

**PENGARUH EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP PERTUMBUHAN SEL
HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :
Khalimatus Sa'diyah
NIM. 14620025



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP PERTUMBUHAN SEL
HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN VITRO***

**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:
Khalimatus Sa'diyah
NIM. 14620025**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP PERTUMBUHAN SEL
HEPAR TIKUS (*Rattus novergicus*) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :

Khalimatus Sa'diyah

NIM. 14620025

Telah disetujui oleh :

Dosen Pembimbing I

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

Dosen Pembimbing II

Mujahidin Ahmad, M. Sc
NIP. 19860512 201903 1 002



Mengesahkan
Program Studi Biologi

Dr. Anita Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

**PENGARUH EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP PERTUMBUHAN SEL
HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:
KHALIMATUS SA'DIYAH
NIM 14620025

Telah dipertahankan
Di depan dewan penguji skripsi dan dinyatakan diterima sebagai salah satu
persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S. Si)
Tanggal, 15 Desember 2020

Penguji Utama	<u>Prof.Dr.drh.Hj. Bayyinatul M., M.Si</u> NIP. 19741018200312 2 002	
Ketua Penguji	<u>Dr. Retno Susilowati, M.Si</u> NIP. 19671113199402 2 001	
Sekretaris Penguji	<u>Kholifah Holil, M.Si</u> NIP. 19751106 200912 2 002	
Anggota Penguji	<u>Mujahidin Ahmad, M.Sc</u> NIP. 19860512 201903 1 002	

Mengesahkan
Ketua Program Studi Biologi

Dr. Kholifah Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, Alhamdulillah, Alhamdulillah rabbi 'aalamiin. Hanya kalimat-kalimat syukur dan terimakasih yang mampu saya ucapkan atas kebahagiaan ini kepada Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang. Tanpa kasih sayangNya, saya tidak akan berada disini menulis halaman persembahan untuk menyelesaikan tugas akhir ini. Saya ucapkan rasa syukur untuk segala ilmu dan pembelajaran hidup yang saya dapatkan dari saya lahir hingga saat ini.

Terimakasih ya Rabb telah Engkau izinkan saya untuk dapat menyelesaikan studi di Jurusan ini. Terimakasih ya Rabb telah Engkau izinkan saya mengenal guru-guru yang tidak pernah lelah mengajari, selalu membagi ilmu, dan selalu mendoakanku. Terimakasih karena telah Engkau kirimkan kepadaku sosok kakak yang kuat, saudara dan keluarga yang selalu menyayangi dan mendukungku. Terimakasih telah Engkau berikan teman-teman yang baik yang selalu membantu dan menyayangiku.

Terimakasih yaa Rabb telah Kau izinkan saya merasakan kasih sayang seorang ayah dan seorang ibu yang selalu mendoakan, merawat dan menjagaku hingga dewasa. Cinta kasihnya tidak akan ada tandingannya sepanjang masa. Karya sederhana ini, ingin kupersembahkan untuk Alm. Bapak Samad dan Almh. Ibu Dasirah. Meskipun tidak dapat melihatnya, semoga almarhum dan almarhumah bangga atas karya ini. Bagi pembaca yang sedang membaca tulisan ini, izinkan saya meminta kiriman Al-Fatihah untuk almarhum, almarhumah bapak dan ibu saya. Semoga dilapangkan kuburnya dan diterima seluruh amal ibadahnya. الفاتحة

Semoga Allah selalu merahmati dan meridhoi langkah kita.

Aamiin yaa rabbal 'aalamiin.

MOTTO

إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا

"Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan"

Q.S. Al-Insyirah (94):6

Atas segala hal yang terjadi dalam hidupmu, jangan pernah berputus asa. Segala kesulitan yang harus kau alami, yakinlah bahwa Allah akan berikan kemudahan setelahnya. Tetaplah sungguh-sungguh dalam berikhtiar dan berdoalah kepada Allah dengan sepenuh hati. Yakinlah bahwa Allah adalah sebaik-baik pemberi takdir.

PERNYATAAN KEASLIAN PENULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Khalimatus Sa'diyah

NIM : 14620025

Program Studi : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Pengaruh Ekstrak Propolis Terhadap Pertumbuhan Sel Hepar Tikus (*Rattus novergicus*) Secara *In Vitro*.

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

Malang, 15 Desember 2020

Yang membuat pernyataan



Khalimatus Sa'diyah
NIM. 14620025

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



ABSTRAK

Sa'diyah, Khalimatus. 2020. Pengaruh Ekstrak Propolis terhadap Pertumbuhan Sel Hepar Tikus (*Rattus novergicus*) secara *in Vitro*. Skripsi. Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi: Kholifah Holil, M.Si. Pembimbing agama: Mujahidin Ahmad, M.Sc.

Kata kunci: Ekstrak Propolis, Pertumbuhan Sel Hepar, *In vitro*.

Radikal bebas selain akibat dari paparan bahan-bahan kimia, pada umumnya juga dihasilkan oleh sel dari metabolisme seluler. Terbentuknya molekul radikal bebas yang terlalu tinggi akan mengganggu pertumbuhan sel. Dalam kondisi *in vitro* pertumbuhan sel dapat dilihat dari konfluenitas dan viabilitas sel. Ekstrak propolis diduga mampu melindungi sel hepar dari kerusakan karena memiliki senyawa aktif yang berpotensi sebagai hepatoprotektif, stimulator pertumbuhan sel dan antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak propolis terhadap konfluenitas dan viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan dan 4 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan pada penelitian ini adalah P1 (kontrol) dan perlakuan ekstrak propolis yaitu P2 (100 µg/ml), P3 (120 µg/ml), P4 (140 µg/ml), P5 (160 µg/ml), P6 (180 µg/ml) dan P7 (200 µg/ml). Sampel yang digunakan adalah sel hepar tikus yang berusia 3-4 hari yang dikultur pada media DMEM dengan FBS 10% dan diinkubasi dalam inkubator bersuhu 37°C dengan CO₂ 5% selama 6 hari. Ekstraksi propolis pada penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Data hasil penelitian berupa nilai konfluenitas dan viabilitas (%) sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) dianalisis menggunakan ANOVA *one way* ($\alpha=0.05$). Berdasarkan hasil analisis yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak propolis tidak berpengaruh terhadap konfluenitas sel hepar tikus ($p<0.05$) akan tetapi berpengaruh terhadap viabilitas sel hepar tikus ($p>0.05$). Nilai rata-rata tertinggi konfluenitas (12.23 ± 0.722) pada P4 (140 µg/mL) dan nilai viabilitas paling berpengaruh (50.50 ± 21.23) didapatkan pada perlakuan pemberian ekstrak propolis P2 (100 µg/ml).

