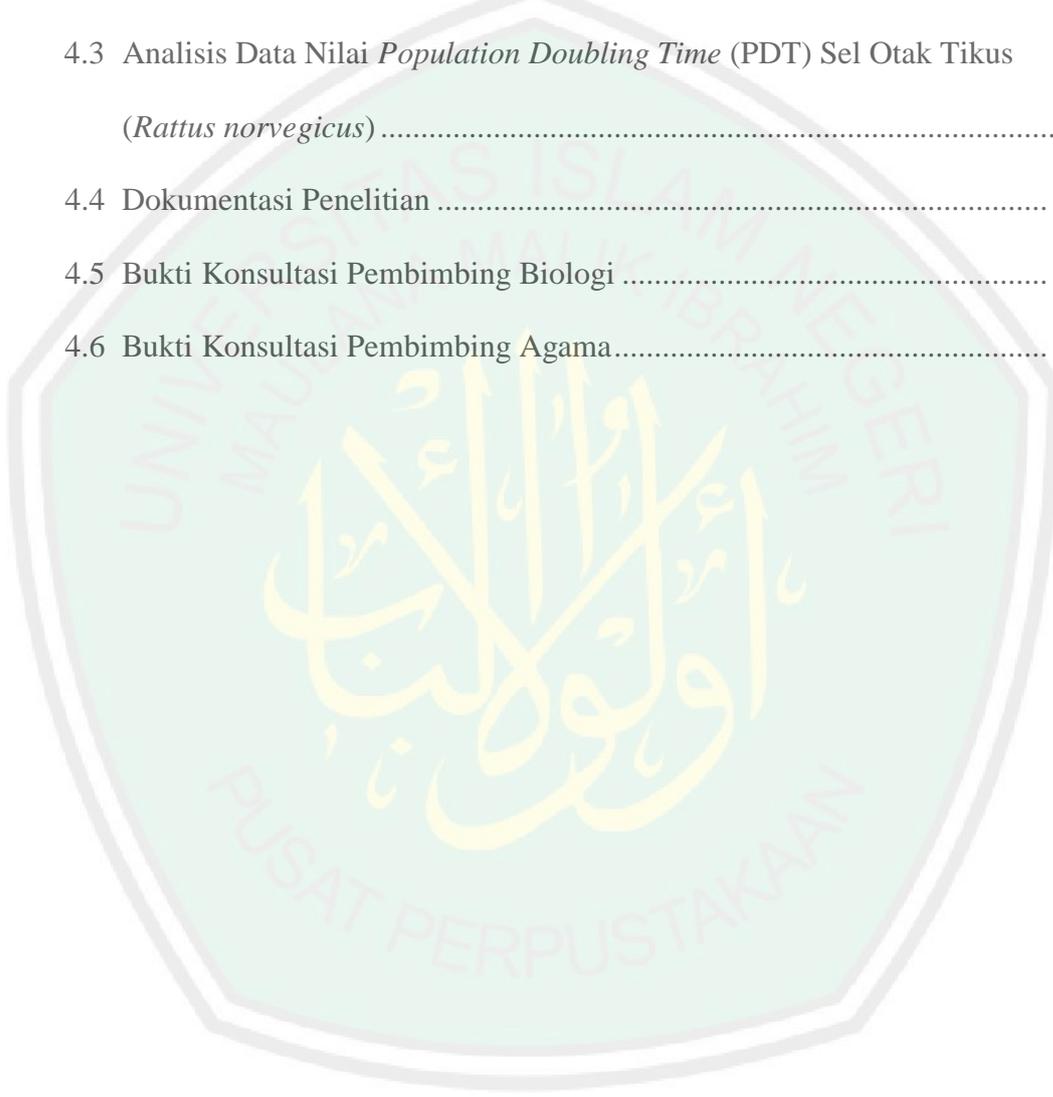
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Otak tikus bagian dorsal dan ventral.....	9
2.2 Fase pertumbuhan sel dalam media kultur	18
2.3 Siklus sel	20
2.4 Propolis mentah	23
2.5 Struktur kimia CAPE	27
4.1 Viabilitas sel dengan pewarnaan <i>trypan blue</i> 0.4%	40



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
4.1 Perhitungan Volume Ekstrak propolis yang harus Ditambahkan pada Media Kultur	65
4.2 Analisis Data Viabilitas Sel Otak Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	66
4.3 Analisis Data Nilai <i>Population Doubling Time</i> (PDT) Sel Otak Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	69
4.4 Dokumentasi Penelitian	72
4.5 Bukti Konsultasi Pembimbing Biologi	73
4.6 Bukti Konsultasi Pembimbing Agama.....	74



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lebah (*Apis mellifera*) merupakan salah satu hewan ciptaan Allah SWT yang namanya diabadikan sebagai nama surah dalam al-Quran, yaitu *An-Nahl*. Lebah memiliki kelebihan dibandingkan hewan yang lain, yaitu banyaknya produk bermanfaat yang dapat dihasilkannya. Bahkan, semua produk lebah dapat dijadikan sebagai obat. Allah berfirman dalam surah an-Nahl [16]: 69 sebagai berikut.

ثُمَّ كُلِي مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا ۗ يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (69)

"Kemudian makanlah dari tiap-tiap (macam) buah-buahan dan tempuhlah jalan Tuhanmu yang telah dimudahkan (bagimu). Dari perut lebah itu keluar minuman yang bermacam-macam warnanya, di dalamnya terdapat obat menyembuhkan bagi manusia. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda kebesaran Tuhan bagi orang yang memikirkan." [QS. An-Nahl [16]: 69]

Ayat tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT telah menyisipkan obat dalam tubuh lebah. Menurut tafsir Ibnu Katsir (1994), pada kalimat “فِيهِ شِفَاءٌ”

”للنَّاسِ” menunjukkan arti “di dalamnya terdapat obat bagi manusia”. Huruf “هـ”

dari kata “فِيهِ” disini memiliki arti kepemilikan yang ditunjukkan kepada lebah.

Hal ini menunjukkan bahwa segala sesuatu yang dihasilkan lebah membawa atau mengandung obat bagi kesehatan manusia. Produk dari lebah diantaranya adalah madu, *royal jelly*, *bee pollen*, *bee venom*, dan propolis.

Propolis merupakan zat yang dihasilkan oleh lebah yang digunakan untuk pertahanan sarangnya (Farooqui, 2017). Selain itu juga dapat memperkuat stabilitas struktural, mencegah parasit dan penyakit masuk, mencegah pembusukan, dan mengurangi getaran dari luar sarang, serta menutup celah-celah sarang yang rusak, (Siregar, 2011). Fungsi propolis tidak hanya untuk kepentingan lebah, tapi juga banyak digunakan manusia sebagai obat alternatif untuk menyembuhkan berbagai penyakit.

Menurut Herawati (2015), propolis adalah suatu zat yang dihasilkan oleh lebah dan disebut sebagai *bee glue* karena bahannya yang lengket seperti lem. Propolis dihasilkan lebah dengan cara mengumpulkan resin atau getah dari berbagai macam tumbuhan yang kemudian bercampur dengan *saliva* dan berbagai enzim yang ada pada lebah.

Warna, aroma, dan kandungan propolis bervariasi. Kebanyakan warnanya coklat terang sampai gelap, tetapi ada yang berwarna hijau, merah, hitam, kuning, maupun putih. Propolis dapat berbentuk cair sampai padat. Bentuk ini dipengaruhi oleh temperatur penyimpanan. Semakin tinggi temperatur penyimpanan, propolis akan semakin cair (Siregar, 2011).

Propolis mengandung senyawa aktif antara lain vitamin, mineral, enzim, flavonoid (Jose dan Vassya, 2011), terpenoid, steroid, asam amino, asam kafeat dan turunannya asam kafeat fenil ester—*caffeic acid phenylethyl ester* (CAPE) (Lawal dkk, 2015). Senyawa aktif tersebut memungkinkan propolis memiliki jangkauan yang luas akan aktivitas biologi dan farmakologi, seperti anti-kanker, anti-bakteri, anti-inflamasi, anti-mikroba, anti-fungal, tumorisidal (Safari dkk, 2015), immunomodulator, antioksidan, anti-parasit, anti-diabetik (Alkis, 2015),

anti-histamin, antasid, anti-protozoa, anti-*Helicobacter pylori* (pengobatan ulserasi), sebagai agen terapeutik (Pasupuleti dkk, 2017), stimulator sel (Najafi, 2007), dan kemampuan neuroprotektif (Cardoso, 2011).

Propolis pada penelitian ini diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Menurut Puspitasari dan Prayogo (2017), keuntungan metode ekstraksi maserasi yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana dan tidak dipanaskan sehingga senyawa alami di dalamnya tidak menjadi terurai. Ekstraksi ini memungkinkan banyak senyawa terekstraksi pada suhu ruang. Kubilene *et al* (2015) menambahkan, teknik yang umum digunakan untuk menghasilkan ekstrak propolis adalah ekstrak yang menggunakan pelarut etanol. Metode ini sesuai untuk mendapatkan ekstrak propolis yang rendah lilin serta kaya akan senyawa aktif biologis (Kubilene *et al*, 2015) dan pelarut etanol 96% dapat menarik bahan aktif yang bersifat polar maupun non polar secara optimal (Shadiqy, 2012).

Ekstrak propolis yang berpotensi sebagai neuroprotektif diharapkan dapat melindungi sel otak dari kerusakan. Otak merupakan organ yang tersusun atas banyak neuron dan merupakan organ yang sangat sensitif terhadap induksi radikal bebas. Hal ini disebabkan karena otak memiliki asam lemak *polyunsaturated* yang tinggi dan molekul antioksidan yang rendah dibandingkan dengan organ yang lain (Alkis, 2015). Kondisi tersebut menyebabkan rendahnya tingkat proliferasi sel-sel di dalamnya. Untuk meningkatkan proliferasi sel otak, dibutuhkan induksi senyawa yang dapat meningkatkan jumlah sel sebagai hasil pertumbuhan dan pembelahan sel, sehingga tersedia sel baru untuk menggantikan sel yang rusak.

Najafi (2007) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa ekstrak propolis dapat meningkatkan jumlah sel dan menjadi stimulator pertumbuhan pada sel limpa tikus, limfosit manusia, sel ginjal tikus, dan sel hepar tikus secara *in vitro*. Berdasarkan hasil uji MTT dalam 1 mg/ml propolis, hasil maksimal pertumbuhan sel ditunjukkan oleh sel limpa sebanyak 48% dan hasil minimal terdapat pada sel hepar sebesar 18%. Sedangkan pada konsentrasi 2 mg/ml, jumlah sel limpa tikus, limfosit manusia, sel ginjal tikus, dan sel hati tikus meningkat berturut-turut yaitu, 65%, 55%, 35%, dan 25%. Pada pengamatan secara langsung mengindikasikan bahwa semua sel normal yang diinduksi propolis tersebut memiliki usia hidup yang lebih lama dibandingkan dengan sel yang tidak diinduksi ekstrak propolis (kontrol). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak propolis memiliki kemampuan untuk meningkatkan viabilitas sel dan dapat bekerja sebagai stimulator pertumbuhan sel.

Kemampuan stimulator pertumbuhan sel dari ekstrak propolis tersebut diharapkan juga dapat meningkatkan pertumbuhan dan proliferasi sel otak. Menurut Emsley (2005), bagian awal dari proses pembentukan neuron adalah proliferasi. Dengan adanya proses proliferasi, sel otak akan meningkat dan menggantikan sel-sel yang rusak untuk mempertahankan integritas antar neuron. Secara *in vitro*, tingkat proliferasi sel dapat diketahui dari nilai *Population Doubling Time* (PDT). Nilai PDT merupakan waktu yang diperlukan oleh populasi sel untuk menjadikan jumlahnya dua kali lipat dari jumlah semula (Trenggono, 2009). Jika nilai PDT rendah, maka proliferasi sel cepat, begitu juga sebaliknya (Kaiin dan Djuwita, 2016).

Ekstrak propolis memiliki senyawa-senyawa yang dapat membantu pertumbuhan neuron secara *in vitro*, seperti polifenol dan terpenoid yang dapat melindungi neuron dari kerusakan (Moosavi, 2015; Wiart, 2014), serta tannin yang dapat menjaga integritas membrane sel (Tarahovsky, 2008) sehingga dapat meningkatkan kelangsungan hidup, pertumbuhan, dan proliferasi sel. Dengan kemampuan tersebut, ekstrak propolis dapat menjaga sel dari kerusakan serta meningkatkan viabilitas sel serta mempercepat waktu untuk proliferasi.

Selain itu, ekstrak propolis juga memiliki senyawa fenolik khusus yang bersifat neuroprotektif, yaitu *caffeic acid phenylethyl ester* (CAPE) (3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid 2-phenylethyl ester). Menurut Kurauchi (2012), senyawa tersebut memiliki kemampuan neuroprotektif karena dapat menginduksi *brain-derived neurotropic factor* (BDNF). Juananda (2015) menambahkan, BDNF merupakan salah satu famili neurotropin dengan struktur mirip faktor pertumbuhan dan berperan dalam proliferasi sel otak.

CAPE dapat meningkatkan BDNF dengan mengaktifkan *extracellular signal regulated kinase* (ERK). Selanjutnya, ERK akan memfosforilasi substrat faktor transkripsi, yaitu *cyclic AMP responsive element-binding protein* (CREB). Fosforilasi CREB kemudian akan mengaktifkan gen yang menginduksi siklus sel, yaitu BDNF (Juananda, 2015; Moosavi, 2015). Dengan meningkatnya ekspresi gen BDNF, sel akan memasuki siklus sel dan bermitosis sehingga proliferasi meningkat dan potensi kemungkinan terjadinya apoptosis berkurang. Jika potensi kemungkinan terjadinya apoptosis berkurang, maka viabilitas sel akan meningkat.

Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian propolis terhadap viabilitas dan nilai PDT sel otak. Viabilitas

sel merupakan sebuah parameter penting dalam penelitian kultur dengan melihat kemampuan bertahan hidup dari sel (Fakhrullin, 2014). Semakin banyak jumlah sel yang hidup dibandingkan sel yang mati, maka semakin tinggi nilai viabilitas sel. Jika viabilitas sel tinggi, maka potensi sel untuk berproliferasi juga tinggi. Selanjutnya, nilai PDT dapat digunakan sebagai parameter untuk mengetahui tingkat proliferasi sel secara *in vitro*.

Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada penelitian Shimazawa (2005) yang menyebutkan bahwa ekstrak propolis dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$ dapat melindungi dan meningkatkan proliferasi *cell line* neuron yang diinduksi hidrogen peroksida dibandingkan dengan konsentrasi 0.4 $\mu\text{g/mL}$ dan 4 $\mu\text{g/mL}$. Namun pada penelitian Agca (2017) disebutkan bahwa pemberian ekstrak propolis dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ dapat menyebabkan penurunan viabilitas astrosit.

Hal ini menunjukkan bahwa pengaruh ekstrak propolis bergantung pada konsentrasi tertentu. Jadi untuk menemukan konsentrasi yang tepat, konsentrasi dalam penelitian tersebut dimodifikasi menjadi 0 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Diharapkan ekstrak propolis dapat meningkatkan viabilitas dan proliferasi sel otak tikus dengan mempercepat nilai PDT.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah apakah ada pengaruh pemberian propolis terhadap viabilitas dan nilai *Population Doubling Time* (PDT) sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian propolis terhadap viabilitas dan nilai *Population Doubling Time* (PDT) sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak propolis berpengaruh terhadap viabilitas dan nilai *Population Doubling Time* (PDT) sel saraf otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*.

1.5 Manfaat

Manfaat yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Secara teoritis, penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian propolis terhadap viabilitas dan nilai *Population Doubling Time* (PDT) sel otak tikus secara *in vitro*.
2. Secara aplikatif, masyarakat diharapkan dapat memanfaatkan propolis sebagai obat tradisional maupun sebagai suplemen sehari-hari.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Sel otak diisolasi dari tikus neonatus umur 3-4 hari yang diinkubasi selama 10 hari dalam media *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang ditambah 10% serum *Fetal Bovine Serum* (FBS).
2. Propolis mentah didapatkan dari peternak lebah madu *Apis mellifera* di Karangploso, Malang dan diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% di Materia Medika Batu, Malang.

3. Konsentrasi ekstrak propolis yang digunakan yaitu 0 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, dan 100 $\mu\text{g/mL}$.
4. Parameter yang diamati yaitu viabilitas dan nilai *Population Doubling Time* (PDT) sel otak tikus setelah 10 hari diinkubasi.

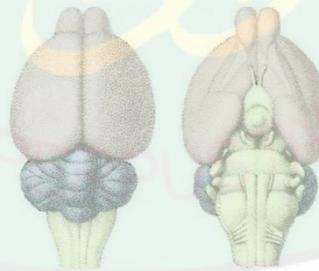


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jenis dan Deskripsi Sel Otak

Salah satu organ yang berfungsi untuk mengatur kerja sama dalam organisasi dan koordinasi kegiatan tubuh adalah otak (Syaifuddin, 2009). Otak adalah organ vital yang terdiri dari 100-200 miliar sel aktif yang saling berhubungan dan bertanggung jawab atas fungsi mental dan intelektual yang terdiri dari sel-sel otak (Leonard, 1998). Otak *rodent* (hewan pengerat) seperti tikus telah banyak dijadikan model dalam pembelajaran mengenai perkembangan otak (Ramachandra, 2011). Walaupun otak tikus berbeda dengan otak manusia, tetapi terdapat hubungan klinis dari informasi yang didapatkan dari otak tikus ini (Swanson, 2011). Sama seperti otak manusia, sel-sel otak tikus membentuk suatu jaringan yang disebut jaringan saraf. Terdapat dua macam sel dalam jaringan ini, yaitu sel saraf (neuron) dan sel glia (neuroglia).