ABSTRACT

Sa'diyah, Khalimatus. 2020. The Effect of Propolis Extract on Rat's Liver Cells (*Rattus novergicus*) Growth in Vitro. Thesis. The Biology Department, Faculty of Science and Technology, Islamic State University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Biology Advisor: Kholifah Holil, M.Si. Religious Advisor: Mujahidin Ahmad, M.Sc.

Keywords: Propolis Extract, Liver Cell Growth, *In vitro*.

Apart from exposure to chemicals, free radicals are generally produced by cells from cellular metabolism. The formation of free radical molecules that are too high will interfere cell growth. *In vitro* conditions, cell growth can be seen from cell's confluence and viability. Propolis extract is thought to be able to protect liver cells from damage because it has active compounds that have the potential to be stimulators of cell growth and antioxidants. This study aims to determine the effect of propolis extract on the confluence and viability of rat's liver cells (*Rattus novergicus*) *in vitro*. This study used a Completely Randomized Design (CRD) with 7 treatments and 4 tests. The treatments that used in this study were P1 (control) and propolis extract treatment, namely P2 (100 µg / ml), P3 (120 µg / ml), P4 (140 µg / ml), P5 (160 µg / ml), P6 (180 µg / ml) and P7 (200 µg / ml). The samples were rat liver cells aged 3-4 days which were cultured on DMEM media with 10% FBS and incubated in an incubator at 37 ° C with 5% CO₂ for 6 days. Propolis extraction in this study using the maceration method with 96% ethanol solvent. The result of this research is the form of the value of confluence and viability (%) of rat's liver cells (*Rattus novergicus*) were analyzed using ANOVA *one way* ($\alpha = 0.05$). Based on the results of the analysis, it concluded that the administration of propolis extract has no effect on confluence of rat's liver cell ($p > 0.05$) but affects the viability of rat's liver cells ($p < 0.05$). The highest average value of confluence (12.23 ± 0.722) was at P4 (140 µg / mL) and the most influential viability value (50.50 ± 21.23) was obtained in the treatment of propolis extract P2 (100 µg / ml).

مستخلص البحث

سعدية، حليلة. 2020. تأثير مستخلص البروبوليس على نمو خلايا كبد الجرذ (*Rattus Novergicus*) في المختبر. أطروحة. قسم الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. مشرف علم الأحياء: خليفة خليل، م. مشرف الديني: مجاهدين أحمد، ماجستير.

الكلمات الرئيسية: خلاصة العكبر، نمو خلايا الكبد، في المختبر.

بصرف النظر عن التعرض للمواد الكيميائية، يتم إنتاج الجذور الحرة بشكل عام بواسطة الخلايا من الأيض الخلوي. إن تكوين جزيئات الجذور الحرة عالية جدًا سوف يتداخل مع نمو الخلايا. في ظروف المختبر، يمكن رؤية نمو الخلايا من التقاء الخلية وقابليتها للحياة. يُعتقد أن مستخلص البروبوليس قادر على حماية خلايا الكبد من التلف لأنه يحتوي على مركبات نشطة لديها القدرة على أن تكون واقية للكبد ومحفزات لنمو الخلايا ومضادات الأكسدة. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد تأثير مستخلص البروبوليس على التقاء خلايا كبد الفئران (*Rattus novergicus*) وحيويتها في المختبر. استخدمت هذه الدراسة تصميمًا عشوائيًا بالكامل (CRD) مع 7 علاجات و4 اختبارات. كانت العلاجات المستخدمة في هذه الدراسة هي (P1 التحكم) ومعالجة خلاصة البروبوليس، وهي P2 (100 ميكروغرام / مل)، P3 (120 ميكروغرام / مل)، P4 (140 ميكروغرام / مل)، P5 (160 ميكروغرام / مل)، P6 (180 ميكروغرام / مل) و P7 (200 ميكروغرام / مل). كانت العينات عبارة عن خلايا كبد الفئران التي تتراوح أعمارها بين 3-4 أيام والتي تم تربيتها على وسط DMEM بنسبة 10٪ FBS وحضنت في حاضنة عند 37 درجة مئوية مع 5٪ من ثاني أكسيد الكربون لمدة 6 أيام. استخلص البروبوليس في هذه الدراسة باستخدام طريقة النقع بمذيب إيثانول 96٪. نتيجة هذا البحث هي شكل قيمة التقاء وقابلية البقاء (٪) من خلايا كبد الفئران (*Rattus novergicus*) التي تم تحليلها باستخدام ANOVA بطريقة واحدة ($\alpha=0,05$). بناءً على نتائج التحليل، خلص إلى أن إعطاء مستخلص البروبوليس ليس له أي تأثير على التقاء خلايا كبد الجرذان ($P < 0,05$) ولكنه يؤثر على قابلية خلايا كبد الجرذ للحياة ($P > 0,05$). أعلى متوسط قيمة للالتقاء (0.722 ± 12.23) كان عند P4 (140 ميكروغرام / مل) وتم الحصول على أكثر قيمة حيوية مؤثرة (21.23 ± 50.50) في علاج مستخلص البروبوليس P2 (100 ميكروغرام / مل).

KATA PENGANTAR

Assalaamu'alaikum warahmatullaahi wabarakaatuh

Alhamdulillahirabbil 'aalamiin, puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang dengan segala Rahman dan RahimNya penulis dapat menyelesaikan seluruh rangkaian penyusunan skripsi yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Propolis terhadap Viabilitas dan Proliferasi Sel Hepar Tikus (*Rattus novergicus*) secara *In Vitro*”. Sholawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada junjungan kita Rasulullah SAW yang telah membawa cahaya terang dalam peradaban, termasuk dalam bidang pendidikan.

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. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P., 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 kesabaran, keikhlasan dalam memberikan bimbingan, pengarahan dan motivasi selama penyusunan skripsi ini.
5. Mujahiddin Ahmad, M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Agama yang dengan kesabaran dan keikhlasan telah membimbing dan mengarahkan penyusunan skripsi ini pada kajian Al-Quran dan As-Sunnah.
6. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P., selaku Dosen Wali yang senantiasa memberikan pengarahan dan nasihat.
7. Lil Hanifah, M.Si., yang selalu memberikan perhatian, dukungan dan pengarahan kepada penulis.
8. Seluruh dosen, staff dan administrasi serta laboran Jurusan Biologi yang telah banyak membantu selama proses penyusunan skripsi ini.

9. Ayahanda tercinta Alm. Samad dan Ibunda almh. Dasirah yang dengan penuh perjuangan, kesabaran dan keikhlasan memberikan segala bentuk dukungan serta do'a kepada penulis untuk menyelesaikan studi hingga penulisan skripsi ini.
10. Alm. Mas Zainul Arifin, Mbak Mufida dan Mbak Muslikah tersayang yang senantiasa memberikan perhatian, dukungan dan do'a kepada penulis.
11. Seluruh keluarga besar yang selalu memberikan dukungan materil maupun moril kepada penulis dalam menyelesaikan proses belajar dan skripsi.
12. Fajar Ariadi, S.T, yang selalu mendampingi, memberikan dukungan dan do'a kepada penulis.
13. Siti Kolipatus Sadiyah, S.Si., Miftakhul Jannah, S.Si., Noer Istiana, S.Si., Ermaswati Lamadike, S.Si., Habibi, S.Si., dan Nuri Thobibatus Shofia Alfaruqi, S.Si, selaku rekan penelitian di *Animal Cell Culture (ACC)* yang selalu memberikan dukungan, motivasi dan do'a kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
14. Aldila Yunia Putri, M.Si., Nila Fukhro, S.Si., Choirun Nisa', S.Si., Sarah Nur Faricha, S.Pd., Nunung Nasihah, S.HI dan Isnatus Sa'adah, S.E., yang selalu memberikan dukungan, motivasi dan do'a kepada penulis.
15. Teman-teman Biologi Khususnya angkatan 2014 dan angkatan 2015 yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terimakasih telah menjadi teman dan saudara selama perkuliahan hingga berjuang bersama menyelesaikan tugas akhir untuk memperoleh gelar S.Si.
16. Seluruh 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. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi para pembaca. *Aamiin yaa rabbal 'alamiin.*

Wassalaamualaikum warahmatullaahi wabarakaatuh

Malang, 28 Desember 2020

Khalimatus Sa'diyah



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vi
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
ملخص البحث	x
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan	6
1.4 Hipotesis Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	7
1.6 Batasan Masalah	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Hepar	8
2.2 Kultur Sel Hepar secara <i>in Vitro</i>	9
2.3 Proliferasi Sel Hepar secara <i>in Vitro</i>	13
2.4 Viabilitas dan Konfluenitas Sel	16

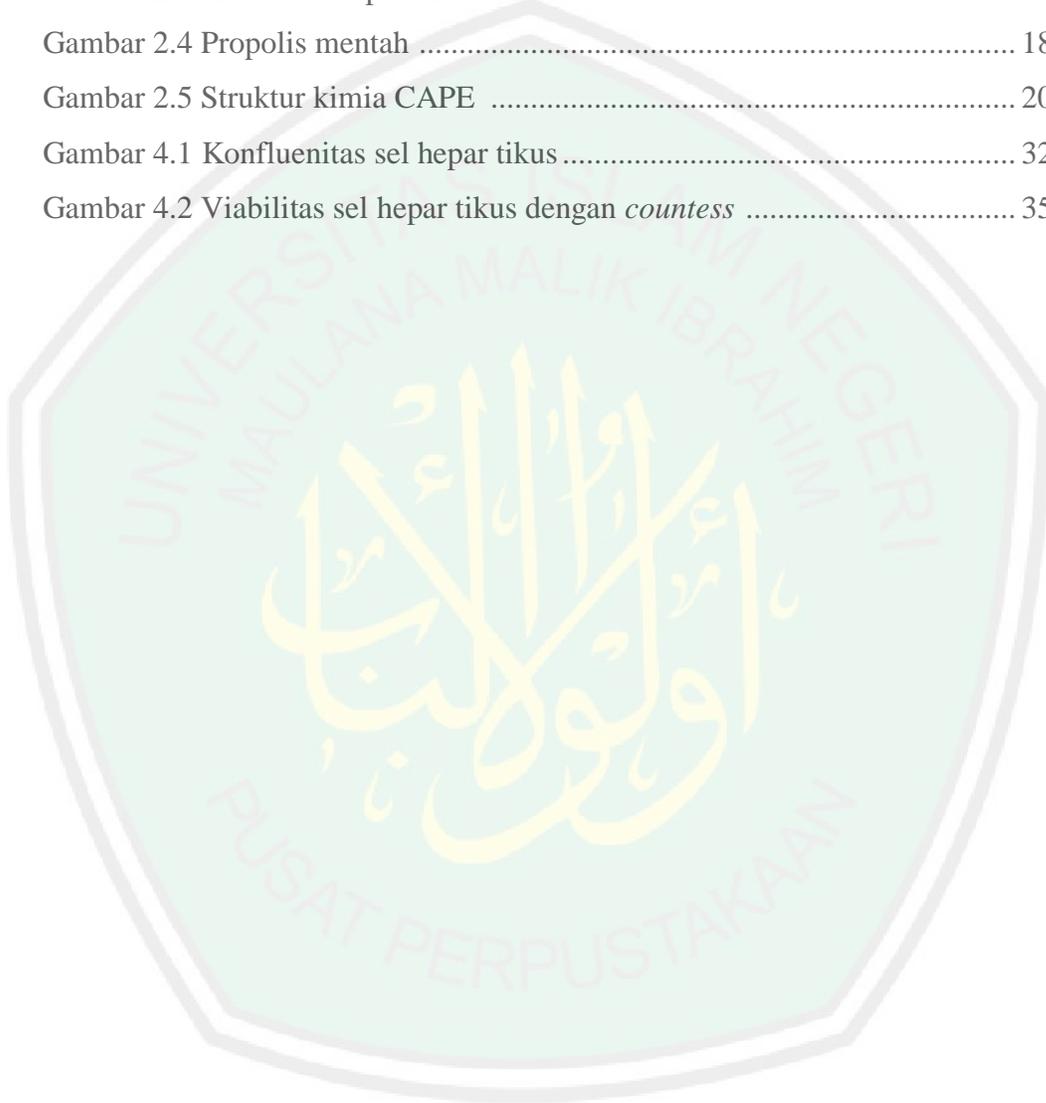
2.5 Tinjauan Umum Propolis	17
2.5.1 Kandungan Propolis	18
2.5.2 Peran Ekstrak Propolis terhadap Kultur sel Hepar	20
BAB III PROSEDUR PENELITIAN	23
3.1 Rancangan Penelitian	23
3.2 Variabel Penelitian	23
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	23
3.4 Alat dan Bahan	24
3.4.1 Alat	24
3.4.2 Bahan	24
3.5 Prosedur Penelitian	24
3.5.1 Preparasi Alat	24
3.5.2 Preparasi Bahan	25
3.5.2.1 Pembuatan Ekstrak	25
3.5.2.2 Pembuatan Stok Ekstrak Propolis	25
3.5.2.3 Pembuatan Media DMEM	25
3.5.2.4 Pembuatan Media Pencuci dan Media Kultur	25
3.5.3 Isolasi dan Kultur Sel Hepar	26
3.5.4 Pengamatan Hasil Kultur	26
3.5.4.1 Konfluenitas Sel	26
3.5.4.2 Viabilitas Sel	27
3.6 Analisis Data	27
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pengaruh Ekstrak Propolis Terhadap Konfluenitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus novergicus</i>) Secara <i>In Vitro</i>	28
4.2 Pengaruh Ekstrak Propolis Terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus novergicus</i>) Secara <i>In Vitro</i>	34

BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	43
5.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	51



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Hepar tikus	8
Gambar 2.2 Siklus sel	13
Gambar 2.3 Kultur sel hepar tikus	16
Gambar 2.4 Propolis mentah	18
Gambar 2.5 Struktur kimia CAPE	20
Gambar 4.1 Konfluenitas sel hepar tikus	32
Gambar 4.2 Viabilitas sel hepar tikus dengan <i>countess</i>	35



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Rata-rata konfluenitas (%) sel hepar tikus (<i>Rattus novergicus</i>) secara <i>in vitro</i> dengan dan tanpa pemberian ekstrak propolis	29
Tabel 4.2 Ringkasan analisis ANOVA <i>one way</i> pengaruh ekstrak propolis terhadap konfluenitas sel hepar tikus (<i>Rattus novergicus</i>) secara <i>in vitro</i>	30
Tabel 4.3 Rata-rata viabilitas (%) sel hepar tikus (<i>Rattus novergicus</i>) secara <i>in vitro</i> dengan dan tanpa pemberian ekstrak propolis	35
Tabel 4.4 Ringkasan analisis ANOVA <i>one way</i> pengaruh ekstrak propolis terhadap viabilitas sel hepar tikus (<i>Rattus novergicus</i>) secara <i>in vitro</i>	36
Tabel 4.5 Uji Duncan pengaruh ekstrak propolis terhadap viabilitas sel hepar tikus (<i>Rattus novergicus</i>) secara <i>in vitro</i>	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan volume ekstrak propolis yang harus ditambahkan ke dalam media kultur	51
Lampiran 2. Analisis data konfluenitas sel hepar tikus (<i>Rattus novergicus</i>) ..	52
Lampiran 3. Gambar pengamatan konfluenitas sel hepar tikus pada hari ke-3 dan ke-6	54
Lampiran 4. Analisis data viabilitas sel hepar tikus (<i>Rattus novergicus</i>)	57
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	59
Lampiran 6. Bukti Hasil Konsultasi	63



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kultur sel *in vitro* merupakan teknik pemindahan dan pemeliharaan sel dari lingkungan asalnya ke dalam medium terkontrol yang sesuai untuk pertumbuhan sel. Kultur sel dapat diperoleh secara langsung dari jaringan dengan proses enzimatik ataupun mekanik yang disebut dengan kultur sel primer (Khumairoh, dkk, 2016). Kultur sel primer memiliki keterbatasan yaitu sulit diperoleh, masa hidup yang terbatas dan mudah terkontaminasi (Verma *et al.*, 2020).

Salah satu yang menjadi kendala dalam kultur sel adalah adanya molekul radikal bebas seperti ROS yang dapat menghambat siklus sel (Istiana, 2019). ROS dapat berasal dari endogen (berasal dari sel itu sendiri) dan eksogen (lingkungan) (Lin *et al.*, 2019). Secara endogen, sel menghasilkan ROS sebagai produk sampingan dari metabolisme aerobik pada mitokondria (Lin, *et al.*, 2019). Mitokondria merupakan sumber utama ROS endogen karena peran utamanya dalam produksi ATP yang membutuhkan Oksigen (O_2) untuk direduksi dalam rantai transpor elektron. Sebagian oksigen tersebut tereduksi menjadi radikal superoksida (O_2^-) yang kemudian direduksi oleh SOD menjadi H_2O_2 . Selanjutnya H_2O_2 yang terbentuk direduksi menjadi radikal hidroksil (HO^{\cdot}) yang termasuk dalam golongan radikal bebas yang paling reaktif (Snezhkina, *et al.*, 2019; Lipinski, 2011).