Gambar 2.1 Otak tikus bagian dorsal (kiri) dan ventral (kanan) (Swanson, 2004)

Neuron dapat dibedakan dari sel lain dengan sifatnya yang paling mendasar, yaitu dapat berkomunikasi dengan sel lain melalui sinaps, yaitu titik temu antara ujung akson satu neuron dengan neuron lain dan menghantarkan transmisi sinyal cepat, baik elektrik maupun kimiawi (Carneiro, 2005). Menurut Kahle dan

Frotscher (2003), sel ini berfungsi untuk menghantarkan impuls antar sel dan merupakan unit fungsional pada sistem saraf.

Neuron terdiri atas badan sel yang berisi inti dan bahan sitoplasma dan prosesus yang keluar dari badan sel. Prosesus secara fungsional dibedakan menjadi akson dan dendrit. Akson membawa impuls saraf menjauhi badan sel, sementara dendrit menyampaikan impuls ke badan sel (Ariani, 2012). Pada bagian luar akson terdapat lapisan lemak disebut mielin yang dibentuk oleh sel Schwann yang menempel pada akson. Sel Schwann merupakan sel glia utama pada sistem saraf perifer yang berfungsi membentuk selubung myelin (Carneiro, 2005).

Berdasarkan strukturnya, neuron dibedakan menjadi tiga macam, yaitu neuron unipolar, neuron bipolar, dan neuron multipolar. Neuron unipolar hanya memiliki satu tonjolan (satu akson), neuron bipolar memiliki dua tonjolan (satu sebagai dendrit dan satu sebagai akson), dan neuron multipolar memiliki banyak tonjolan yang keluar dari badan sel (beberapa tonjolan sebagai dendrit dan satu tonjolan sebagai akson) (Soewolo, 2005).

Sedangkan berdasarkan fungsinya, neuron dibagi menjadi tiga macam, yaitu neuron sensorik, neuron motorik, dan neuron konektor. Neuron sensorik berfungsi untuk menghantarkan impuls dari alat indera menuju otak atau sumsum tulang belakang. Neuron motorik berfungsi untuk membawa impuls dari otak atau sumsum tulang belakang menuju otot atau kelenjar. Neuron konektor berfungsi untuk meneruskan rangsangan dari neuron sensorik ke neuron motorik (Ville, 1999).

Sel glia adalah sel non-neuron yang menopang dan menyediakan nutrisi, mempertahankan homeostasis, membentuk mielin, dan berpartisipasi dalam

transmisi sinyal sistem saraf. Di antara fungsi paling penting dari sel glia adalah untuk mendukung dan menahan neuron di tempatnya, menyediakan nutrisi untuk neuron, insulasi neuron secara elektrik, menghancurkan patogen, dan menghilangkan neuron yang mati (Campbell,1997). Macam-macam neuroglia di antaranya adalah makroglia yang mencakup astrosit dan oligodendrosit, mikroglia, dan sel ependimal.

Astrosit adalah sel berbentuk bintang yang memiliki sejumlah prosesus panjang dan sebagian besar melekat pada dinding kapilar darah melalui pedikel atau “kaki vascular”. Astrosit secara struktural menyangga dan mengatur transport materi di antara darah dan neuron. Pedikel berkontribusi terhadap barier darah otak atau pengaturan transport materi makromolekul tertentu pada plasma darah untuk masuk ke jaringan otak (Slone, 2003).

Oligodendrosit memiliki bentuk yang menyerupai astrosit, namun badan selnya kecil dan jumlah prosesusnya lebih sedikit dan lebih pendek. Fungsi oligodendrosit dalam sistem saraf pusat sama dengan fungsi sel Schwann pada sistem saraf tepi, yakni dengan membentuk lapisan myelin untuk melapisi akson dalam sistem saraf pusat (Slone, 2003).

Mikroglia berasal dari sumsum tulang dan fungsi utamanya mirip dengan makrofag pada jaringan ikat. Umumnya, sel ini dapat dijumpai pada substansi putih (*substantia alba*) dan substansi abu-abu (*substantia grisea*). Nukleusnya kecil dan bentuknya memanjang (kadang seperti kacang), dengan kromatin terkondensasi. Tajuk selnya pendek dan bercabang-cabang (Eroschenko, 2008).

Sel ependimal adalah sel epitel kolumnar pendek atau selapis kuboid yang melapisi ventrikel otak dan kanalis sentralis medula spinalis. Sel ini berasal dari

sel neuroepitelial yang melapisi bagian dalam crista neuralis. Pada orang dewasa masih berbentuk epitelial alami, dan memiliki beberapa silia. Umumnya berbentuk silindris selapis, memiliki basal taju sel yang meluas ke dalam *substantia grisea*. Lapisan sel ependimal berlanjut menjadi epitel kuboid pleksus koroideus (Eroschenko, 2008).

2.2 Kultur Primer Sel Otak *In Vitro*

Kultur sel adalah kultur sel-sel yang berasal dari organ atau jaringan yang telah diuraikan menjadi suspensi sel. Suspensi sel ini selanjutnya dibiakkan secara *in vitro* di sebuah wadah misalnya botol, tabung atau cawan atau menjadi suspensi sel dalam media penumbuh (Malole, 1990). Teknik *in vitro* merupakan teknik yang digunakan untuk memelihara atau memperbanyak bagian dari jaringan makhluk hidup yang ditumbuhkan pada suatu media yang disesuaikan dengan kondisi fisiologis makhluk hidup tersebut (Freshney, 2005).

Kultur sel primer dapat diperoleh dengan cara menumbuhkan sel dari disagregasi fragmen jaringan menggunakan enzim atau diperoleh secara mekanik. Pada eksplan primer akan terjadi seleksi berdasarkan kemampuan sel untuk migrasi dari eksplan dan tumbuh menjadi kultur sel primer (Trenggono, 2009).

Kultur primer mengacu pada tahap kultur setelah sel-sel yang terisolasi dari jaringan kemudian dikembangbiakkan di bawah kondisi yang tepat dan terkontrol sampai menempati semua substrat yang tersedia (mencapai konfluen). Pada tahap ini, sel-sel harus disubkultur dengan memindahkannya ke dalam substrat dan medium pertumbuhan yang baru sehingga memberikan lebih banyak ruang untuk pertumbuhan selanjutnya (Gibco, 2011). Kultur primer neuron dari tikus secara luas telah digunakan untuk mempelajari sifat-sifat neuron, seperti pemanjangan

akson, transmisi sinaps, dan eksitotoksisitas (kematian neuron akibat kelebihan glutamat) (Meberg, 2003).

Sel otak berkembang dari sel progenitor yang belum berdiferensiasi. Sel progenitor neuron dalam kultur *in vitro* memiliki morfologi bulat, bulat dengan disertai penjuluran pendek, dan berbentuk spindel memanjang (Riyacumala, 2010). Sedangkan sel neuroglia akan berbentuk seperti fibroblas multipolar sebelum konfluen dan berbentuk sel epitel selapis poligonal dengan ukuran yang teratur pada saat konfluen (Treggono, 2009). Kultur primer sel otak pada penelitian ini didapatkan dari otak tikus *postnatal*. Menurut Puspitasari (2013), jaringan tersebut merupakan sumber dari berbagai tipe neuron yang memiliki karakter multipoten dan memiliki banyak sel progenitor neuron. Untuk menentukan dengan pasti tipe sel yang berkembang pada kultur primer neuron dapat dikonfirmasi dengan uji imunohistokimia.

Waktu yang dibutuhkan untuk kultur primer bergantung pada jenis sel yang dikultur. Menurut Berre-Scoul (2017), kultur primer sel otak tikus dapat mencapai waktu 12 hari. Sedangkan menurut Djuwita *et al.* (2012), kultur sel otak serebrum tikus dapat dilakukan dalam waktu 10 hari. Ditambahkan oleh Puspitasari (2013), kultur primer neuron mencit dapat dilakukan dalam waktu 12 hari.

Kultur primer memerlukan medium yang cocok, jika tidak maka sel-sel akan segera mati oleh autolisis, baik oleh karena suhu maupun tekanan udaranya. Apabila kultur primer dikultur untuk jangka waktu beberapa lama, sebaiknya diberi bahan nutrisi yang cukup, serta diberi antibiotik. Medium kultur juga perlu diganti pada kurun waktu tertentu agar tidak keracunan oleh sisa metabolisme sel

itu sendiri (Kalanjati, 2006). Allah SWT berfirman dalam surah Al-Qomar [54] :
49 berikut.

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ (49)

“*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*” [QS. Al-Qomar [54]: 49]

Ayat tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu menurut ukurannya. Menurut tafsir as-Sa'di (2008), pada kalimat “كُلُّ شَيْءٍ” menunjukkan bahwa segala sesuatu telah ditakdirkan oleh Allah SWT dan semuanya merupakan ciptaan Allah SWT yang telah ditetapkan berdasarkan takdir. Ayat ini jugamencakup seluruh makhluk dalam jagat raya, hanya Allah SWT yang menciptakannya. Tiada pencipta selain-Nya dan tiada sekutu bagi-Nya dalam menciptakannya. Allah SWT menciptakannya dengan ketetapan yang telah didahului oleh ilmu-Nya dan telah tertulis di *Lauh Mahfudz*, berdasarkan waktu dan kadarnya, beserta seluruh sifatnya.

Menurut Katsir (1994), pada kalimat “بِقَدَرٍ” menunjukkan arti “berdasarkan ukuran” dan dalam hal ini berarti Allah SWT telah menciptakan segala sesuatunya dengan sempurna. Kesempurnaan Allah SWT dalam penciptaan manusia dapat dilihat dari detilnya kehidupan unit terkecil tubuh, yaitu sel. Secara *in vivo*, sel dapat hidup karena takaran sempurna yang diciptakan Allah.

Takaran dalam kehidupan sel berupa kesesuaian kondisi lingkungan dan kebutuhan nutrisi sel untuk hidup. Secara *in vitro*, kondisi lingkungan dan kebutuhan nutrisi sel diupayakan menyerupai keadaan sel secara *in vivo*. Menurut Malole (1990), kondisi lingkungan sel secara *in vitro* dapat diciptakan dengan

pengaturan suhu, pH, O₂, CO₂, tekanan osmosis, permukaan untuk melekatnya sel, nutrisi, proteksi terhadap zat toksik, dan faktor pertumbuhan.

Suhu yang ideal untuk kultur sel hewan mamalia adalah 37°C atau disesuaikan dengan suhu tubuh sel hewan dengan pH optimal 7.4. Diusahakan pH tidak kurang dari 7.0 karena pH rendah dapat memperlambat pertumbuhan sel. Kestabilan pH dapat dijaga dengan menggunakan sistem buffer karbondioksida-karbonat seperti dalam darah, yaitu dengan penambahan NaHCO₃ dalam media kultur dan udara yang mengandung 5% karbondioksida. Selain menjaga pH dan suhu, media untuk kultur sebaiknya dihindarkan dari pembentukan busa. Pembentukan busa pada media dapat menyebabkan denaturasi protein dan meningkatkan resiko kontaminasi apabila busa media mencapai bagian atas dari petri dish (Paul 1972; Malole 1990; Pollard & Walker 1990; Freshney 2005).

Kebutuhan nutrisi sel dapat diberikan melalui media kultur yang tepat. Media kultur penting untuk diperhatikan agar sel dapat tetap hidup karena sel hewan tidak dapat mensintesis nutrisi sendiri. Terdapat bermacam-macam media kultur sel yang dapat digunakan, seperti Medium 199, *Basal Medium Eagle's* (BME), *Minimal Essential Medium* (MEM), *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), Ham medium, dan *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) (Yao, 2017). Namun, media kultur yang umum digunakan untuk menumbuhkan sel otak adalah *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang ditambahkan serum 10% (Potter & DeMarse 2001).

DMEM merupakan pengembangan dari media kultur *Eagle's Basal Medium* (EBM) dengan meningkatkan konsentrasi bahan penyusunnya. DMEM mengandung konsentrasi asam amino 2 kali lipat dan vitamin 4 kali lipat lebih

banyak dari media kultur *Eagle's Minimal Essential Medium* (MEM) (Freshney 1992). Kandungan unsur pokok yang lebih baik ini menyebabkan DMEM menjadi medium yang biasa dipakai untuk kultur sel yang berasal dari manusia, monyet, hamster, tikus, mencit, ayam, dan ikan (Murtisari, 2011).

Selain media kultur, kebutuhan nutrisi sel dapat dilengkapi dengan adanya serum. Penambahan serum pada media kultur dapat mendukung kehidupan dan pertumbuhan sel secara *in vitro*. Salah satu serum yang umum digunakan dalam kultur sel otak adalah *Fetal Bovine Serum* (FBS). Menurut Malole (1990), serum berfungsi sebagai penyedia faktor pertumbuhan atau *growth factor*, faktor hormonal, serta faktor pelekat dan penyebar sel.

Penambahan *growth factors* telah disebutkan dapat meningkatkan proliferasi neuron. Di antaranya adalah *nerve growth factor* (NGF) (Cattaneo dan McKay, 1990), *brain-derived neurotropic factor* (BDNF) (Juananda, 2015), *insulin like growth factor-1* (IGF-1) (Bateman dan McNeill, 2006) dan *fibroblast growth factor* (FGF) (Matsuda, 1990). Salah satu produk lebah, yaitu propolis telah dilaporkan dapat meningkatkan kadar BDNF, baik secara *in vivo* (Kasai, 2011; Annis, 2017) maupun *in vitro* (Ni, 2017).

Peningkatan proliferasi sel dapat menunjukkan bahwa sel mengalami pertumbuhan yang optimal. Sel yang tumbuh dalam media kultur biasanya mengikuti standar yang pasti. Keterlambatan mengikuti urutan periode pertumbuhan *exponensial* disebut fase *log*. Ketika densitas sel (sel/cm² substrat) sampai pada tingkat dimana semua permukaan substrat terpenuhi, atau ketika konsentrasi sel (sel/ml medium) melewati kapasitas dari medium yang

menyebabkan pertumbuhan berhenti atau berkurang banyak sehingga medium harus diganti lebih sering atau dilakukan subkultur (Freshney, 2000).

Menurut Budiono (2002), pertumbuhan sel dalam media kultur dibagi menjadi tiga fase (Gambar 2.8), yaitu:

1. *Lag Phase*

Lag Phase merupakan waktu mengikuti proses subkultur dan *reseeding*, yaitu masa dimana belum terdapat peningkatan jumlah sel. Pada masa tersebut konsentrasi sel sama atau hampir sama dengan konsentrasi pada waktu subkultur (10^4 sel/ml). Fase ini disebut sebagai periode adaptasi, pelekatan pada substrat dan penyebaran sel. Pada fase ini, enzim *polymerase* meningkat, diikuti dengan sintesis DNA dan protein struktural baru. Beberapa produk khusus dari sel akan menghilang dan tidak akan muncul kembali sampai proliferasi sel terhenti pada konsentrasi sel tinggi.

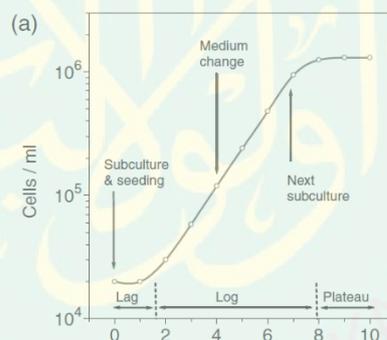
2. *Log Phase*

Log Phase merupakan fase peningkatan jumlah sel secara eksponensial dan saat pertumbuhan mencapai konfluen. Proliferasi akan terhenti setelah 1 atau 2 siklus berikutnya. Waktu *log phase* tergantung pada konsentrasi awal sewaktu dilakukan *seeding*, kecepatan pertumbuhan sel, serta kepekatan dimana proliferasi sel akan terhambat oleh kepekatan. Pada fase ini, fraksi pertumbuhan akan mencapai 90%-100%. Freshney (2000) menambahkan bahwa fase ini adalah keadaan yang sangat produktif dalam kultur sel. Selain itu, fase ini merupakan waktu yang optimal untuk sampling karena populasi sel sangat seragam dan viabilitasnya tinggi.

3. *Plateu Phase.*

Mendekati akhir dari *log phase*, kultur menjadi konfluen yaitu permukaan substrat untuk pertumbuhan sel sudah terpakai dan sel saling berhubungan dengan lingkungan sekitarnya. Setelah mencapai konfluen kecepatan tumbuhnya akan berkurang, dan pada beberapa kasus proliferasi sel akan terhenti setelah 1-2 siklus.

Kultur mencapai tahap *plateu* atau stationari pada tahap ini, dan fraksi pertumbuhan akan turun mencapai 0%-10%. Beberapa sel kemungkinan dapat melakukan diferensiasi dalam fase ini, sebagai cara untuk tetap mempertahankan viabilitas. Sel dapat disubkultur dari fase ini, tetapi lebih baik untuk mensubkultur sebelum fase *plateu* tercapai, karena fraksi pertumbuhan akan menjadi lebih tinggi dan waktu penyembuhan (*Lag Phase*) akan lebih pendek jika sel dipanen dari akhir puncak *Log Phase* (Djuwita, 2002; Freshney, 2000).