Produksi ROS dapat berperan pada pensinyalan redoks dalam biologi seluler pada dasarnya, akan tetapi jika produksi terlalu banyak dapat menyebabkan kerusakan sel, stress oksidatif dan kerusakan DNA (Havens, *et al.*, 2006). Menurut Suhartono, dkk (2007) kondisi stres oksidatif dapat menyebabkan terganggunya integritas sel. Terganggunya integritas sel dapat mempengaruhi pertumbuhan sel dalam kultur. Hasil biakan kultur sel dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut, seperti produksi obat, vaksin, antibodi, hormon dan enzim (Li *et al.*, 2010). Salah satu sel yang dapat digunakan dalam kepentingan tersebut adalah sel hepar.

Hepar tersusun atas sel yang berbeda-beda yang terbagi dalam sel-sel parenkim (hepatosit) dan non parenkim. Jumlah sel-sel parenkim sekitar 78% dari seluruh

volume jaringan hepar (Ishibashi, 2009). Menurut Sawada *et al.*, (1988) memaparkan bahwa dalam kultur primer, sel-sel parenkim hepar banyak digunakan untuk menyelidiki fungsi hepar dan pengaturannya oleh berbagai hormon. Setelah satu kali replikasi, sangat sedikit sel-sel tersebut yang masuk kembali ke dalam siklus sel. Oleh karena itu, diperlukan kontrol yang ketat terhadap lingkungan pertumbuhannya.

Kondisi stress oksidatif dapat dicegah dengan keterlibatan antioksidan, baik yang berasal dari dalam maupun luar sel Kumar (2011). Adanya antioksidan untuk mencegah stress oksidatif dalam perspektif Islam tersirat dalam surat Yasin ayat 36 yang berbunyi :

سُبْحَانَ الَّذِي خَلَقَ الْأَزْوَاجَ كُلَّهَا مِمَّا تُثْبِتُ الْأَرْضُ وَمِنْ أَنْفُسِهِمْ وَمِمَّا لَا يَعْلَمُونَ ٣٦

"Maha suci Dia yang telah menciptakan pasangan-pasangan semuanya, baik dari apa yang ditumbuhkan oleh bumi dan dari diri mereka maupun dari apa yang tidak mereka ketahui."

Dalam tafsir Al-Misbah (2002) kata *ازواج* merupakan bentuk jamak dari *زوج* yang artinya *pasangan*. Kalimat ini digunakan untuk masing-masing dari dua hal yang berdampingan, baik dalam hal kesamaan maupun dalam hal yang bertolak belakang. Allah menciptakan makhlukNya berpasang-pasangan, ada malam dan siang, senang dan susah, matahari dan bulan, demikian seterusnya. Allah menciptakan radikal bebas dalam tubuh yang dapat memicu suatu penyakit kemudian juga Allah ciptakan antioksidan untuk mencegahnya. Antioksidan dapat diperoleh dari bahan-bahan alam. Salah satu bahan alami yang berperan sebagai antioksidan adalah propolis.

Propolis menurut Tyastuti, dkk (2006) merupakan substansi seperti lem yang dibentuk oleh lebah madu dari resin tumbuhan. Propolis yang dihasilkan oleh lebah madu digunakan untuk membangun dan memelihara sarangnya memiliki banyak manfaat. Allah menyisipkan manfaat pada lebah yang tersirat dalam Al-Quran pada surat An-Nahl ayat 69. Allah SWT berfirman dalam surat An-Nahl ayat 69 yang berbunyi:

ثُمَّ كُلِي مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ
لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ٦١

“Kemudian makanlah dari tiap-tiap (macam) buah-buahan dan tempuhlah jalan Tuhanmu yang telah dimudahkan (bagimu), dari perut lebah itu keluar minuman (madu) yang bermacam-macam warnanya, didalamnya terdapat obat yang menyembuhkan bagi manusia. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Tuhan) bagi orang-orang yang memikirkan (69).”

Ayat diatas menjelaskan tentang manfaat madu yang dihasilkan oleh lebah. Menurut Tafsir Al-Qurtubi (2008) mayoritas pendapat ulama mengatakan bahwa kata ganti hi pada kalimat فِيهِ yang berarti nya, kembali kepada kata شَرَابٌ. Hal ini menunjukkan bahwa madu sebagai produk yang dihasilkan lebah mengandung obat bagi kesembuhan manusia.

Allah menciptakan lebah tidak hanya untuk dapat menghasilkan madu, tetapi juga menghasilkan royal jelly, bee venom, bee pollen dan propolis yang juga memiliki manfaat. Pada surat Ali Imran ayat 191 yang berbunyi :

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ
هَذَا بَطَلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ١٩١

“(Yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kamu dari siksa neraka.”

Menurut tafsir Ibnu Katsir (2004) kata بَطَلًا dalam ayat tersebut menjelaskan keadaan bahwa Allah tidak menciptakan suatu keadaan dengan sia-sia. Dengan kata lain segala sesuatu yang diciptakan Allah baik di bumi dan di langit tidak ada yang sia-sia seperti halnya propolis yang dihasilkan oleh lebah madu. Manusia sebagai makhluk yang berakal dan selalu mengingat Allah akan mendapatkan hikmah atas segala sesuatu yang diciptakanNya.