Gambar 2.2 Fase pertumbuhan sel dalam media kultur (Freshney, 2000)

2.3 Viabilitas dan Nilai *Population Doubling Time (PDT) Otak In Vitro*

Viabilitas sel ditentukan dari kemampuan sel untuk hidup dan menjalankan metabolismenya, dimana hal ini merupakan faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur sel (Prihastanti, 1999). Oleh karena itu, viabilitas sel sering digunakan sebagai salah satu parameter untuk mengevaluasi keberhasilan suatu kultur sel dan penanda sitotoksitas suatu material. Tes sitotoksitas ini berguna

untuk mengetahui sifat biologis suatu bahan apakah bersifat toksik terhadap sel tertentu atau tidak. Salah satu yang mengindikasikan sitotoksitas suatu bahan adalah adanya penurunan proliferasi sel dan penurunan viabilitas (Trenggono, 2009; Freshney, 2000).

Metode yang paling mudah untuk menentukan jumlah sel hidup adalah penghitungan sel dengan menggunakan hemositometer dan menggunakan pewarna *tripan blue* 0.5% karena *tripan blue* tidak mengubah integritas membran plasma dan memperlambat proses kematian sel. *Tripin blue* juga memfasilitasi identifikasi sel yang akan dilihat dengan mikroskop (Bolt, 2001).

Identifikasi sel dilakukan dengan melihat warna sel. Sel yang rusak atau mati akan menunjukkan warna biru karena mengikat zat warna, sedangkan sel yang normal atau hidup menunjukkan warna bening karena membran sel tidak mengikat zat warna (Trenggono, 2009). Kedua macam sel tersebut kemudian dihitung untuk mengetahui persentase viabilitas sel dengan menggunakan rumus berikut (Kalanjati, 2006).

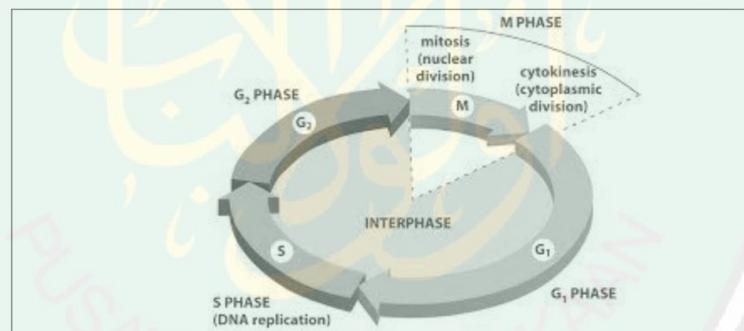
$$\% \text{ Viabilitas sel} = \frac{\text{Total sel hidup}}{\text{Total keseluruhan sel (hidup+mati)}} \times 100\%$$

Viabilitas sel menunjukkan kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang. Semakin banyak jumlah sel yang hidup dibandingkan sel yang mati, maka potensi sel untuk tumbuh dan berkembang juga tinggi. Salah satu faktor penting yang mengatur perkembangan sel adalah proliferasi. Untuk mengembangkan tubuh dan organ, proliferasi sel sangat dibutuhkan dalam seluruh organisme multiseluler (Takeuchi, 2014).

Proliferasi sel adalah sebuah peningkatan dari jumlah sel sebagai hasil dari pertumbuhan sel dan pembelahan sel (Briggs, 2006). Istindiah (2001)

menambahkan, pembelahan merupakan cara sel untuk memperbanyak diri. Dari satu sel induk akan membelah menjadi dua dan masing-masing akan membelah menjadi dua pula, demikian seterusnya. Sel dapat membelah dengan cara memasuki siklus sel.

Siklus sel merupakan bagian dari proliferasi sel yang berfungsi mempertahankan populasi sel pada organisme dewasa. Terdapat empat fase yang berurutan dalam siklus sel, yaitu G₁, S, G₂, dan M (Gambar 2.6). Fase G₁ (gap 1), yaitu fase yang terletak di antara mitosis dan fase S dimana protein yang bertanggung jawab untuk replikasi DNA telah disintesis. Fase S (sintesis), yaitu fase replikasi DNA inti. Fase G₂ (gap 2) merupakan fase penyusunan komponen sel yang terletak di antara fase S dan mitosis. Fase M (mitosis), yaitu pembelahan sel yang disertai pembagian kromosom ke sel anak (Sumitro, 2017; Frade, 2015).



Gambar 2.3 Siklus sel (Sumitro, 2017)

Siklus sel bertujuan untuk menjamin bahwa replikasi DNA hanya terjadi sekali selama fase S dan kromosom yang dihasilkan masing-masing dapat diturunkan ke sel anak pada fase M. Pada tahap S, sel mereplikasi DNA sehingga memiliki dua set lengkap DNA agar sel yang nantinya akan membelah menjadi dua sel anak memiliki satu salinan lengkap DNA. Selama fase ini, pada kondisi normal sel tidak akan merespon sinyal ekstraseluler. Setelah replikasi DNA dan

duplikasi kromosom selesai, sel memasuki fase G2 (Istindiah, 2001; Sumitro, 2017).

Fase G2 merupakan tahap akhir dari sintesis DNA dan mempersiapkan sel untuk memasuki fase M. Pada tahap ini sel melakukan sintesis protein karena membutuhkan protein yang cukup untuk kedua sel, kemudian menyiapkan diri untuk membelah (Istindiah, 2001). Pada fase ini sel juga memiliki kesempatan melakukan mekanisme perbaikan apabila terjadi kesalahan sintesis DNA (Baumforth, 2003).

Selanjutnya, sel akan memasuki fase M, dimana pada kondisi normal fase M tidak akan menerima sinyal ekstraseluler seperti pada fase S. Menurut Istindiah (2001), selama fase ini, sel membelah menjadi dua sel anak. Ditambahkan oleh Morgan (2007), pada fase ini, kromosom yang telah diduplikasi pada fase S dipisahkan dan dikemas dalam nukleus yang kemudian dibagikan ke sel anak.

Fase berikutnya adalah fase G1. Pada fase ini sinyal ekstraseluler akan menentukan perjalanan siklus sel apakah akan memasuki fase S untuk melanjutkan siklusnya ataukah memasuki fase G0 yaitu fase dimana sel tidak lagi mempunyai kemampuan membelah (Morgan, 2007). Sel dapat keluar dari fase G1 dan masuk ke fase G0 apabila berada dalam kondisi tanpa faktor pertumbuhan (Murti, 2007). Faktor pertumbuhan atau *growth factor* dan mitogen berperan dalam meregulasi tingkat ekspresi dari siklin D1, protein yang mengendalikan transisi dari fase G1 ke fase S. Fase G1 bergantung pada *growth factor* untuk dapat melanjutkan ke fase berikutnya. (Dharmayanti, 2003).

Secara *in vitro*, sel yang dikultur pada medium dengan konsentrasi serum yang sedikit akan tetap melakukan siklus G1-S-G2-M. Namun, sel hanya akan

menyelesaikan fase M dan kemudian akan masuk ke fase G₀. Penambahan serum atau *growth factor* dapat meningkatkan ekspresi siklin D1, sehingga sel terinduksi untuk masuk kembali ke siklus sel sampai ke titik restriksi atau titik pengontrolan untuk proses berikutnya (Jones, 2001; Dharmayanti, 2003). Jika sel berhasil diinduksi dan memasuki siklus sel kembali, maka sel akan tetap melakukan mitosis. Hal ini menyebabkan jumlah sel yang bertambah banyak dan meningkatnya proliferasi sel. Secara *in vitro*, proliferasi sel dapat diketahui dengan menghitung nilai *Population Doubling Time* (PDT).

Nilai *Population Doubling Time* (PDT) digunakan untuk menentukan tingkat proliferasi sel. PDT merupakan waktu yang diperlukan oleh populasi sel untuk menjadikan jumlahnya dua kali dari jumlah semula. Tingkat proliferasi sel dihitung berdasarkan nilai PDT dengan menghitung jumlah sel pada saat awal kultur dan saat panen atau akhir kultur yang kemudian dimasukkan dalam rumus berikut (Davis, 2011).

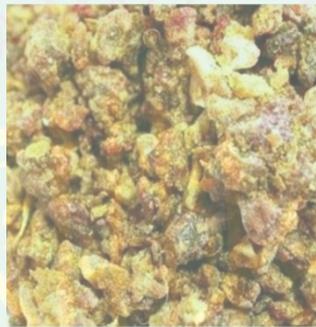
$$\text{PDT (hari)} = \frac{1}{\frac{(\log \text{ jumlah sel akhir} - \log \text{ jumlah sel awal}) \times 3.32}{\text{waktu (hari)}}$$

Semakin tinggi tingkat proliferasi sel, maka nilai PDT akan menunjukkan nilai yang rendah, yang berarti proliferasi semakin cepat (Kaiin dan Djuwita, 2016). Tingginya tingkat proliferasi sel menunjukkan bahwa sel mengalami pertumbuhan yang optimal.

2.4 Propolis

2.4.1 Tinjauan Umum Propolis

Propolis adalah suatu zat yang dihasilkan oleh lebah yang bertekstur lengket seperti lem, sehingga juga disebut *bee glue* (Herawati, 2015). Kata propolis berasal dari bahasa Yunani, yaitu “pro” yang berarti sebelum atau di depan, dan “polis” yang berarti kota atau komunitas. Kedua kata tersebut membentuk artian bahwa propolis merupakan sesuatu yang digunakan lebah untuk melindungi sarangnya (Farooqui, 2017).



Gambar 2.4 Propolis mentah (Taddeo, 2016)

Propolis dihasilkan oleh lebah dengan cara mengumpulkan resin atau getah dari berbagai macam tumbuhan, kemudian resin ini bercampur dengan saliva dan berbagai enzim yang ada pada lebah. Bagi lebah sendiri propolis bersifat desinfektan yang dapat membunuh bakteri ataupun virus yang masuk ke sarangnya (Herawati, 2015), sebagai perekat lubang pada sarang, melembutkan dinding dalam sarang, melindungi sarang dari ancaman cuaca, menjaga suhu dalam sarang tetap stabil dalam kisaran 35°C (Farooqui, 2017), memperkuat stabilitas struktural, mencegah pembusukan, dan mengurangi getaran dari luar sarang (Siregar, 2011).

Manfaat propolis tidak hanya sebatas pada kehidupan lebah itu sendiri, tapi juga bermanfaat bagi kesehatan manusia. Banyak penelitian secara *in vivo*

maupun *in vitro* yang melaporkan bahwa propolis memiliki aktivitas biologis yang sangat banyak, termasuk antibakteri, antiinflamasi, antioksidan (Tiveron, 2016), antifungi, antivirus (Zabaiou, 2017), imunomodulator (Tyastuti, 2006), antiplatelet, hepatoprotektif, antidiabetik, antialergi, antiasmatik, antitumor, neuroprotektif (Sforcin, 2016), dan stimulator sel (Najafi, 2007). Hal ini menunjukkan bahwa propolis dapat dijadikan obat bagi manusia. Dalam sebuah hadits shahih bukhori-muslim disebutkan sebagai berikut.

حَدِيثُ أَبِي سَعِيدٍ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ، أَنَّ رَجُلًا أَتَى النَّبِيَّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ، فَقَالَ: أَخِي يَشْتَكِي بَطْنَهُ فَقَالَ: اسْقِهِ عَسَلًا ثُمَّ أَتَى الثَّانِيَةَ، فَقَالَ: اسْقِهِ عَسَلًا ثُمَّ أَتَاهُ الثَّلَاثَةَ، فَقَالَ: اسْقِهِ عَسَلًا ثُمَّ أَتَاهُ، فَقَالَ: فَعَلْتُ فَقَالَ: صَدَقَ اللَّهُ وَكَذَبَ بَطْنُ أَخِيكَ، اسْقِهِ عَسَلًا فَسَقَاهُ، فَبَرَأَ.

(أخرجه البخاري في: (76) كتاب الطب: (4) باب الدواء بالعسل)

“Diriwayatkan dari Abu Sa’id r.a., bahwa sesungguhnya seorang laki-laki datang kepada Nabi SAW., lalu berkata; “Saudaraku sakit perutnya.” Maka Nabi SAW. berkata, “Minumkanlah ia madu.” Kemudian laki-laki itu datang untuk kedua kalinya, maka Nabi SAW. berkata, “Minumkanlah ia madu.” Lalu ia datang lagi yang ketiga kalinya, maka Nabi SAW. berkata, “Minumkanlah madu.” Kemudian dia datang lagi, lalu berkata, “Aku telah melakukannya.” Maka Nabi SAW. berkata, “Maha benar Allah, dan perut saudaramulah yang dusta, minumkanlah ia madu.” Kemudian laki-laki itu meminumkan madu (kepada saudaranya), lalu ia pun sembuh.” [Disebutkan oleh Al-Bukhari pada kitab ke-76 Kitab Pengobatan, bab ke-4 Bab Berobat dengan Madu]

Hadist tersebut menunjukkan bahwa Rasulullah meresepkan madu sebagai obat. Menurut Baqi (2011), penjelasan dari kata “صَدَقَ اللَّهُ”, yaitu ketika Allah berfirman dalam al-Quran, “Keluar dari perutnya minuman yang berbeda warnanya padanya terdapat obat bagi manusia (madu)”. Hal ini menunjukkan bahwa kata tersebut merujuk pada surah An-Nahl [16]: 69 sebagai berikut.

ثُمَّ كُلِي مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلًّا ۗ يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (69)

"Kemudian makanlah dari tiap-tiap (macam) buah-buahan dan tempuhlah jalan Tuhanmu yang telah dimudahkan (bagimu). Dari perut lebah itu keluar minuman yang bermacam-macam warnanya, di dalamnya terdapat obat menyembuhkan bagi manusia. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda kebesaran Tuhan bagi orang yang memikirkan." [QS. An-Nahl [16]: 69]

Ayat tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT telah menyisipkan obat

dalam tubuh lebah. Menurut tafsir Ibnu Katsir (1994), pada kalimat “فِيهِ شِفَاءٌ”

”للنَّاسِ” menunjukkan arti “di dalamnya terdapat obat bagi manusia”. Huruf “هـ”

dari kata “فِيهِ” disini memiliki arti kepemilikan yang ditunjukkan kepada lebah.

Hal ini menunjukkan bahwa segala sesuatu yang dihasilkan lebah membawa atau mengandung obat bagi kesehatan manusia. Produk dari lebah tidak hanya madu, namun juga *royal jelly*, *bee pollen*, *bee venom*, dan propolis.

2.4.2 Komposisi dan Kandungan Senyawa Aktif Ekstrak Propolis

Lebih dari 250 senyawa telah dibuktikan sebagai unsur penyusun propolis. Kemampuan propolis sebagai obat bagi kesehatan manusia tidak lepas dari kandungan propolis tersebut. Komposisi propolis mentah terdiri dari sebagian besar resin (polifenol) 50-55%, balsam dan aldehid $\pm 5\%$, lilin dan asam lemak 30%, minyak atsiri 8-10%, pollen $\pm 5\%$, senyawa organik dan mineral lainnya $\pm 5\%$ (Najafi, 2007; Kall, 1991).

Senyawa aktif propolis bergantung pada fitogeografi tumbuhan yang berbeda dari tempat dimana dan waktu spesifik propolis dikumpulkan serta secara sekunder bergantung pada pelarut dan metode ekstraksi (Mishima, 2005). Metode

ekstraksi yang sering digunakan untuk mengekstraksi propolis adalah metode maserasi. Maserasi merupakan metode penyarian sederhana untuk senyawa-senyawa yang tidak tahan panas, yaitu dengan merendam bahan dengan pelarut tertentu dalam jangka waktu tertentu (Suranto, 2007).

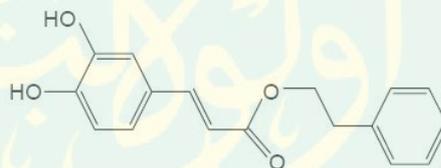
Walaupun kandungan senyawa aktif propolis dapat berbeda-beda, namun terdapat beberapa komponen utama pada propolis yang telah diidentifikasi, yaitu flavonoid, terpenoid, asam fenolat, gula, hidrokarbon, dan elemen mineral (Huang, 2014). Dalam pemanfaatannya, propolis tidak dapat digunakan sebagai bahan mentah, oleh karena itu propolis butuh dipurifikasi dengan ekstraksi menggunakan pelarut. Proses ini akan menghilangkan bahan lemah dan mempertahankan fraksi polifenol. Campuran ekstrak menggunakan pelarut etanol sangat cocok untuk mendapatkan hasil ekstrak yang kaya akan senyawa polifenol (Pietta, 2002).

Pelarut yang digunakan dalam ekstrak propolis untuk penelitian ini adalah pelarut etanol. Menurut Hastuti (2013), etanol merupakan pelarut yang termasuk dalam golongan alkohol yang memiliki sifat mampu melarutkan lebih banyak polifenol jika dibandingkan dengan air, karena alkohol lebih efektif dalam mendegradasi dinding sel yang bersifat nonpolar, sehingga polifenol dapat lepas. Berdasarkan penelitian Fokt (2010), senyawa yang dihasilkan dari ekstrak etanol propolis adalah tanin, polifenol, poliasetilen, terpenoid, sterol atau steroid alkohol, dan alkaloid.

Senyawa-senyawa tersebut memiliki efek antiapoptosis (Mu, 2007) dan neuroprotektif (Kujawski, 2016; Vauzour, 2012; Kanhere, 2013; Sun, 2014; Bi, 2015). Menurut Susilo (2009), polifenol terbanyak yang dimiliki propolis berasal

dari kelompok flavonoid, kemudian asam fenolat dan ester, fenol aldehid, keton, dan lainnya. Salah satu senyawa turunan asam fenolat yang aktif berperan sebagai neuroprotektif adalah bentuk ester dari asam kafeat (*caffeic acid*), yaitu *Caffeic acid phenylethyl ester* (CAPE).

Menurut Hastuti (2013), CAPE (gambar 2.10) adalah ester asam *caffeic*, turunan asam fenolat yang memiliki struktur mirip flavonoid serta merupakan senyawa utama dalam propolis dan memiliki jangkauan luas sebagai obat. Beberapa manfaat CAPE yang diungkapkan oleh Orban (2000), Ozturk (2012), dan Kurauchi (2012), yaitu memiliki aktivitas antioksidan yang secara kuat menghambat produksi ROS dalam neurotrofil manusia, memiliki kemampuan proteksi dalam melawan perkembangan berbagai macam sel kanker, dan melindungi neuron dopaminergik dari kerusakan neurodegeneratif dengan menginduksi *brain-derived neurotropic factor* (BDNF) (Kurauchi, 2012).



Gambar 2.5 Struktur kimia CAPE (Moosavi, 2015)

2.5 Peran Ekstrak Propolis Terhadap Kultur Sel Otak

Otak merupakan organ yang paling rentan terhadap serangan radikal bebas karena kandungan lemak yang tinggi (sekitar 80%) sehingga resiko terkena kerusakan oksidatif sangat tinggi (Aksenova, 2005). Selain itu, jaringan saraf otak yang mengalami kerusakan tidak dapat mengalami regenerasi, sehingga dapat menimbulkan penyakit (Horner, 2000). Secara *in vitro*, masalah sel saraf otak juga

tidak jauh dari keadaan *in vivo*. Menurut Harvey (2014), kultur sel saraf otak primer terkenal sulit. Hal ini dikarenakan kultur sel saraf otak memiliki kelangsungan hidup yang singkat. Oleh karena itu, dibutuhkan bahan tambahan dalam media kultur yang mampu meningkatkan kelangsungan hidup serta meningkatkan proliferasi sel saraf otak. Hal ini juga dapat bermanfaat untuk upaya perbaikan sel saraf otak sehingga penyakit yang berasal dari kerusakan oksidatif dapat dihindarkan.

Dalam penelitian ini, bahan tambahan yang digunakan adalah ekstrak propolis. Menurut Ni (2017), ekstrak propolis dapat melindungi neuron dari kerusakan dengan meningkatkan ekspresi gen *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) pada kultur *cell line* neuron. Mekanisme ekstrak propolis dalam meningkatkan ekspresi gen BDNF pada sel terjadi karena dalam ekstrak propolis mengandung senyawa *Caffeic acid phenylethyl ester* (CAPE) yang dapat meningkatkan aktivasi *extracellular signal regulated kinase* (ERK). Aktivasi ERK kemudian merubah lokalisasi dan memfosforilasi molekul target yang berbeda, termasuk regulator transkripsi (Moosavi, 2015). Aktivasi ERK penting dalam proliferasi karena translokasi ERK dapat memicu sel untuk memasuki siklus sel melalui *growth factor*, yakni BDNF (Chambard, 2007).

BDNF pada akhirnya akan menghasilkan fosforilasi protein CREB. Fosforilasi ikatan CREB terhadap *CREB-binding protein* menyebabkan peningkatan transkripsi gen target. Gen ini termasuk dalam aktivitas kelangsungan hidup sel, diferensiasi, pertumbuhan, plastisitas sinaps, dan memori jangka panjang (Moosavi, 2015). Salah satu gen target CREB adalah *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). BDNF merupakan salah satu famili neurotropin

dengan struktur yang mirip faktor pertumbuhan dan berperan dalam proliferasi, diferensiasi dan kelangsungan hidup sel saraf (Juananda, 2015). Dengan meningkatnya ekspresi gen BDNF ini, sel akan memasuki siklus sel dan melakukan mitosis, sehingga proliferasi meningkat.

Senyawa lain dalam ekstrak propolis yang memiliki peran terhadap kultur sel otak adalah polifenol. Menurut Farooqui (2012), propolis merupakan salah satu sumber polifenol paling melimpah (50-55%), dan terutama mengandung flavonoid, asam fenolik dan esternya. Moosavi (2015) menambahkan, senyawa polifenol memiliki aktivitas antioksidan dan neuroprotektif yang kuat. Polifenol dapat melindungi neuron dari kerusakan dengan melibatkan efek neurotropik sehingga dapat meningkatkan kelangsungan hidup, pertumbuhan, proliferasi, dan diferensiasi neuron.

Polifenol tidak hanya dikenal sebagai antioksidan, tapi juga sebagai regulator metabolisme sel. Hal ini disebabkan karena polifenol dapat berinteraksi dengan permukaan sel dan kemudian melakukan penetrasi melalui membran plasma ke dalam sitoplasma. Polifenol dapat mempengaruhi beberapa kemampuan fisik membran lipid termasuk difusi, kelarutan, stabilitas osmotik, permeabilitas terhadap senyawa yang larut air, dan dapat berinteraksi dengan membran dan fusi sel (Tarahovsky, 2008).

Salah satu kelompok polifenol, yakni flavonoid juga memiliki peran dalam kultur sel otak. Kemampuan antioksidannya dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang disebabkan *reactive oxygen species* (ROS) (Nijveldt *et al*, 2001). Flavonoid dapat melindungi *cell line* neuron dari kerusakan yang disebabkan induksi *hydrogen peroxide* (H₂O₂) serta dapat meningkatkan viabilitas sel pada

konsentrasi 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , dan 250 μM (Dajas *et al*, 2003). Menurut Widayati (2019), flavonoid dapat menstabilkan ROS dengan bereaksi dengan molekul bebas yang kemudian membentuk radikal yang relatif stabil dan dapat bertahan lama sampai bereaksi dengan produk nonradikal.

Selain polifenol, dalam ekstrak propolis juga terkandung terpenoid dan tannin. Terpenoid merupakan derivat dehidrogenasi dan oksigenasi senyawa terpen yang memiliki kemampuan untuk melindungi neuron melawan β -amyloid peptida, glutamat, NO, oxygen, kehilangan glukosa, dan stimulus toksik lainnya dengan mencegah apoptosis dengan menargetkan beberapa kinase, meningkatkan pembersihan ROS dan melindungi integritas mitokondria (Wiat, 2014). Sedangkan tannin merupakan sebuah kelompok dari senyawa kompleks fenol, polifenol, dan flavonoid yang memiliki kemampuan untuk menjaga integritas membrane sel karena memiliki residu asam galat yang cukup untuk berinteraksi dengan semua kelompok kepala lipid dan menutupi permukaan bilayer (Nobre-Junior, 2014 dan Tarahovsky, 2008).

Menurut Sumardi (2007), jika integritas membrane sel terjaga maka permeabilitas membrane dapat berfungsi dengan baik. Hal ini menyebabkan transportasi materi yang keluar masuk sel dapat berjalan lancar sehingga aktivitas biologis sel seperti pertumbuhan dan perkembangan sel dapat berjalan secara optimal. Senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak propolis tersebut pada akhirnya dapat melindungi dan mendukung kelangsungan hidup sel otak, sehingga dapat meningkatkan viabilitas sel. Jika viabilitas sel meningkat, maka waktu yang digunakan untuk berproliferasi semakin cepat.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian mengenai pengaruh pemberian propolis terhadap viabilitas dan nilai *Population Doubling Time* (PDT) sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro* ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah kontrol (tanpa perlakuan) dan otak tikus yang diberi propolis dengan 5 konsentrasi yang berbeda. Pembagian perlakuan tersebut sebagai berikut.

1. P1 (perlakuan 1): kultur sel otak tanpa pemberian ekstrak propolis (kontrol)
2. P2 (perlakuan 2): kultur sel otak dengan pemberian ekstrak propolis 20 µg/mL
3. P3 (perlakuan 3): kultur sel otak dengan pemberian ekstrak propolis 40 µg/mL
4. P4 (perlakuan 4): kultur sel otak dengan pemberian ekstrak propolis 60 µg/mL
5. P5 (perlakuan 5): kultur sel otak dengan pemberian ekstrak propolis 80 µg/mL
6. P6 (perlakuan 6): kultur sel otak dengan pemberian ekstrak propolis 100 µg/mL

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel, yaitu variabel bebas, variabel terikat, dan variabel terkontrol. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah propolis yang dibuat dalam 5 konsentrasi, yaitu 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL, dan 100 µg/mL. Variabel terikat dalam

penelitian ini adalah viabilitas dan nilai *Population Doubling Time* (PDT). Sedangkan variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah tikus usia 3-4 hari.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2018 - April 2019 di Laboratorium Kultur Jaringan Hewan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *laminar air flow* (LAF) (Vertical Air Flow, AlabTech, Korea), inkubator CO₂ 5 % (HERA Cell 150, ThermoScientific, Jepang), mikroskop *inverted* (Nikon Eclipse, Jepang), oven (Heraeus, ThermoScientific, Jerman), hemositometer *Improved Neubauer*, autoklaf (Daihan Labtech, BioMedic, Korea), timbangan analitik (Sartorius, Finlandia), vortex (Tipe 37600, Thermolyne, Malaysia), kulkas (Clasio XD7, Toshiba), sentrifus (Labatuge 200, ThermoScientific, Jepang) tabung sentrifugasi 10 ml, erlenmeyer, botol ulir (*schott*), gelas beaker 25 ml, cawan petri, *tissue culture disk* (TC dish), rak tabung, corong kaca, tabung reaksi 10 ml, filter milipore 0,22 µl, bunsen, pinset, gunting, *blue tip*, *yellow tip*, mikropipet 100-1000 µl (BIORED), 20-200 µl (BIORED), aluminium foil, kain sablon, korek api, alat perlindungan diri (APD), karet, kertas label, dan tisu.

Bahan-bahan yang digunakan adalah otak tikus neonatus usia 3-4 hari, media *Dulbeccos Modified Eagles Medium with high glucose* (DMEM) (12100-038, Gibco, USA), *Phosphat Buffer Saline* (PBS, Gibco), *Fetal Bovine Serum* (FBS, Sigma), *penicillin* (Meiji, Indonesia), *streptomycin* (Meiji, Indonesia),

HEPES (Promega, USA), NaHCO₃ (Himedia), serum 10% (Biowest, USA), propolis, DMSO (Bioworld, Indonesia), DI steril (Otsuka, Jepang), NaCl 0.9%, tripsin (Sigma, Jerman) *tripan blue* (Sigma, Jerman), akuades, alkohol 70%, tipol, sunlight dan, handwash.

3.5 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dalam penelitian ini, yaitu:

3.5.1 Pembuatan Ekstrak Propolis

Propolis mentah didapatkan dari peternakan lebah di Karangploso, Malang sebanyak 300 gram yang kemudian diekstrak menggunakan metode maserasi dengan 1200 ml pelarut etanol 96%. Hasil maserasi kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* selama 1 jam.

3.5.2 Preparasi Alat

Preparasi alat dilakukan dengan cara melakukan sterilisasi sebelum penelitian agar terhindar dari kontaminasi. Alat-alat yang akan digunakan direndam dengan teepol selama 1 x 24 jam, kemudian dibilas sebanyak 21 kali dengan menggunakan air yang mengalir, dan pada bilasan terakhir dibilas menggunakan akuades. Selanjutnya, dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 60°C selama 1 jam. Setelah itu dibungkus aluminium foil untuk dilanjutkan pada langkah sterilisasi berikutnya.

Langkah sterilisasi berikutnya terbagi menjadi dua macam, yaitu basah dan kering. Sterilisasi kering digunakan untuk alat-alat yang berbahan kaca dengan oven bersuhu 121°C selama 3 jam. Sedangkan sterilisasi basah digunakan untuk alat-alat yang berbahan plastik dengan autoklaf bersuhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit yang kemudian dikeringkan kembali menggunakan oven dengan

suhu 60°C. Selanjutnya, alat-alat yang sudah steril dimasukkan ke dalam LAF dan di UV selama 30 menit sebelum digunakan.

3.5.3 Pembuatan Media

Media yang dibuat untuk penelitian ini ada 3 macam, yaitu:

3.5.3.1 Media Stok DMEM

Media stok DMEM dibuat sebanyak 100 ml dengan komposisi 1.35 gr DMEM, 0.37 gr NaHCO₃, 0.238 gr HEPES, 0.006 gr penicillin, 0.01 gr streptomycin, dan 100 ml DI steril. Bahan-bahan tersebut dilarutkan hingga homogen, kemudian disaring menggunakan membran milipore 0.22 µm. Stok media tersebut ditambah FBS 10% sebagai media kultur.

3.5.3.2 Media Pencuci

Media pencuci dibuat dari NaCl 0.9% dan antibiotik (penicillin dan streptomycin), media DMEM 0% sebanyak 4 ml, dan media DMEM 10% sebanyak 1 ml. Media pencuci dibuat langsung saat melakukan penanaman sel.

3.5.3.3 Media Kultur dan Perlakuan

Media kultur dibuat dari DMEM dan FBS 10% yang ditambah dengan propolis dengan konsentrasi berbeda (20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL, dan 100 µg/mL). Media tersebut kemudian dimasukkan ke dalam TC dish sebanyak 3 ml dan diinkubasi dalam inkubator selama 60 menit dengan suhu 37°C dan CO₂ 5%.

Perlakuan menggunakan propolis yang diencerkan menggunakan DMSO terlebih dahulu. Dibuat larutan stok DMSO 10% dengan melarutkan 1 ml DMSO ke dalam 10 ml DI steril. Kemudian dibuat larutan stok ekstrak dengan melarutkan 10 mg ekstrak propolis ke dalam 10 ml DMSO 10% sehingga

didapatkan larutan stok ekstrak propolis dengan konsentrasi 1 mg/mL atau 1000 µg/mL.

Selanjutnya dibuat ekstrak propolis dengan konsentrasi spesifik dari larutan tersebut, yaitu 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL, dan 100 µg/mL. Pembuatan konsentrasi spesifik dapat dilakukan menggunakan perhitungan seperti pada lampiran 1.

3.5.4 Isolasi dan Kultur Sel Otak

Tikus neonatus yang berumur 3-4 hari didislokasi, dibedah bagian kepala, dan diambil organ otak secara keseluruhan. Kemudian dicuci dengan NaCl 0.9% + antibiotik sebanyak 3 kali. Setelah itu, dicacah hingga hancur dan dihomogenasi menggunakan spuit 3 ml. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi 10 ml.

Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit dan dilakukan 3 kali. Sentrifugasi pertama adalah hasil homogenasi menggunakan spuit dan diambil peletnya. Sentrifugasi kedua adalah pelet dari hasil sentrifugasi pertama yang ditambah 2 ml media DMEM 0% dan diambil peletnya. Sentrifugasi ketiga adalah pelet dari hasil sentrifugasi kedua yang ditambah 1 ml DMEM 10%.

Hasil sentrifugasi yang terakhir dibuang supernatnya dan disisakan sedikit bersama pelet yang kemudian dihomogenasi. Diambil 50 µl suspensi dan dimasukkan kedalam TC dish yang telah berisi masing-masing perlakuan. Diinkubasi dan media diganti setiap 3 hari sekali.

3.5.5 Pengamatan Hasil Kultur

Pengamatan proliferasi sel otak hasil kultur dilakukan setelah 10 hari (Djuwita, 2012) dengan parameter viabilitas sel (%) dan nilai PDT (hari).

Langkah pertama yang dilakukan adalah tripsinasi, yaitu memisahkan sel dengan substrat. Media sel hasil kultur dibuang dan dicuci dengan NaCl 0.9% dua kali, kemudian ditambah 500 µl tripsin EDTA 0.25%. Selanjutnya dikocok secara perlahan dan diinkubasi pada suhu 37°C dan CO₂ 5% selama 3 menit.

Tahap kedua adalah sentrifugasi, yaitu memisahkan sel dengan komponen yang tidak dibutuhkan. Hasil tripsinasi dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan ditambah NaCl 0.9% kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Kemudian supernatan dibuang dan pellet diambil sebanyak 20 µl untuk diwarnai dengan 20 µl 0.4% *tripan blue* dan diamati menggunakan mikroskop. Sel yang hidup maupun sel yang mati (terwarnai) dihitung menggunakan *hand counter* yang kemudian dihitung viabilitas selnya dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{jumlah sel yang hidup}}{\text{total sel yang dihitung}} \times 100\%$$

Data jumlah sel yang didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam rumus berikut untuk menentukan nilai PDT (hari) dari masing-masing perlakuan (Davis, 2011).

$$\text{PDT (hari)} = \frac{1}{\frac{(\log \text{ jumlah sel akhir} - \log \text{ jumlah sel awal}) \times 3.32}{\text{waktu (hari)}}$$

3.6 Analisis Data

Data hasil pengamatan parameter, yakni viabilitas sel dan nilai PDT diuji menggunakan uji *One Way ANOVA (Analysis of Variance)* karena data yang dibandingkan berasal dari enam kelompok perlakuan yang berbeda dengan satu variabel bebas. Syarat agar dapat melakukan analisis menggunakan *One Way ANOVA* adalah data harus terdistribusi normal dan homogen. Jika tidak, maka dilakukan transformasi data agar terdistribusi normal dan homogen. Namun jika

masih tidak bisa, maka data harus dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis (Dahlan, 2016).