Propolis dalam beberapa penelitian menunjukkan kemampuan anti-mikroba (Susilo, 2009; Kalia *et al.*,2016), anti-tumor (Tyastuti, 2006), anti-virus (Hazem, *et*

al.,2017) anti-inflamasi (Barra *et al.*, 2015), anti-malaria (Olayemi, 2014), anti-kanker (Sawicka, *et al.*, 2012), Hepatoprotektif (Ramadan, *et al.*, 2015) dan mampu menstimulus sistem imun (Kalsum, *et al.*, 2017). Hasil penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa propolis yang dihasilkan oleh lebah madu memiliki banyak potensi. Potensi propolis sebagai obat suatu penyakit dikarenakan adanya kandungan senyawa-senyawa bioaktif. Didalam propolis terdapat lebih dari 300 senyawa kimia yang telah teridentifikasi (Miranda, *et al.*, 2007; Huang, *et al.*, 2014). Menurut beberapa penelitian propolis mengandung berbagai senyawa kimia seperti flavonoid, asam alifatik dan turunannya, asam aromatik, asam lemak, karbohidrat, aldehyd, asam amino, keton, terpenoid, vitamin (Herawati dkk, 2015), fenol dan turunannya (Bankova *et al.*,2000) dan zat anorganik (Marcucci, 1995). Salah satu senyawa yang dimiliki oleh propolis adalah *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE) (Murtaza, *et al.*, 2014).

Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) (3-(3,4-dihydroxyphenyl) merupakan ester dari *Caffeic Acid* yaitu turunan dari asam fenolik yang diidentifikasi untuk pertama kalinya dalam propolis (Grunberger, *et al.*, 1988). Wang *et al.* (2006) memaparkan bahwa CAPE merupakan polifenol yang terdiri atas gugus hidrogen dengan cincin katekol yang bertanggung jawab atas peran pentingnya dalam beberapa aktivitas biologi, salah satunya sebagai antioksidan. Menurut Almahdy, *et al.*, (2018) CAPE dalam propolis dibandingkan dengan vitamin C dan *N-acetyl cysteine* mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat yang dapat berperan sebagai hepatoprotektif. Kemampuan tersebut sangat dibutuhkan oleh sel untuk dapat tetap hidup dan beregenerasi saat terjadi kerusakan.

CAPE merupakan polifenol yang bersifat hidrofobik (Murtaza *et al.*, 2014) Menurut Oteiza, *et al.* (2005) senyawa fenol sebagai antioksidan akan berikatan pada permukaan membran sel melalui komponen fosfolipid bilayer. Ikatan tersebut mampu melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas. Hal ini dikarenakan tidak adanya interaksi antara senyawa radikal bebas dengan komponen membran sel yang menyebabkan peroksidasi lipid. Tidak terbentuknya peroksidasi lipid menjadikan proses metabolisme dalam sel akan berjalan secara optimal sehingga sel dapat menjalankan fungsinya dengan baik dan tetap hidup. Li *et al.*, (2015) memaparkan

bahwa senyawa golongan *Caffeic acid* dapat meningkatkan viabilitas sel liver normal manusia secara *in vitro* melalui aktivasi *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) yang dapat mentransduksi sinyal faktor pertumbuhan yang menginduksi diferensiasi atau proliferasi sel.

Penelitian tentang aktivitas propolis dilakukan oleh Najafi, *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa secara *in vitro* ekstrak air propolis dapat menghambat pertumbuhan McCoy, HeLa, SP20, BHK21 dan HEP-2 serta dapat meningkatkan pertumbuhan sel normal dengan konsentrasi ekstrak sebesar 1 mg/ml dan 2 mg/ml. Berdasarkan hasil uji MTT pada konsentrasi 1 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan McCoy sebesar 70%, sedangkan pada konsentrasi 2 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan SP20 sebesar 80%. Sedangkan pada sel normal dengan konsentrasi ekstrak air propolis sebesar 2 mg/ml dapat menstimulus dan meningkatkan pertumbuhan sel ginjal, hepar, limfosit manusia dan limfa tikus sebesar 65%, 55%, 35% dan 25%. Selain itu, hasil penelitian Jannah (2019) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak propolis pada kultur primer sel saraf otak tikus sebesar 80 µg/mL memiliki viabilitas tertinggi ($90.3 \pm 3.09\%$) dengan nilai PDT sebesar 2.88 ± 0.66 hari dibandingkan dengan kontrol (86.3 ± 4.11) dengan nilai PDT sebesar 5.03 ± 0.66 hari. Penelitian Banskota *et al.* (2000) juga memaparkan bahwa pemberian ekstrak air dan etanol propolis dapat memberikan efek perlindungan terhadap induksi D-GaIN pada kultur primer hepatosit tikus pada konsentrasi 100 µg/mL dan 200 µg/mL dengan tingkat kelangsungan hidup sel mulai dari 49,3% hingga 117,7% dibandingkan dengan kontrol (35%). Ketiga hasil tersebut menunjukkan bahwa sel yang diberi ekstrak propolis memiliki usia hidup yang lebih lama daripada yang tidak diberi ekstrak propolis.

Berdasarkan hal tersebut, dilakukan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh ekstrak propolis terhadap pertumbuhan sel hepar secara *in vitro*. Propolis diekstrak menggunakan etanol 96% dengan cara maserasi. Penggunaan etanol bertujuan untuk menarik senyawa-senyawa bioaktif dalam propolis. Penggunaan konsentrasi ekstrak pada penelitian ini merujuk pada penelitian Banskota *et al.* (2000) yang memaparkan bahwa pemberian 100 µg/mL ekstrak propolis menunjukkan viabilitas sel hepatosit tikus yang dipapar D-GaIN/TNF- α lebih tinggi daripada kontrol. Sedangkan pada

konsentrasi 200 µg/mL dapat menurunkan viabilitas sel hepatosit. Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti ingin mengetahui pengaruh ekstrak propolis terhadap pertumbuhan sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) dan berapa konsentrasi ekstrak propolis yang tepat terhadap pertumbuhan sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Apakah ekstrak propolis berpengaruh terhadap konfluenitas dan viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro*?
2. Berapakah konsentrasi ekstrak propolis yang paling berpengaruh terhadap konfluenitas dan viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap konfluenitas dan viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui konsentrasi ekstrak propolis yang paling berpengaruh terhadap konfluenitas dan viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak propolis berpengaruh terhadap konfluenitas dan viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro*.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Secara teoritis, penelitian ini dapat memberikan informasi tentang pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap konfluenitas dan viabilitas sel hepar *Rattus novergicus* secara *in vitro*.
2. Secara aplikatif, diharapkan propolis dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional maupun suplemen sehari-hari oleh masyarakat.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