Jika hasil dari uji *One Way* ANOVA dan uji Kruskal-Wallis menunjukkan perbedaan signifikan, maka dilanjutkan dengan uji lanjut dengan $\alpha=0.05$. Jenis uji lanjut yang akan dilakukan ditentukan setelah melihat nilai KK (Koefisien Keragaman). Jika nilai KK besar (10% untuk data homogen dan 20% untuk data heterogen), maka uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan. Jika nilai KK sedang (5-10% untuk data homogen dan 10-20% untuk data heterogen), maka uji lanjut yang dilakukan adalah uji lanjut BNT (Beda Nyata Terkecil). Dan jika nilai KK kecil (maksimal 5% untuk data homogen dan maksimal 10% untuk data heterogen), maka uji lanjut yang dilakukan adalah uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) (Hanifah, 2010).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setiap jenis sel memiliki karakteristik yang berbeda-beda saat dibiakkan secara *in vitro*. Menurut Baum (2006), sel saraf otak merupakan sel yang khusus dan selektif mengenai lingkungan tempat tumbuhnya. Sel saraf otak dapat bertahan hidup dan berkembang dengan baik jika dikultur bersama sel glia. Dalam penelitian ini, sel yang digunakan merupakan sel otak secara keseluruhan.

Pertumbuhan dan perkembangan sel dalam kultur *in vitro* dapat diamati berdasarkan viabilitas dan nilai *Population Double Time* (PDT). Menurut Bank dan Schmehl (1989), viabilitas didefinisikan sebagai kemampuan sistem makhluk hidup untuk mempertahankan diri agar tetap dalam kondisi stabil. Jika sel dalam kondisi yang stabil, maka sel dapat melakukan proliferasi dengan optimal sehingga jumlah sel akan bertambah. Wulandari (2003) menambahkan, viabilitas sel dapat ditentukan dengan membandingkan jumlah sel yang hidup dan jumlah sel yang mati. Semakin tinggi jumlah sel yang hidup, maka menunjukkan bahwa sel dapat beradaptasi dengan media kultur dengan baik dan dapat menerima perlakuan pemberian ekstrak propolis sebagai agen mitogen atau *growth factor*.

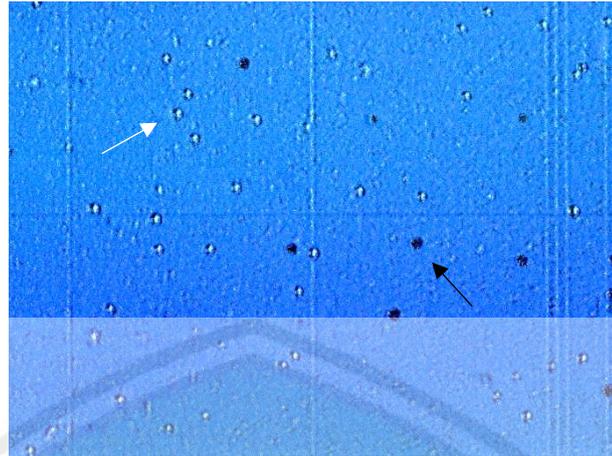
Tingkat proliferasi sel dapat diketahui berdasarkan nilai PDT. Menurut Trenggono (2009), nilai PDT merupakan waktu yang diperlukan oleh populasi sel untuk menjadikan jumlahnya dua kali lipat dari jumlah semula. Jika nilai PDT tinggi, maka tingkat proliferasinya rendah, namun jika nilai PDT rendah, maka tingkat proliferasinya tinggi. Berikut merupakan hasil penelitian tentang pengaruh

pemberian ekstrak propolis terhadap viabilitas dan PDT sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*.

4.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis Terhadap Viabilitas Sel Otak Tikus (*Rattus norvegicus*) Secara *In Vitro*

Viabilitas merupakan salah satu parameter penting yang menunjukkan kemampuan sel untuk bertahan hidup dan menjalankan proses metabolisme dalam media selama proses kultur berlangsung (Bolt, 2001). Menurut Browne dan Al-Rubeai (2011), dalam kultur sel, viabilitas yang optimal sangat penting dalam menjaga kualitas sel dan dapat mempengaruhi keberhasilan kultur. Sedangkan sel yang *non-viable* (mati) dalam kultur dapat menghambat produktifitas sel dalam perkembangannya. Jadi, semakin tinggi viabilitas sel, maka semakin tinggi kemampuan sel untuk bertahan hidup dan melakukan proliferasi.

Viabilitas sel dapat ditentukan dengan pewarnaan menggunakan *trypan blue* 0.4%. Menurut Browne dan Al-Rubeai (2011), protokol umum yang dilakukan untuk mengamati viabilitas sel adalah dengan memperjelas membran plasma melalui pewarnaan. Ditambahkan oleh Trenggono (2009), membran sel yang rusak atau mati akan mengikat zat warna sehingga sel terwarnai, sedangkan membran sel yang normal atau hidup tidak akan terwarnai karena membran sel impermeabel terhadap zat warna seperti yang terlihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Viabilitas sel dengan pewarnaan *trypan blue* 0.4% di bawah mikroskop *inverted* perbesaran 200x; panah hitam: sel yang terwarnai (mati); panah putih: sel yang tidak terwarnai atau bening (hidup).

Setelah melalui perhitungan perbandingan jumlah sel hidup dan jumlah sel mati, didapatkan data berupa persentase sel hidup dari masing-masing perlakuan. Berikut merupakan tabel 4.1 yang menunjukkan rata-rata viabilitas sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro* dengan dan tanpa pemberian ekstrak propolis.

Tabel 4.1 Rata-rata viabilitas (%) sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro* pada hari ke-10 dengan dan tanpa pemberian ekstrak propolis

Perlakuan	Rata-rata Viabilitas (%) \pm SD
P1 (0 $\mu\text{g/mL}$)	86.3 \pm 4.11
P2 (20 $\mu\text{g/mL}$)	88.0 \pm 1.63
P3 (40 $\mu\text{g/mL}$)	89.5 \pm 1.00
P4 (60 $\mu\text{g/mL}$)	89.8 \pm 1.71
P5 (80 $\mu\text{g/mL}$)	90.3 \pm 3.09
P6 (100 $\mu\text{g/mL}$)	87.5 \pm 2.38

Berdasarkan tabel 4.1, dapat diketahui bahwa kultur sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) dalam media DMEM 10% yang ditambahkan ekstrak propolis dengan konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, dan 80 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan hasil rata-rata viabilitas yang meningkat berturut-turut, yaitu 86.3 \pm 4.11 %, 88.0 \pm 1.63 %, 89.5 \pm 1.00 %, 89.8 \pm 1.71 %, dan 90.3 \pm 3.09 %. Sedangkan pada konsentrasi

100 µg/mL, rata-rata viabilitas menurun menjadi 87.5 ± 2.38 %. Seluruh perlakuan pemberian ekstrak propolis menunjukkan rata-rata viabilitas yang lebih tinggi dibandingkan kontrol yang memiliki rata-rata viabilitas sebesar 86.3 ± 4.11 %. Perbedaan hasil viabilitas sel otak yang dikultur dengan perlakuan ekstrak propolis menunjukkan bahwa dalam ekstrak propolis terdapat senyawa-senyawa yang dapat membantu sel untuk meningkatkan kemampuan bertahan hidup, sehingga viabilitas sel otak yang dikultur dengan pemberian ekstrak propolis lebih tinggi daripada sel otak yang dikultur tanpa pemberian ekstrak propolis.

Kemampuan ekstrak propolis dalam meningkatkan viabilitas sel dapat dikarenakan adanya kandungan polifenol, tanin, dan terpenoid. Ekstrak propolis merupakan salah satu sumber polifenol yang melimpah dengan jumlah 50% dari keseluruhan komponen yang dimiliki (Pietta, 2002; Farooqui, 2012). Senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan dan neuroprotektif yang kuat. Polifenol dapat melindungi neuron dari kerusakan sehingga dapat meningkatkan kelangsungan hidup, pertumbuhan, dan proliferasi (Moosavi, 2015).

Kandungan terpenoid dan tanin dalam ekstrak propolis juga memiliki peran penting dalam meningkatkan viabilitas sel otak karena memiliki kemampuan untuk menjaga integritas membran sel. Terpenoid merupakan derivat dehidrogenasi dan oksigenasi senyawa terpen yang memiliki kemampuan untuk melindungi neuron dengan mencegah apoptosis, meningkatkan pembersihan ROS dan melindungi integritas mitokondria (Wuart, 2014). Sedangkan tanin memiliki kemampuan untuk berikatan dengan permukaan membran sel, membangun “jembatan”, dan memulai interaksi serta adhesi dengan sel. Proses ini disertai dengan reduksi potensi membran dipol, interdigitasi lipid, dan pengurangan jarak antarbilayer dari

15 Å menjadi 5 Å. Kemampuan tanin tersebut dikarenakan tanin memiliki residu asam galat yang cukup untuk berinteraksi dengan semua kelompok kepala lipid dan menutupi permukaan bilayer (Tarahovsky, 2008). Terjaganya integritas membran sel dapat menyebabkan transport materi yang keluar masuk sel tetap berjalan dengan baik, sehingga aktivitas biologis sel seperti pertumbuhan dan perkembangan sel dapat berjalan secara optimal.

Berdasarkan tabel 4.1 dapat diketahui bahwa pada perlakuan P6 dengan pemberian konsentrasi ekstrak propolis sebesar 100 µg/mL menyebabkan rata-rata viabilitas sel otak menurun, tetapi tidak lebih rendah dari viabilitas kontrol. Dalam penelitian Agca (2017), dilaporkan bahwa konsentrasi ekstrak propolis sebesar 100 µg/mL dapat menurunkan viabilitas sel astrosit karena konsentrasi senyawa polifenol yang terlalu tinggi dapat menghambat sinyal molekul, memodulasi aktivitas onkogen yang mendorong proses apoptosis atau nekrosis, dan perubahan keadaan redoks sel. Hal ini menunjukkan bahwa tingginya konsentrasi tidak selalu membawa hasil yang baik dan dalam menggunakan segala sesuatu harus dalam kadar yang sesuai serta tidak berlebihan. Allah SWT telah berfirman dalam surah al-Ma'idah [5]: 77 sebagai berikut.

قُلْ يَا أَهْلَ الْكِتَابِ لَا تَغْلُوا فِي دِينِكُمْ غَيْرَ الْحَقِّ وَلَا تَتَّبِعُوا أَهْوَاءَ قَوْمٍ قَدْ ضَلُّوا مِنْ قَبْلُ
وَأَضَلُّوا كَثِيرًا وَضَلُّوا عَنْ سَوَاءِ السَّبِيلِ (77)

“Hai Ahli Kitab, janganlah kamu berlebih-lebihan (melampaui batas) dengan cara tidak benar dalam agamamu. Dan janganlah kamu mengikuti hawa nafsu orang-orang yang telah sesat dahulu (sebelum kedatangan Muhammad) dan mereka telah menyesatkan kebanyakan (manusia), dan mereka tersesat dari jalan yang lurus”. [Q.S. Al-Ma'idah [5]: 77]

Allah melarang umat-Nya bersikap berlebih-lebihan walaupun dengan niat atau tujuan yang baik. Menurut tafsir Al-Qurthubi (2008), pada kalimat “لَا تَغْلُوا”

menunjukkan bahwa Allah melarang sifat berlebihan. Ditambahkan oleh Ath-Thabari (2008), pada kalimat “لَا تَعْلُوا”، memiliki asal kata “الْعُلُو” yang artinya melampaui segala hal, atau melampaui batas. Jika ayat tersebut ditarik pada penelitian ini, pada konsentrasi ekstrak propolis sebesar 100 µg/mL merupakan konsentrasi yang melampaui batas kemampuan sel otak untuk merespon senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak tersebut, sehingga pada konsentrasi tersebut menyebabkan penurunan viabilitas sel.

Data mengenai rata-rata viabilitas sel otak yang diperoleh tersebut kemudian diuji secara statistika menggunakan aplikasi SPSS v16.0. Uji awal yang dilakukan adalah uji normalitas (*Kolmogorov-Smirnov*) dan uji homogenitas (*Levene test*) untuk menentukan jenis analisis selanjutnya yang akan digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap viabilitas sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa data terdistribusi secara normal karena memiliki nilai signifikansi yang lebih besar dari 0.05, yaitu 0.495 dan hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa data termasuk data yang homogen karena memiliki nilai signifikansi yang juga lebih besar dari 0.05, yaitu 0.070 (Lampiran 2). Kedua hasil uji tersebut menunjukkan bahwa data memenuhi kriteria untuk dianalisis menggunakan ANOVA *one way* sehingga diperoleh hasil seperti pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Ringkasan analisis ANOVA *one way* pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap viabilitas sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*.

SK	db	JK	KT	F Hitung	F Tabel (5%)
Perlakuan	5	47.75	9.55	1.47871*	2.63999
Galat	18	116.25	6.46		
Total	23	164			

Keterangan: *F hitung < F tabel 5% sehingga H₀ diterima yang berarti perlakuan tidak berbeda nyata

Berdasarkan tabel 4.2 dapat diketahui bahwa nilai F hitung < F tabel 5%, yaitu $1.47871 < 2.63999$, sehingga H₀ diterima dan H₁ ditolak yang artinya pemberian ekstrak propolis tidak berpengaruh nyata terhadap viabilitas sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*. Hal ini dimungkinkan karena rata-rata viabilitas yang didapat (tabel 4.1) memiliki rentang yang rendah satu sama lain, sehingga secara statistika dianggap tidak ada pengaruh secara nyata.

Selain itu, bisa juga dikarenakan viabilitas yang dihasilkan terlalu rendah. Pada perlakuan P5 yang menghasilkan nilai viabilitas tertinggi hanya meningkatkan viabilitas sel sebesar 4% dibandingkan perlakuan kontrol. Pada penelitian Shimazawa (2005), ekstrak propolis pada konsentrasi tertinggi yang digunakan, yaitu 40 µg/mL hanya mampu meningkatkan viabilitas *cell line* neuron sebesar 6% dibandingkan control. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak propolis pada konsentrasi 80 µg/mL juga kurang mampu meningkatkan viabilitas sel otak. Dengan demikian, dimungkinkan rendahnya viabilitas yang dihasilkan dalam penelitian ini menjadi penyebab tidak adanya pengaruh secara statistika.

Penyebab lainnya juga dapat disebabkan karena sifat selektif dari ekstrak propolis yang dapat menginduksi apoptosis pada sel abnormal (tumor) tanpa

melukai sel normal, sehingga viabilitas sel pada sel normal tetap terjaga. Jadi pada perlakuan pemberian ekstrak propolis terhadap sel normal hasilnya tidak berbeda jauh dengan perlakuan kontrol. Dalam penelitian Mouse *et al.* (2012) yang membandingkan pengaruh ekstrak etanol propolis dengan konsentrasi 32.5 µg/mL, 65 µg/mL, 130 µg/mL, dan 260 µg/mL terhadap sel tumor ginjal hamster, sel tumor laring manusia, dan sel mastocytoma tikus (BSR, Hep-2, dan P815) dengan sel normal (sel mononuklear darah perifer) menunjukkan bahwa ekstrak etanol propolis secara signifikan dapat menyebabkan apoptosis atau menurunkan viabilitas sel tumor sejalan dengan meningkatnya konsentrasi, namun pada sel normal ekstrak tersebut tidak bersifat toksik dan tidak mempengaruhi viabilitas sel normal. Jadi walaupun memiliki lebar interval konsentrasi yang cukup besar, namun jika ekstrak propolis diberikan pada sel normal, hasilnya tidak berbeda jauh dengan perlakuan kontrol.

Selain itu, penggunaan tripan blue sebagai media uji pewarnaan sel dapat mempengaruhi hasil viabilitas. Menurut Aslanturk (2017), penggunaan tripan blue memiliki kekurangan, yaitu kesalahan perhitungan bisa mencapai 10% dan pewarnaannya tidak dapat membedakan antara sel yang sehat dan sel yang hidup tapi telah kehilangan fungsi selnya.

Dengan demikian, maka pemberian ekstrak propolis dalam penelitian ini walaupun ada kecenderungan peningkatan viabilitas sel namun tidak secara nyata. Hasil ini dapat mempengaruhi hasil uji statistik pada nilai *Population Doubling Time* (PDT). Jika pemberian ekstrak propolis tidak berpengaruh pada viabilitas sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*, maka kemungkinan besar pada nilai PDT juga tidak berpengaruh. Hal ini dikarenakan viabilitas sel berpengaruh

terhadap kemampuan sel untuk berproliferasi. Jika viabilitas sel tinggi, maka sel dapat melakukan proliferasi dengan baik, namun sebaliknya, jika viabilitas sel rendah maka kemampuan sel untuk berproliferasi juga rendah.

4.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis Terhadap Nilai *Population Doubling Time* (PDT) Sel Otak Tikus (*Rattus norvegicus*) Secara *In Vitro*

Parameter lain dalam penelitian ini adalah nilai *Population Doubling Time* (PDT) untuk mengetahui tingkat proliferasi sel otak. Semakin cepat proses proliferasi sel, maka nilai PDT yang dicapai pun semakin cepat (Kaiin dan Djuwita, 2016). Untuk mengetahui nilai PDT, dapat dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel sebelum dan sesudah dikultur. Berikut merupakan tabel 4.3 hasil perhitungan nilai PDT sel otak dari masing-masing perlakuan. Semakin tinggi nilai PDT, semakin rendah tingkat proliferasi selnya, begitu juga sebaliknya.

Tabel 4.3 Rata-rata nilai PDT (hari) sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) pada hari ke-10 secara *in vitro* dengan dan tanpa pemberian ekstrak propolis

Perlakuan	Rata-rata Nilai PDT (hari) \pm SD
P1 (0 μ g/mL)	5.03 \pm 0.66
P2 (20 μ g/mL)	4.55 \pm 1.86
P3 (40 μ g/mL)	3.69 \pm 1.49
P4 (60 μ g/mL)	3.41 \pm 1.23
P5 (80 μ g/mL)	2.88 \pm 0.66
P6 (100 μ g/mL)	4.65 \pm 1.54

Berdasarkan tabel tersebut dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak propolis dalam media DMEM 10% terhadap kultur sel otak dapat mempercepat nilai PDT atau waktu untuk proliferasi sel seiring meningkatnya konsentrasi ekstrak dengan rata-rata nilai PDT secara berturut-urut 5.03 \pm 0.66 hari (P2), 3.69

± 1.49 hari (P3), 3.41 ± 1.23 hari (P4), dan 2.88 ± 0.66 hari (P5). Nilai PDT tercepat dicapai oleh P5, yaitu 2.88 ± 0.66 hari yang berarti pada perlakuan P5, sel otak dapat menjadikan jumlahnya dua kali lipat dari jumlah semula dalam waktu 2.88 hari atau sekitar 3 hari.

Sedangkan pada P6, nilai PDT lebih tinggi dari pada perlakuan sebelumnya, yaitu 4.65 ± 1.54 hari yang berarti tingkat proliferasi menurun dibanding perlakuan sebelumnya, tapi masih lebih tinggi dibandingkan P1 atau kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak propolis berdampak positif dalam pertumbuhan sel otak sehingga dapat meningkatkan proliferasi sel.

Kemampuan ekstrak propolis dalam meningkatkan proliferasi sel otak diantaranya dapat dikarenakan adanya kandungan turunan asam fenolat dari polifenol, yakni *Caffeic acid phenylethyl ester* (CAPE) yang memiliki kemampuan untuk menginduksi *brain-derived neurotropic factor* (BDNF). CAPE memiliki kelarutan yang tinggi terhadap lipid, sehingga mudah melewati membran dan memasuki sel (Kudugunti *et al.*, 2010). Aktivitas CAPE kemudian terjadi melalui aktivasi *extracellular signal regulated kinase* (ERK) yang penting dalam proliferasi sel karena dapat memicu sel untuk memasuki siklus sel melalui *growth factor*, yakni BDNF (Chambard, 2007). Hasil penelitian Ni (2017) menunjukkan bahwa ekstrak propolis dapat meningkatkan ekspresi gen *brain-derived neurotropic factor* (BDNF) secara signifikan pada kultur *cell line* neuron. Adanya BDNF ini dapat memicu sel untuk memasuki siklus sel, sehingga jumlah sel akan bertambah.

Faktor pertumbuhan atau *growth factor* dan mitogen berperan dalam meregulasi tingkat ekspresi dari siklin D1, protein yang mengendalikan transisi

dari fase G1 ke fase S. Fase G1 bergantung pada *growth factor* untuk dapat melanjutkan ke fase berikutnya (Dharmayanti, 2003). BDNF merupakan salah satu famili neurotropin dengan struktur yang mirip faktor pertumbuhan dan berperan dalam proliferasi, diferensiasi dan kelangsungan hidup sel saraf (Juananda, 2015). Dengan meningkatnya ekspresi BDNF ini, sel akan memasuki siklus sel dan melakukan mitosis, sehingga proliferasi meningkat. Meningkatnya proliferasi dapat dilihat dari nilai PDT yang semakin kecil, seperti pada perlakuan P1 hingga P5.

Selain CAPE, kelompok lain dari polifenol yaitu flavonoid dalam ekstrak propolis juga berperan dalam mempercepat nilai PDT atau meningkatkan proliferasi sel otak. Hal ini disebabkan kemampuan flavonoid sebagai antioksidan yang mampu melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang disebabkan *reactive oxygen species* (ROS), produk sampingan proses metabolisme pada sel. Flavonoid dapat menangkal ROS secara langsung dengan bereaksi dengan molekul bebas (ROS) yang kemudian membentuk radikal yang relatif stabil dan dapat bertahan lama sampai bereaksi dengan produk nonradikal (Nijveldt *et al*, 2001; Widayati, 2012). Radikal yang stabil tidak akan bereaksi dengan komponen membran sel (peroksidasi lipid), sehingga integritas membran sel akan tetap terjaga, begitu pula permeabilitas membran sel. Jika permeabilitas membran terjaga, sel dapat melakukan aktivitas biologis sel seperti pertumbuhan sel dapat berjalan secara optimal, sehingga waktu untuk proliferasi dan nilai PDT yang dicapai semakin cepat.

Berdasarkan tabel 4.3 dapat diketahui bahwa pada perlakuan P6 (100 $\mu\text{g/mL}$) dapat menurunkan proliferasi sel otak. Hal ini dapat disebabkan karena aktivitas

antioksidan dari golongan fenol pada konsentrasi yang tinggi akan menghilang dan bahkan bisa berubah menjadi prooksidan. Munculnya prooksidan dapat menimbulkan kerusakan sel akibat ROS yang dapat mengganggu proses proliferasi (Gordon, 1990; Widayati, 2019), sehingga proliferasi menurun dengan ditandai nilai PDT yang meningkat.

Selanjutnya, data mengenai rata-rata nilai PDT sel otak yang diperoleh tersebut diuji secara statistika. Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa data terdistribusi secara normal karena memiliki nilai signifikansi yang lebih besar dari 0.05, yaitu 0.664 dan hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa data termasuk data yang homogen karena memiliki nilai signifikansi yang juga lebih besar dari 0.05, yaitu 0.499 (Lampiran 3). Kedua hasil uji tersebut menunjukkan bahwa data memenuhi kriteria untuk melakukan analisis menggunakan ANOVA *one way* sehingga diperoleh hasil seperti pada tabel 4.4.

Tabel 4.4 Ringkasan analisis ANOVA *one way* mengenai pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap nilai PDT sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*.

SK	db	JK	KT	Fhitung	Ftabel (5%)
Perlakuan	5	13.87089	2.77418	1.59399*	2.63999
Galat	18	31.32701	1.74039		
Total	23	45.1979			

Keterangan: *F hitung < F tabel 5% sehingga H₀ diterima yang berarti perlakuan tidak berbeda nyata

Berdasarkan tabel 4.4 dapat diketahui bahwa nilai F hitung < F tabel 5%, yaitu $1.593999 < 2.639999425$, sehingga H₀ diterima dan H₁ ditolak yang artinya pemberian ekstrak propolis tidak berpengaruh nyata terhadap nilai PDT sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*. Hasil ini dapat disebabkan karena rata-rata nilai PDT (tabel 4.3) memiliki rentang yang rendah satu sama lain.

Tidak adanya pengaruh pada nilai PDT menunjukkan bahwa dalam penelitian ini ekstrak propolis tidak dapat meningkatkan proliferasi sel otak. Proliferasi sel otak dapat dipicu oleh BDNF melalui senyawa CAPE dalam ekstrak propolis. Akan tetapi, dalam penelitian Annis *et al.* (2017) disebutkan bahwa CAPE dapat menginduksi BDNF ketika sel otak mengalami cedera. Hal ini dimungkinkan menjadi penyebab hasil nilai PDT tidak terlalu tinggi dan tidak berpengaruh nyata.

Untuk mengetahui nilai PDT, dibutuhkan data mengenai jumlah sel sebelum dan sesudah ditanam untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan sel untuk menjadikan jumlahnya dua kali lipat dalam kurun waktu 10 hari. Kemampuan ekstrak propolis dalam meningkatkan jumlah sel dimungkinkan berbeda tergantung pada tipe sel yang digunakan. Najafi (2007) melaporkan bahwa pemberian ekstrak propolis dengan konsentrasi 2 mg/mL dapat meningkatkan jumlah sel limpa tikus, limfosit manusia, sel ginjal tikus, dan sel hepar tikus secara berturut-turut yaitu, 65%, 55%, 35%, dan 25%. Peningkatan jumlah sel tersebut dapat mempengaruhi nilai PDT. Jika jumlah sel pada saat panen banyak, maka nilai PDT akan semakin rendah yang menunjukkan proliferasi dilakukan dalam waktu yang lebih singkat. Hal ini berarti, ekstrak propolis dalam penelitian ini kurang mampu meningkatkan jumlah sel otak tikus yang menjadikan nilai PDT sel otak dengan pemberian ekstrak propolis tidak berbeda jauh dengan kontrol.

Konsentrasi sel pada saat penanaman juga dapat mempengaruhi nilai PDT. Konsentrasi sel yang terlalu tinggi dapat menyebabkan persaingan antar sel untuk mendapatkan nutrisi semakin tinggi dan permukaan substrat untuk sel tumbuh

semakin sempit, jadi pertumbuhan dan perkembangan sel akan terbatas (ATCC, 2014). Jadi walaupun diberi perlakuan yang dapat menginduksi pertumbuhan sel, hasilnya hanya akan berbeda tipis dengan kontrol. Sedangkan jika konsentrasi sel yang ditanam rendah, maka persaingan antar sel untuk mendapatkan nutrisi semakin rendah dan permukaan substrat tersedia untuk tempat pertumbuhan sel, sehingga pertumbuhan dan perkembangan sel akan optimal.

Menurut Freshney (2005), konsentrasi sel yang seharusnya ditanam pada multiwell 24 dengan luas permukaan 2 cm^2 berkisar 2×10^3 sel/mL sampai 2×10^5 sel/mL, sehingga jika yang digunakan adalah TC dish 35 mm dengan luas permukaan 9 cm^2 , maka konsentrasi sel yang harus ditanam berkisar 9×10^3 sel/mL sampai 9×10^5 sel/mL. Pada penelitian ini, *culture dish* yang digunakan untuk mengkultur sel otak adalah TC dish 35 mm dan konsentrasi sel yang ditanam sebesar 28.25×10^4 sel/mL. Konsentrasi sel tersebut masih dalam kisaran 9×10^3 sel/mL sampai 9×10^5 sel/mL, sehingga persaingan sel dalam mendapatkan nutrisi dan ruang untuk tumbuh dan berkembang tidak terlalu tinggi. Dengan demikian proliferasi sel bisa meningkat dan nilai PDT semakin cepat.

Lama inkubasi juga dimungkinkan terlalu lama sehingga data yang diperoleh tidak berpengaruh nyata secara statistik. Lama inkubasi dalam penelitian ini adalah 10 hari. Hal ini bisa disebabkan karena sel telah mencapai *log phase* sebelum hari ke-10, sehingga nilai PDT tidak terlalu berbeda satu sama lain. Dalam penelitiannya, Chotimah *et al.* (2014) yang menggunakan neuron dari fetus tikus menyebutkan bahwa kultur sel neuron dalam media MEM mencapai *log phase* pada hari ke-8 dan pada hari ke-9 mulai memasuki *plateu phase* dengan menunjukkan penurunan jumlah sel.

Selain lama inkubasi, nilai IC50 dari ekstrak propolis dimungkinkan dapat mempengaruhi tingkat proliferasi yang dihasilkan dalam penelitian ini. Menurut de Mendonca (2015), nilai IC50 dari ekstrak propolis pada *cell line* normal adalah >150 µg/mL. Dengan demikian, konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini tergolong aman untuk sel otak.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak propolis tidak berpengaruh terhadap viabilitas dan nilai *Population Doubling Time* (PDT) sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*. Akan tetapi viabilitas tertinggi (90.3 ± 3.09 %) dan nilai PDT tercepat (2.88 ± 0.66 hari) dicapai oleh sel otak yang dikultur pada perlakuan P5, yaitu $80 \mu\text{g/mL}$.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka pada penelitian lebih lanjut perlu: 1) variasi lama waktu inkubasi sehingga diketahui lama inkubasi yang paling optimal untuk ekstrak propolis dalam meningkatkan viabilitas dan nilai PDT sel otak tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*, 2) optimasi jenis sel yang digunakan untuk mengetahui pengaruh ekstrak propolis yang paling efektif dalam meningkatkan viabilitas dan nilai PDT sel, dan 3) perbandingan pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap sel otak normal dan sel otak yang dipapar agen toksisitas dengan lebar interval konsentrasi yang lebih besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Baqi, Muhammad Fuad. 2011. *Al-llu'lu Wal Marjan Mutiara Hadits Sahih Bikhari dan Muslim*. Terjemahan Muhammad Suhadi, dkk. Ummul Qura, Jakarta.
- Agca, C. A., A. A. Tykhomyrov, G. Baydas, dan V. S. Nedzvetsky. 2017. Effects of a Propolis Extract on the Viability of and Levels of Cytoskeletal and Regulatory Proteins in Rat Brain Astrocytes: an *In Vitro* Study. *Neurophysiology*. Vol. 49. No. 4.
- Aksenova, V. Marina, and Michael Y. Aksenov. 2005. Cell Culture Models of Oxidative Stress and Injury in The Central Nervous System. University of South Carolina. USA. *Current Neurovascular*. Vol. 2. 73-89.
- Akyol, S., Z. Ginis, F. Armutcu, G. Ozturk, M.R. Yigitoglu, O. Akyol. 2012. The potential usage of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against chemotherapy-induced and radiotherapy-induced toxicity. *Cell Biochem. Funct.* 30: 438-443.
- Alkis, H. E., A. Kuzhan, A. Dirier, M. Tarakcioglu, E. Demir, E. Saricicek, T. Demir, A. Ahlatci1, A. Demirci1, K. Cinar, dan S. Taysi. 2015. Neuroprotective effects of propolis and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the radiation-injured brain tissue (Neuroprotective effects of propolis and CAPE). *International Journal of Radiation Research*. 13(4): 297-303.
- Annis, Fathia, Hari Purnomo, dan Farhad Balafif. 2017. Pengaruh Ekstrak Propolis terhadap Apoptosis melalui Ekspresi *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) pada Sel Otak Tikus Model Cedera Otak Traumatik. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. 29. No. 3.
- Aslanturk, Ozlem Sultan. 2017. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *IntechOpen*. DOI: 10.5772/intechopen.71923.
- As-Sa'dy, Abdurrahman Bin Nasir. 2008. *Tafsir Al Kariim Ar Rahman Fi Tafsir Kalam Al Mannan*. Darul Haq, Jakarta.
- ATCC. 2014. *Animal Cell Culture Guide*. Manassas: Physical Science-Oncology Center Network Bioresource Core Facility.
- Ath-Thabari, Abu Ja'far Muhammad bin Jarir. 2008. *Tafsir Ath-Thabari*. Pustaka Azzam, Jakarta.
- Bank, H. L. dan M. K. Schmehl. 1989. Parameters for Evaluation of Viability Assays: Accuracy, Precision, Specificity, Sensitivity, and Standardization. *Cryobiology*. 26 (3): 203-211.
- Bateman, J.M. dan McNeill H. 2006. Insulin/IGF Signalling in Neurogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 63 (15).

- Baum, M. 2006. Neuronal Cell Cultures Kept on the Straight and Narrow. (Online). http://www.nist.gov/mml/cell_052506.cfm. Diakses 1 Mei 2018.
- Baumforth, Karl dan John Crocker. 2003. Molecular and Immunological Aspects of Cell Proliferation. *Molecular Biology in Cellular Pathology Wiley*. Chapter 6. DOI: 10.1002/0470867949.
- Berre-Scoul, Catherine Le, Julien Chevalier, Elena Oleynikova, Francois Coissais, Sophie Talon, Michel Naeunlist, dan Helene Boudin. 2017. A Novel Enteric Neuron-glia Coculture System Reveals the Role of Glia in Neuronal Development. *J Physiol*. 595 (2): 583-598.
- Bi, Y., Qu P.C., Wang Q.S., Zheng L., Liu H.L., Luo R., Chen X.Q., Ba Y.Y., Wu X., dan Yang H. 2015. Neuroprotective Effects of Alkaloids from *Piper longum* in a MPTP-induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Pharm Biol*. 53(10): 1516-24.
- Bolt, M. W. 2001. Effects of Vitamin E on Cytotoxicity of Amiodarone and N-desethylamiodarone in Isolated Hamster Lung Cell. *Toxicology*. Vol 166.
- Briggs, Andre P. 2009. *Handbook of Cell Proliferation*. Nova Biomedical Books, New York.
- Browne, Susan M. dan Mohamed Al-Rubeai. 2011. Defining Viability in Mammalian Cell Culture. *Biotechnology Letters*. 33 (9): 1745-1749.
- Budiono, A. 2002. *Teknik Aseptik dan Upaya Mencegah Kumanisasi Pada Kultur Jaringan*. IPB, Bogor.
- Campbell, Neil. 2002. *Biology*. The Benjamin Publishing Inc., California.
- Cardoso S.M., Ribeiro M., Ferreira I.L., dan Cristina Rego A. 2011. Northeast Portuguese Propolis Protects Against Staurosporine and H₂O₂-induced Neurotoxicity in Primary Cortical Neurons. *Food Chem Toxicol*. 49(11): 2862-2868.
- Carneiro. 2005. *Basic Histology*. McGraw-Hill, New York.
- Carreira, Bruno P., Maria Ines Morte, Caetana M. Carvalho, dan Ines M. Araujo. 2012. Assessing the Influence of Neuroinflammation on Neurogenesis: In Vitro Models Using Neural Stem Cells and Microglia as Valuable Research Tools. *Neural Stem Cells and Therapy*. DOI: 10.5772/30723.
- Cattaneo E. dan McKay R. 1990. Proliferation and Differentiation of Neuronal Stem Cells Regulated by Nerve Growth Factor. *Nature*. 347(6295): 762-5.
- Ceriana, Ria, Ita Djuwita, dan Tutik Wreediyati, 2014. Ekstrak Batang Sipatah-Patah Meningkatkan Proliferasi dan Diferensiasi Sel Punca Mesenkimal Sumsum Tulang. *Jurnal Veteriner*. 15 (4).