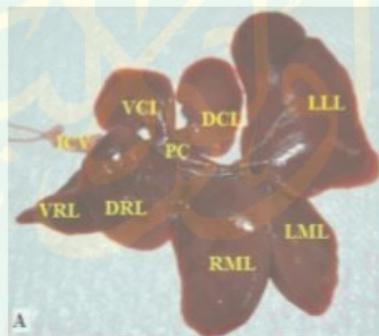
1. Sel hepar diambil dari organ hepar tikus yang berumur 3-4 hari.
2. Propolis yang digunakan didapat dari peternak lebah madu (*Apis mellifera*) di Karangploso, Malang dan diekstrak dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi di Materia Medika Batu.
3. Konsentrasi ekstrak propolis yang digunakan pada penelitian ini adalah 100 µg/mL, 120 µg/mL, 140 µg/mL, 160 µg/mL dan 180 µg/mL dan 200 µg/mL
4. Media yang digunakan adalah media media *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang ditambah 10% serum *Fetal Bovine Serum* (FBS).
5. Parameter yang diamati meliputi konfluenitas dan viabilitas sel hepar tikus.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hepar

Hepar merupakan kelenjar terbesar dalam tubuh yang berfungsi penting dalam menjaga keseimbangan metabolisme seperti penyimpanan, sintesis, metabolisme dan distribusi karbohidrat, lemak dan vitamin. Hepar juga memproduksi protein serum, enzim dan sitokin (Kermanizadeh, *et al.*, 2012). Selain metabolisme zat-zat endogen, hepar juga berperan penting dalam metabolisme zat-zat eksogen seperti obat dan detoksifikasi (Eidi, *et al.*, 2012).

Hepar terletak pada bagian abdomen dekat dengan tulang rusuk bagian bawah, yakni setengah dari volumenya terletak di bagian *intrathoracic*. Hepar tikus berwarna merah dan bertekstur halus. Hepar tikus terdiri dari 4 lobus, yaitu lobus medial, lobus lateral sinistra, lobus lateral dextra dan lobus kaudatus. Hepar tikus tidak memiliki kantung empedu karena memiliki saluran empedu sendiri pada setiap lobus yang dibentuk oleh saluran utama hepar (Stan, 2018).



Gambar 2.1 Hepar Tikus (Stan, 2018)

Hepar tersusun atas banyak sel berbeda yang terbagi menjadi sel-sel parenkim (hepatosit) dan nonparenkim. Jumlah sel-sel hepatosit sekitar 78% dari seluruh volume jaringan hepar. Sedangkan sel-sel nonparenkim terdiri atas 2,8% sel endotel, 2,11% sel kupffer dan 1,4% *Hepatic Stellate Cells* (Ishibashi, *et al.*, 2009).

Hepatosit tersusun sebagai *single* sel yang tipis pada permukaan *plate*. Proses sintesis dan metabolisme pada hepar hampir seluruhnya terjadi dalam hepatosit. Aliran darah menuju vena hepatica melewati permukaan yang terbuka dari hepatosit sehingga

racun dan nutrisi dalam darah disaring oleh hepatosit. Hepatosit kaya akan organel seperti retikulum endoplasma dan aparatus golgi yang mengandung banyak mitokondria, lisosom dan peroksisom. Fungsi utama hepatosit adalah terlibat dalam metabolisme lipid, karbohidrat dan protein. Hepatosit juga memproduksi protein serum seperti albumin dan faktor koagulasi. Selain itu, hepatosit menghasilkan dan mengeluarkan empedu serta mendetoksifikasi kolesterol, hormon steroid dan obat xenobiotik (Jevas, 2017).

Sel-sel endotel sinusoidal melapisi dinding sinusoid hepatic dan melakukan fungsi filtrasi. Sel-sel ini juga menunjukkan kapasitas endositik yang besar untuk komponen matriks ekstraseluler dan kompleks imun. Secara umum kompleks tersebut menelan partikel yang berukuran lebih kecil dan mungkin berperan dalam pembersihan virus tapi tidak memiliki fungsi fagositik. Selain itu, sel-sel endotel berfungsi sebagai sel penyaji antigen dan mengeluarkan sitokin tertentu (Jevas, 2017).

Hepar menampung sejumlah besar sel-sel kuppfer yang mewakili populasi makrofag terbesar dari jaringan tubuh. Setelah aktivasi, sel-sel kuppfer mampu mengeluarkan mediator inflamasi seperti sitokin, *Spesies Reactive Oxygen* dan oksida nitrat. Selain itu, sel-sel kuppfer memiliki reseptor yang memungkinkan untuk mengikat sel-sel yang ditutupi oleh imunoglobulin (Jevas, 2017).

Hepar juga memainkan peran dalam penyerapan dan penyimpanan vitamin A (retinol) dan menyimpan sekitar 95% retinoid yang ditemukan dalam tubuh. Sel-sel stellate adalah sel yang menyimpan sejumlah besar retino dan retinyl palmitate dalam sitoplasmanya. Sel-sel stellate dapat menjadi aktif dalam kondisi stres dan berubah menjadi sel-sel myofibroblas yang memainkan peran dalam respon inflamasi fibrotik (Jevas, 2017).

2.2. Kultur Sel Hepar *in Vitro*

Sel pada manusia telah diketahui dapat diperbanyak secara *in vitro* pada awal tahun 1990 (Leland dan Christine, 2007). Kultur sel digunakan sebagai cara untuk mempelajari tentang sel hewan secara *in vitro* yang berkembang pada tahun 2000. Kultur sel berhubungan dengan serangkaian proses tentang isolasi sel ke dalam

lingkungan yang terkontrol (*in vitro*) dari lingkungan yang asli (*in vivo*). Menurut Hudu, *et al.* (2016) saat ini kultur sel menjadi suatu metode yang dibutuhkan dalam diagnosis dan pengobatan modern pada manusia.