- Chambard, Jean-Claude, Renaud Lefloch, Jacques Pouysségur, dan Philippe Lenorman. 2007. Review: ERK Implication in Cell Cycle Regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Vol. 1773. Issue 8.
- Chotimah, Choirunil, Masruroh Rahayu, Gatot Ciptadi, dan Fatchiyah. 2014. Optimization of Neuron Cells Maturation and Differentiation. *Jurnal Biotropika*. 2 (4).
- Dahlan, M. Sopiudin. 2016. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan: Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat Dilengkapi dengan Menggunakan SPSS*. Edisi Ketiga. Salemba Medika, Jakarta.
- Dajas, F., F. Rivera-Megret, F. Blasina, F. Arredondo, J.A. Abin-Carriquiry, G. Costa, C. Echeverry, L. Lafon, H. Heizen, M. Ferreira, dan A. Morquio. 2003. Neuroprotection by flavonoids. *Braz J Med Biol Res*. 36 (12): 1613-1620.
- De Mendonca, I.C.G., Isabel C.C. de Moraes P., Ticiano G.D.N., Naiana S.D.S., Jose M.D.S.O., Rodolfo E.D.S.A., Kristiana C.M., Aldenir F.D.S., Irinaldo D.B.J., Abhishek P., dan Francisco S.B. 2015. Brazilian Red Propolis: Phytochemical Screening, Antioxidant Activity and Effect Against Cancer Cell. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15:357.
- Dharmayanti, N.L.P. dan Nindi. 2003. Kajian Biologi Molekuler: Gen Supressor Tumor (p53) Sebagai Target Gen Dalam Pengobatan Kanker. *WARTAZOA*. Vol. 13 No. 3.
- Djati, M. S. 2006. *Teknologi Manipulasi dan Kultur Sel Jaringan Hewan*. UB Press, Malang.
- Djuwita, Ita. 2002. *Biologi Kultur Jaringan Modul Pelatihan Dosen Universitas*. IPB, Bogor.
- Djuwita, Ita, Irma Amalia Pratiwi, Adi Winarto, dan Mustafa Sabri. 2012. Proliferasi dan Diferensiasi Sel Tulang Tikus dalam Media Kultur *In Vitro* yang mengandung Ekstrak Batang *Cissus quadrangula* Salisb. (Sipatah-patah). *Jurnal Kedokteran Hewan*. Vol. 6. No. 2.
- Djuwita, Ita, Vivit Riyacumala, Kusdiantoro M., Wahono Esthi P., dan Nurhidayat. 2012. Pertumbuhan dan Sekresi Protein Hasil Kultur Primer Sel-Sel Serebrum Anak tikus. *Jurnal Veteriner*. Vol 13 No 2. Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A., dan Gage F.H. 1998. Neurogenesis in the Adult Human Hippocampus. *Nature Medicine*. Vol 4 No 11.
- Emsley, Jason G., Bartley D. Mitchell, Gerd Kempermann, dan Jeffrey D. Macklis. 2005. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural

- progenitor, precursors, and stem cells. *Progress in Neurobiology*. 75:321-341.
- Eroschenko, V. P. 2008. *Atlas Histologi diFiore's dengan Korelasi Fungsional*, EGC, Jakarta.
- Fakhrullin, Rawil F., Insung S Choi, dan Yuri Lvov. 2014. *Cell Surface Engineering: Fabrication of Functional Nanoshells*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Farooqui, Akhlaq A. 2017. *Neuroprotective Effects of Phytochemicals in Neurological Disorders*. John Willey and Sons Inc., New Jersey.
- Fokt, H., A. Pereira, A. M. Ferreira, A. Cunha, dan C. Aguiar. 2010. How do Bees Prevent Hive Infections? The Antimicrobial Properties of Propolis. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microbial. Biotechnol.* 1: 481-493.
- Frade, J.M. dan Ovejero-Benito M.C. 2015. Neuronal Cell Cycle: The Neuron Itself and Its Circumstances. *Cell Cycle*. 14(5): 712-20.
- Freshney, R. I. 2005. *Introduction to Basic Principles Animal Cell Culture A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- Gibco. 2011. *Cell Culture Basics*. 56 p. www.invitrogen.com.
- Hanafiah, K. A. 2010. *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya, Palembang.
- Harvey, Roberta. 2014. *Bench Tips: Primary Neuronal Cell Culture Tips & Tricks*. <https://www.biocompare.com/Bench-Tips/168348-Improve-the-Viability-of-Your-Primary-Neuronal-Cell-Culture-with-These-Tips-Tricks/>. Diakses pada 11 November 2018 pukul 23.55.
- Hastuti, Riani Dwi, Diding Prasetyo, dan Sri Hartati Hadinoto. 2013. Perbedaan Kadar Caffeic Acid Phenethyl Ester pada Propolis Ekstrak Etanol dan Propolis Ekstrak Air. *Biofarmasi*. Vol. 11. No. 2.
- Herawati, Ita, Usep A. H., dan Sunarjati S. 2015. Pengaruh Ekstrak Etanol Propolis Terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis pada Kultur Makrofag yang Diinfeksi Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC). *MKB*. Vol. 47. No. 2.
- Horner, Robert, Edward G.C, James H, Gail M, Samuel, Mark. 2005. The Use of Single-Subject Research to Identify Evidence-Based Practice in Special Education. *Council for Exceptional Children*. Vol. 71. No.2: 165-179.
- Ibnu Katsir Ad-dimasyqy. 1994. *Abi Fada' Al-Hafidz Tafsir Ibnu Katsir*. Darul Kutub Ilmiah, Bairut.

- Ibrahim, Nurhadi, Julia Rahadian, Dewi F. Suniarti. 2012. *Acalypha indica* Linn Root Extract Improved Hippocampal Cell Viability and Increased Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Hypoxic Condition. *Med J Indones.* 21 (3).
- Istindiah, H. N. dan E. I. Auerkari. 2001. Mekanisme Kontrol Siklus Sel (Suatu Tinjauan Khusus Peran Protein Regulator pada Jalur Retinoblastoma (RB)). *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.* 8(1): 39-47.
- Jones, Steven M. dan Andrius Kazlauskas. 2001. Growth Factor-Dependent Signaling and Cell Cycle Progression. *Chem Rev.* Vol. 101. No. 8.
- Jose MS, Vassya B. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. *J Ethnopharmacol.* 133(2):253–60.
- Juananda, Desby, Dwi Cahyani Ratnasari, Djoko Prakosa, Nur Arfian, dan Mansyur Romi. 2015. Pengaruh Stres Kronik terhadap Otak: Kajian Biomolekuler Hormon Glukokortikoid dan Regulasi Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Pascastres di Cerebellum. *Jurnal Ilmu Kedokteran.* Vol. 9. No. 2.
- Juwita, Hengki. 2005. *Pengaruh tripsin EDTA 0,25% Terhadap Viabilitas dan Konfluenitas Sel Granulosa Kambing Pada Kultur Primer dan Subkultur Pertama.* Tugas Akhir Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Biologi Universitas Brawijaya.
- Kaal, J. 1991. *Natural Medicine from Honey Bees (Apitherapy).* Kaal's Printing House, Amsterdam.
- Kahle, W. dan M. Frotscher. 2003. *Color Atlas of Human Anatomy Vol 3.* Thieme, New York.
- Kaiin, Ekayanti M., dan Ita Djuwita. 2016. Potensi Transdiferensiasi Sel Fibroblas Menjadi Sel Saraf secara *In Vitro.* *Jurnal Kedokteran Hewan.* 10 (1).
- Kalanjati, Woro Wulandari. 2006. *Perbedaan Konfluenitas dan Viabilitas Sel Kultur Primer Sel Fibroblas dari Jaringan Daun Telinga Rusa Bawean (Axis kuhlii) pada Medium TCM 199 dan MEM.* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Skirpsi.
- Kanhere, R., Anjana A., Anbu J., dan Sumithra M. 2013. Neuroprotective and Antioxidant Potential of Terpenoid Fraction from *Hygrophila auriculata* Against Transient Global Cerebral Ischemia in Rats. *Pharm Biol.* 51(2): 181-9.
- Kasai, Masaki, Hidefumi Fukumitsu, Hitomi Soumiya, dan Shoei Furukawa. 2011. Ethanol Extract of Chinese Propolis Facilitates Functional Recovery

- of Locomotor Activity after Spinal Cord Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Vol. 2011. Article ID 749627.
- Kubiliene, Loreta, Virginija Laugaliene, Alvydas Pavilionis, Audrius Maruska, Daiva Majiene, Karolina Barcauskaite, Raimondas Kubilius, Giedre Kasparaviciene, dan Arunas Savickas. 2015. Alternative Preparation of Propolis Extracts: Comparison of Their Composition and Biological Activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15 (156). DOI 10.1186/s12906-015-0677-5
- Kudugunti, Shashi K., Nikhil M. Vad, Amanda J. Whiteside, Bhakti U. Naik, Mohd. A. Yusuf, Kalkunte S. Srivenugopal, dan Majid Y. Moridani. 2010. Biochemical Mechanism of Caffeic Acid Phenylethyl Ester (CAPE) Selective Toxicity Towards Melanoma Cell Lines. *Chem Biol Interact*. 188 (1): 1–14.
- Kujawski, Radoslaw, Małgorzata Kujawska, Marcin Ożarowski, Justyna Baraniak, Halina Laskowska, Tamara Nowocień, Magdalena Borowska, Michał Szulc, Agnieszka Sobczak, dan Przemysław Mikołajczak. Perspectives for Gallotannins Neuroprotective Potential – Current Experimental Evidences. *Journal of Medical Science*. 85 (4).
- Kurauchi Y., Hisatsune A., Isohama Y., Mishima S., dan Katsuki H. 2012. Caffeic Acid Phenethyl Ester Protects Nigral Dopaminergic Neurons via Dual Mechanisms Involving Haem Oxygenase-1 and Brain-derived Neurotrophic Factor. *Br J Pharmacol*. 166: 1151–1168.
- Lawal, Bashir, O.K. Shittu, A.N. Abubakar, G.M. Haruna, S. Saidu dan P.C. Ossai. 2015. Haematopoetic effect of methanol extract of Nigerian honey bee (*Apis mellifera*) propolis in mice. *Journal of Coastal Life Medicine*. 3(8): 648-651.
- Leonard, C. T. 1998. *The Neuroscience of Human Movement*. Mosby, St. Louis.
- Levitan, Irwin B. dan Leonard K. Kaczmarek. 2015. *The Neuron: Cell and Molecular Biology*. Oxford University Press, New York.
- Al-Mahally, Imam Jalaluddin dan Imam Jalaluddin As-suyutti, 1990. *Tafsir Jalalain Berikut Asbab An-nujulnya*, Jilid I. Sinar Baru, Bandung.
- Malole, M. B. 1990. *Kultur Sel dan Jaringan Hewan*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Matsuda, Susumu, Hiroshi Saito dan Nobuyoshi Nishiyama. 1990. Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on Neurons Cultured from Various Regions of Postnatal Rat Brain. *Brain Research*. Vol. 520. Issues 1–2.

- Matsuda, Susumu, Hiroshi Saito, dan Nobuyoshi Nishiyama. 1990. Basic Fibroblast Growth Factor Ameliorates Rotational Behavior of Substantia Nigral-Transplanted Rats with Lesions of the Dopaminergic Nigrostriatal Neurons *The Japanese Journal of Pharmacology*. Vol. 59. Issue 3: 365-370.
- McCarthy, Ken D. dan Jean De Vellis. 1980. Preparation of Separate Astroglial and Oligodendroglial Cell Cultures from Rat Cerebral Tissue. *J. Cell Biology*. Vol. 85.
- Meberg, P.J. dan Miller M.W. 2003. Culturing hippocampal and cortical neurons. *Methods Cell Biol.* 71:111-27.
- Moosavi, Fatemah, Raziéh Hosseini, Luciano Saso, dan Omidreza Firuzi. 2015. Modulation of Neurotrophic Signaling Pathways by Polyphenols. *Drug Design, Development and Therapy*. 10:23—42.
- Morgan, David O. 2007. *The Cell Cycle: Principles of Control*. New Science Press, London.
- Mouse, Hassan Ait, Mounir Tilaoui, Abdeslam Jaafari, Lahcen Ait M'barek, Rachida Aboufatima, Abderrahmane Chait, dan Abdelmajid Zyad. 2011. Evaluation of the In Vitro and In Vivo Anticancer Properties of Moroccan Propolis Extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22 (3): 558-567.
- Mu, Lingli, Jumping Kou, Danni Zhu, dan Boyang Yu. 2007. Comparison of Neuroprotective Effects of Flavonoids, Terpenoids, and Their Combinations from *Ginkgo biloba* on Ischemia-Reperfusion-Injured Mice. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 45. No. 9.
- Murtaza, Ghulam, Sabiha Karim, Muhammad Rouf Akram, Shujaat Ali Khan, Saira Azhar, Amara Mumtaz, dan Muhammad Hassham Hassan Bin Asad. 2014. Caffeic Acid Phenethyl Ester and Therapeutic Potentials. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*. Vol. 2014. Article ID 145342.
- Murti, Harry, Arief Boediono, Boenjamin Setiawan, dan Ferry Sandra. 2007. Regulasi Siklus Sel: Kunci Sukses Somatic Cell Nuclear Transfer. *Faculty of Veterinary*. Vol. 34. No. 06.
- Murtisari, Ani. 2011. *Efek Pemberian Ekstrak Daun Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa) Terhadap Pertumbuhan Sel-sel Otak Besar Anak Tikus Secara In Vitro*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Skripsi.
- Najafi, Mohsen Fathi, Fatemeh Vahedy, Mohammad Seyyedini, Hamid Reza Jomehzadeh, dan Kazem Bozary. 2007. Effect of the Water Extract of

- Propolis on Stimulation and Inhibition of Different Cell. *Cytotechnology*. 54: 49-56.
- Ni, Junjun, Zhou Wu, Jie Meng, Aiqin Zhu, Xin Zhong, Shizheng Wu, dan Hiroshi Nakanishi. The Neuroprotective Effects of Brazilian Green Propolis on Neurodegenerative Damage in Human Neuronal SH-SY5Y Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Vol. 2017. Article ID 7984327.
- Nijveldt, Robert J., Els van Nood, Danny EC van Hoorn, Petra G Boelens, Klaske van Norren, dan Paul AM van Leeuwen. 2001. Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. *Am J Clin Nutr*. 74 :418–25.
- Oktiyani, Neni, Fahriyan, dan Ahmad Muhlisin. 2017. Akurasi Hitung Jumlah Eritrosit Metode Manual dan Metode Otomatis. *Medical Laboratory Technology Journal*. 3 (2): 37-41.
- Orban, Z., N. Mitsiades, T.R. Burke Jr, M. Tsokos, G.P. Chrousos. 2000. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation*. 7: 99-105.
- Ozturk, G., Z. Ginis, S. Akyol, G. Erden, A. Gurel, O. Akyol, 2012. The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 16: 2064-2068.
- Pasupuleti, Visweswara Rao, Lakshmi Sammugam, Nagesvari Ramesh, dan Siew Hua Gan. 2017. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2017. Article ID 1259510.
- Paul J. 1972. *Cell and Tissue Culture*^{4th} Ed. E. & S. Livingstone Ltd, London.
- Pietta, P. G., Gardana, C., & Pietta, A. M. 2002. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*. 73: S7-S20.
- Pollard J.W. dan Walker J.M. 1990. *Animal Cell Culture*. USA: The Humana Press Inc.
- Potter, S.M. dan DeMarse T.B. 2001. A New Approach to Neural Cell Culture for Longterm Studies. *Journal of Neuroscience Methods*. 110:17–24.
- Pramesti, Fathia Annis, Hari Purnomo, dan Farhad Balafif. Pengaruh Ekstrak Propolis terhadap Apoptosis melalui Ekspresi Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) pada Sel Otak Tikus Model Cedera Otak Traumatik. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. 29. No. 3.

- Prihastanti, E. 1999. Isolasi Sel Mesofil Daun Pegagan (*Centella asiatica* (l) *urban*). *Sellula. MIPA UNDIP Semarang*. (VII) 7.
- Puspitasari, Anita Dwi dan Lean Syam Proyogo. 2017. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*. ISSN 2528-5912.
- Puspitasari, Riris L., Arief Boediono, dan Ferry Sandra. 2013. Conditioned Medium dari Kultur Primer Sel Saraf Mus musculus. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. Vol. 10. No. 2.
- Al-Qurthubi, Syaikh Imam. 2008. *Tafsir Al Qurthubi*. Pustaka Azzam, Jakarta.
- Ramachandra, Renuka, dan Thyagrajan Subramanian. 2011. *Atlas of the Neonatal Rat Brain*. CRC Press, Florida.
- Reynolds, B. A., dan Weiss, S. 1992. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science*. Vol. 255.
- Riyacumala, Vivit. 2010. *Kultur In Vitro Sel-sel Otak Besar (cerebrum) Anak Tikus*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Skripsi.
- Safari, Manouchehr, Hamid Reza Sameni, Leila Badban, Ahmad Raze Bandegi, Abbas Ali Vafaei, Ali Rashidy Pour dan Laya Ghahari. 2015. Protective Effects of Water Ekstract of Propolis on Dopaminergic Neurons, Brain Derived Neurotrophic Factor and Stress Oxidative Factor in the Rat Model of Parkinson's Disease. *International Journal of Pharmacology*. 11(4): 300-308. ISSN 1811-7775.
- Sforcin, Jose M. 2016. Review: Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy Research*. Vol. 30. Issue 6.
- Shimazawa, Masamitsu, Satomi Chikamatsu, Nobutaka Morimoto, Satoshi Mishima, Hiroichi Nagai dan Hideaki Hara. 2005. Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against In vitro and In vivo Ischemic Neuronal Damage. 2(2):201–207.
- Siregar, Hotnida C. H., Asnath M. Fuah, dan Yuke Octavianty. 2011. *Propolis; Madu Multikhasiat*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Slone, Ethel. 2003. *Anatomy nd Physiology: An Easy Leaner*. EGC, Jakarta.
- Soewolo, Soedjono Basoeki dan Titi Yudani. 2005. *Fisiologi Manusia*. UM Press, Malang.
- Sumitro, Sutiman B., Sri Widyanti, dan Sofy Permana. 2017. *Biologi Sel*. UB Press, Malang.

- Sun, Yujuan, Yanfei Lin, Xueli Cao, Lan Xiang, dan Jianhua Qi. 2014. Sterols from Mytilidae Show Anti-Aging and Neuroprotective Effects via Anti-Oxidative Activity. *Int J Mol Sci.* 15(12): 21660–21673.
- Suranto, A. 2007. *Terapi Madu*. Penebar Plus, Jakarta.
- Susilo, Bambang, Ni Made Mertaniasih, Eko Budi Koendhori, Mangestuti Agil. 2009. Komposisi Kimiawi dan Aktifitas Antimikroba, Propolis dari Malang Jawa Timur. *J. Penelit. Med. Eksakta.* Vol. 8. No. 1.
- Swanson, Larry W. 2004. *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*. Elsevier Inc., San Diego.
- Syaifuddin. 2009. *Anatomi Tubuh Manusia untuk Mahasiswa Keperawatan*. Salemba Medika, Jakarta.
- Taddeo, V.A., Epifano F., Fiorito S., dan Genovese S. 2016. Comparison of Different Extraction Methods and HPLC Quantification of Prenylated and Unprenylated Phenylpropanoids in Raw Italian Propolis. *J Pharm Biomed Anal.* 10(129): 219-223.
- Takeuchi, Takashi. 2014. Cell Proliferation and Development. *Development, Growth & Differentiation.* Vol. 56. No. 5.
- Tiveron, A.P., Rosalen P.L., Franchin M., Lacerda R.C., Bueno-Silva B., Benso B., Denny C., Ikegaki M., dan Alencar S.M. 2016. Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Activities of South Brazilian Organic Propolis. *PLoS One.* 11(11): e0165588.
- Trenggono, Bambang S. 2009. *Metode Dasar Kultur Jaringan Hewan*. Universitas Trisakti, Jakarta.
- Tyastuti, Erma Musbita, Sutarno, dan Kusmardi. 2006. Efek Imunostimulator Propolis Terhadap Proliferasi Sel Limfosit T dan Viabilitas Sel Tumor *Mammæ* Mencit secara *In Vitro*. *Bioteknologi.* 3(10): 1-7.
- Vauzour, David. 2012. Review Article: Dietary Polyphenols as Modulators of Brain Functions: Biological Actions and Molecular Mechanisms Underpinning Their Beneficial Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Vol. 2012. Article ID 914273.
- Villee, Claude A. 1999. *Zoologi Umum*. Erlangga, Jakarta.
- Wagh, Vijay D. 2013. Review Article Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences.* Vol. 2013. Article ID 308249.
- Wiart, Christophe. 2014. *Lead Compounds from Medicinal Plants for the Treatment of Cancer*. Academic Press, Cambridge.

- Widayati, Eni. 2012. Oxidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant. *Jurnal Unissula*. 50 (128).
- Willie, F.R.S. dan Andrew H. 2005. *Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation 3rd Edition*. University Medical School Edinburgh, Scotland.
- Wulandari, W. 2003. *Perbedaan konfluenitas dan viabilitas Sel Kultur Sel Primer Fibroblas dari Jaringan Daun Tlinga Rusa Bawean (Axis kuhlii) pada Medium TCM 199 dan MEM*. Surabaya: UNAIR.
- Yao, Tatsuma dan Yuta Asayama. 2017. Animal-cell Culture Media: History, Characteristics, and Current Issues. *Reprod Med Biol*. 16(2): 99–117.
- Zabaiou, N. Fouache A., Trousson A., Baron S., Zellagui A., Lahouel M., Lobaccaro J.A. 2017. Biological Properties of Propolis Extracts: Something New from an Ancient Product. *Chem Phys Lipids*. 207(Pt B): 214-222.



Lampiran 1. Perhitungan Volume Ekstrak Propolis yang harus Ditambahkan pada Media Kultur

1. $1000 \mu\text{g/mL} \rightarrow 20 \mu\text{g/mL}$

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1. 1000 = 3000.20$$

$$1000V1 = 60000$$

$$V1 = 60 \mu\text{L}$$

2. $1000 \mu\text{g/mL} \rightarrow 40 \mu\text{g/mL}$

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1. 1000 = 3000.40$$

$$1000V1 = 120000$$

$$V1 = 120 \mu\text{L}$$

3. $1000 \mu\text{g/mL} \rightarrow 60 \mu\text{g/mL}$

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1. 1000 = 3000.60$$

$$1000V1 = 180000$$

$$V1 = 180 \mu\text{L}$$

4. $1000 \mu\text{g/mL} \rightarrow 80 \mu\text{g/mL}$

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1. 1000 = 3000.80$$

$$1000V1 = 240000$$

$$V1 = 240 \mu\text{L}$$

5. $1000 \mu\text{g/mL} \rightarrow 100 \mu\text{g/mL}$

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1. 1000 = 3000.100$$

$$1000V1 = 300000$$

$$V1 = 300 \mu\text{L}$$

Keterangan :

- Volume total media adalah $3000 \mu\text{L}$
- V1 adalah volume ekstrak propolis yang ditambahkan ke dalam media kultur

Lampiran 2. Analisis Data Viabilitas Sel Otak Tikus (*Rattus norvegicus*)

2.1. Data Hasil Penelitian

Perlakuan	Viabilitas Sel (%) pada ulangan ke-				Jumlah	Rata-rata (%)
	1	2	3	4		
P1 (0 µg/mL)	89	90	81	85	345	86.3
P2 (20 µg/mL)	88	86	90	88	352	88.0
P3 (40 µg/mL)	90	90	90	88	358	89.5
P4 (60 µg/mL)	92	89	90	88	359	89.8
P5 (80 µg/mL)	86	92	90	93	361	90.3
P6 (100 µg/mL)	89	86	90	85	350	87.5
Total					2125	531.25

2.2. Hasil Uji Statistik Manual

$$\begin{aligned} \text{a) Faktor Koreksi (FK)} &= (\text{Jumlah total data})^2 / \text{jumlah ulangan (r)} \times \text{jumlah perlakuan (t)} \\ &= (2132)^2 / 4 \times 6 \\ &= 188151 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b) Jumlah Kuadrat Total (JKT)} &= (89^2 + 90^2 + \dots + 85^2) - \text{FK} \\ &= 188315 - 188151 \\ &= 164 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c) Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)} &= (345^2 + 352^2 + \dots + 350^2) / r - \text{FK} \\ &= 752795 / 4 - 188151 \\ &= 47.75 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{d) Jumlah Kuadrat Galat (JKG)} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 164 - 47.75 \\ &= 116.25 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{e) Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP)} &= \text{JKP} / t - 1 \\ &= 47.75 / 6 - 1 \\ &= 9.55 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{f) Kuadrat Tengah Galat (KTG)} &= \text{JKG} / t (r-1) \\ &= 116.25 / 6 (4-1) \\ &= 6.45833 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{g) } F_{\text{hitung}} &= \text{KTP} / \text{KTG} \\ &= 9.55 / 6.45833 \\ &= 1.4787 \end{aligned}$$

h) Tabel ANSIRA ANOVA *one way*

SK	db	JK	KT	Fhitung	Ftabel
Perlakuan	5	47.75	9.55	1.4787098	2.639999425
Galat	18	116.25	6.45833		
Total	23	164			

2.3. Hasil Uji Statistik dengan SPSS

a) Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Viabilitas
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	88.54
	Std. Deviation	2.670
Most Extreme Differences	Absolute	.170
	Positive	.167
	Negative	-.170
Kolmogorov-Smirnov Z		.831
Asymp. Sig. (2-tailed)		.495
a. Test distribution is Normal.		

b) Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.495	5	18	.070

c) Uji ANOVA

ANOVA					
Viabilitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	47.708	5	9.542	1.477	.246
Within Groups	116.250	18	6.458		
Total	163.958	23			



Lampiran 3. Analisis Data Nilai *Population Doubling Time* (PDT) Sel Otak Tikus (*Rattus norvegicus*)

2.4.Data Hasil Penelitian

Perlakuan	Nilai PDT (hari) pada ulangan ke-				Jumlah	Rata-rata (hari)
	1	2	3	4		
P1 (0 µg/mL)	4.851382	4.285802	5.874075	5.127733	20.13899	5.034748
P2 (20 µg/mL)	4.093585	6.984916	2.484754	4.626287	18.18954	4.547386
P3 (40 µg/mL)	2.762715	3.030817	3.067411	5.915083	14.77603	3.694007
P4 (60 µg/mL)	2.448826	2.708271	5.171735	3.331727	13.66056	3.415140
P5 (80 µg/mL)	2.396262	2.234208	3.394092	3.501543	11.52611	2.881526
P6 (100 µg/mL)	2.626762	5.874075	4.253718	5.833957	18.58851	4.647128
Total					96.87974	24.21993

2.5.Hasil Uji Statistik Manual

$$\begin{aligned} \text{i) Faktor Koreksi (FK)} &= (\text{Jumlah total data})^2 / \text{jumlah ulangan (r)} \times \text{jumlah perlakuan (t)} \\ &= (96.87974)^2 / 4 \times 6 \\ &= 391.0701 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{j) Jumlah Kuadrat Total (JKT)} &= (4.851382^2 + 4.285802^2 + \dots + 5.833957^2) - \text{FK} \\ &= 436.268 - 391.0701 \\ &= 45.1979 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{k) Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)} &= (20.13899^2 + 18.18954^2 + \dots + 18.58851^2) / r - \text{FK} \\ &= 1619.764 / 4 - 391.0701 \\ &= 13.87089 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{l) Jumlah Kuadrat Galat (JKG)} &= \text{JKT} - \text{JKP} \\ &= 45.1979 - 13.87089 \\ &= 31.32701 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{m) Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP)} &= \text{JKP} / t - 1 \\ &= 13.87089 / 6 - 1 \\ &= 2.774178 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{n) Kuadrat Tengah Galat (KTG)} &= \text{JKG} / t (r-1) \\ &= 31.32701 / 6 (4-1) \\ &= 1.74039 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{o) } F_{\text{hitung}} &= \text{KTP} / \text{KTG} \\
 &= 2.774178 / 1.74039 \\
 &= 1.593999
 \end{aligned}$$

p) Tabel ANSIRA ANOVA *one way*

SK	db	JK	KT	Fhitung	Ftabel
Perlakuan	5	13.87089	2.774178	1.593999	2.639999425
Galat	18	31.32701	1.74039		
Total	23	45.1979			

2.6. Hasil Uji Statistik dengan SPSS

d) Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		PDT
N		24
Normal Parameters ^a	Mean	4.0366556
	Std. Deviation	1.4018297
Most Extreme Differences	Absolute	.149
	Positive	.149
	Negative	-.108
Kolmogorov-Smirnov Z		.728
Asymp. Sig. (2-tailed)		.664
a. Test distribution is Normal.		

e) Uji Homogenitas

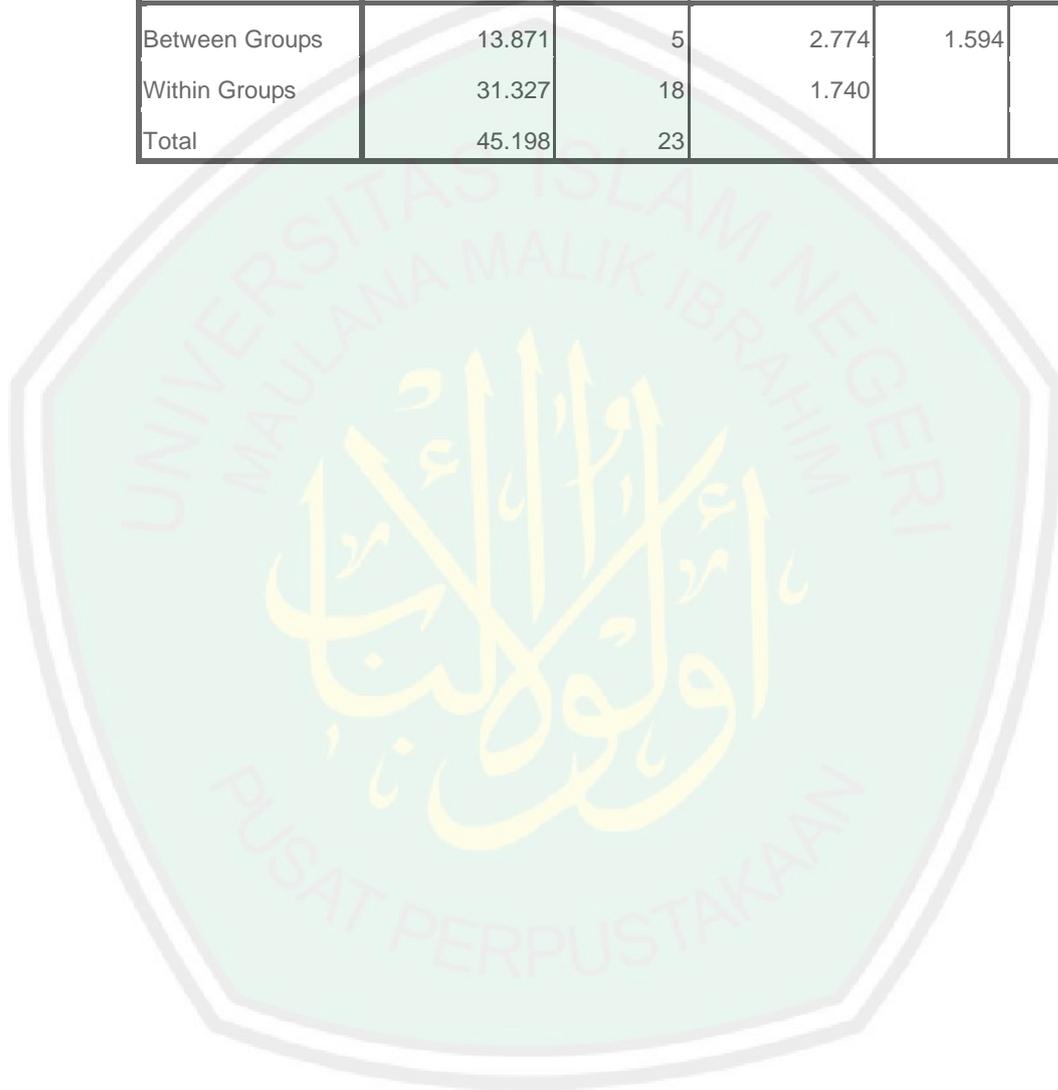
Test of Homogeneity of Variances

PDT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.905	5	18	.499

f) Uji ANOVA

ANOVA					
PDT					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.871	5	2.774	1.594	.212
Within Groups	31.327	18	1.740		
Total	45.198	23			



Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

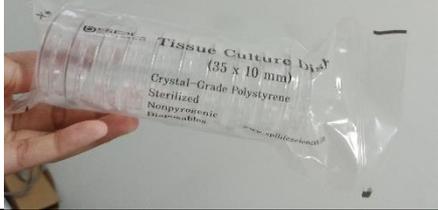
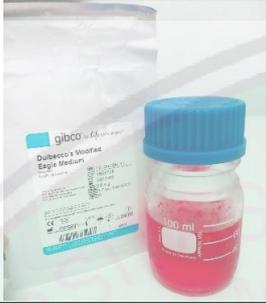
1. Pembuatan Stok Ekstrak Propolis

	
DMSO yang diampul @ 1 mL	DMSO setelah diencerkan dengan <i>DI water</i>
	
Ekstrak propolis mentah	Ekstrak Propolis yang sudah diencerkan dengan stok DMSO

2. Isolasi organ otak tikus (*Rattus norvegicus*)

	
Tikus yang sudah didislokasi	Kulit kepala tikus dibuka
	
Kranium tikus dibuka	Organ otak yang sudah diisolasi

3. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian

	
TC dish 35mm	Hemositometer
	
Media DMEM	Fetal Bovine Serum (FBS)
	
Tripan Blue	Tripsin EDTA
	
Deionized water	NAHCO3
	
Penicilin dan Streptomycin	