Kultur sel merupakan teknik untuk memperbanyak atau memelihara bagian dari suatu jaringan makhluk hidup dalam media pertumbuhan yang sesuai dengan kondisi fisiologisnya (Freshney, 2005). Metode kultur terbagi menjadi kultur organ, jaringan dan sel. Kultur organ dapat diperoleh dari keseluruhan atau sebagian organ dengan mempertahankan sifat dan fungsi jaringannya. Kultur jaringan dapat diperoleh melalui potongan organ maupun jaringan yang akan berdiferensiasi. Sedangkan kultur sel dapat diperoleh dari sel-sel jaringan ataupun suatu organ melalui pemisahan secara enzimatis, kimiawi atau mekanik menjadi suspensi sel (Malole, 1990).

Kultur primer merupakan penanaman sel yang dilakukan pertama kali pada kondisi sintetik (Freshney, 2005). Sel yang akan digunakan dalam kultur primer dapat diisolasi dari jaringan tubuh secara langsung (Klingbeil *et al.*, 2009). Sel yang akan dikultur dapat diperoleh dari jaringan yang sehat ataupun yang sakit yakni seperti sel kanker dan sel tumor (Mitry, *et al.*, 2012). Menurut Leland dan Christine (2007) kultur sel primer dapat diperoleh dengan cara enzimatis, mekanik atau kimiawi. Sel yang telah diisolasi dikultur dalam media pertumbuhan yang sesuai dengan kondisi fisiologisnya.

Komponen-komponen utama yang digunakan dalam kultur sel *in vitro* antara lain, media, serum, antibiotik dan faktor pertumbuhan. Komponen-komponen tersebut perlu diperhatikan karena dapat mempengaruhi pertumbuhan sel dalam media kultur (Halim, dkk, 2010). Media pertumbuhan sel harus menyediakan kondisi lingkungan yang dibutuhkan oleh sel secara *in vitro* agar dapat hidup dan berkembang (Malole, 1990). Media berperan penting dalam menciptakan lingkungan yang memiliki tekanan osmotik, pH dan faktor pendukung yang lain sehingga dapat membantu dalam proses pertumbuhan sel (Halim, dkk, 2010). Media yang digunakan dalam kultur sel mamalia pada umumnya adalah *Bulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM). Media DMEM ini merupakan modifikasi dari *Basal Medium Eagle* (BME) yang mengandung empat kali lipat lebih banyak vitamin, asam amino dan glukosa. Penambahan komponen lain

seperti serum, antibiotik dan faktor pertumbuhan dapat mendukung pertumbuhan sel dalam media kultur (Syahidah dan Yuni, 2016).

Serum dalam media kultur berperan penting sebagai sumber nutrisi sel untuk tumbuh dan berkembang (Halim, dkk, 2010). Penambahan serum dalam kultur bertujuan untuk memperoleh pertumbuhan sel yang optimal. Serum yang digunakan pada media kultur adalah serum fetus sapi (*foetal bovine serum*), serum anak sapi (*calf serum*), serum kuda dan manusia. Akan tetapi yang paling sering digunakan adalah *calf serum* dan *foetal bovine serum* (Andiana, dkk, 2017).

Salah satu permasalahan yang paling sering terjadi saat melakukan kultur sel adalah adanya kontaminasi. Upaya menghindari adanya kontaminasi mikroorganisme yang dapat mengganggu pertumbuhan sel dan bersifat patogen maka antibiotik dan antijamur sering kali ditambahkan ke dalam medium kultur. Antibiotik yang biasa digunakan untuk keperluan kultur adalah antibiotik yang berspektrum luas seperti, penisilin dan streptomycin. Untuk memicu pertumbuhan, mempertahankan pluripotensi atau merangsang terjadinya diferensiasi, faktor pertumbuhan yang sesuai dengan fungsi-fungsi tersebut dapat ditambahkan ke dalam medium kultur (Halim, dkk, 2010).

Komponen lain yang perlu diperhatikan pada proses kultur sel adalah temperatur, pH dan gas. Temperatur yang rendah dapat mempengaruhi pH dengan meningkatkan kelarutan CO₂ (Malole, 1990). Menurut Freshney (2005) pH yang optimum bagi pertumbuhan sel dapat bervariasi tergantung pada jenis sel. Umumnya sel hewan tumbuh optimal pada pH 7,0 hingga 7,4 (Chaudry, *et al.*, 2009). Didalam media pertumbuhan terdapat sistem buffer karbondioksida – bikarbonat. Sel yang tumbuh akan menghasilkan CO₂ yang tidak dapat keluar karena adanya kadar CO₂ yang berlebih diatas media sehingga terjadi penguraian NaHCO₃ dan menghasilkan kelebihan ion H⁺ yang menyebabkan penurunan pH. Oleh sebab itu, kadar CO₂ pada ruangan di atas media perlu diperhatikan untuk mempertahankan pH media. Diperlukan kadar CO₂ sebesar 5% pada waktu kultur dimulai. Selain kadar CO₂, O₂ juga mempengaruhi peningkatan produksi sel. Kadar O₂ yang terlarut dalam media

hanya 7,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sedangkan kadar O_2 yang digunakan sel kurang lebih $6 \mu\text{g} / 10^6$ sel per jam (Malole, 1990).

Komponen-komponen dalam media pertumbuhan harus selalu diperhatikan agar dapat mendukung kondisi yang isotonis sehingga didapatkan pertumbuhan dan perkembangan sel yang optimum. Prinsip tersebut sesuai dengan prinsip penciptaan makhluk hidup pada sistem fisiologis di dalam tubuh dengan kondisi seimbang. Allah SWT dalam surat Al-Infithar (82) ayat 7 yang berbunyi :

الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّاكَ فَعَدَلَكَ ۖ

“yang telah menciptakan kamu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan susunan tubuhmu seimbang.”

Menurut Tafsir Jaelani (2011) kata **فَعَدَلَكَ** yang berarti “dan menjadikan susunan tubuhmu seimbang” menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan tubuh manusia dengan ukuran yang tepat sehingga tercipta kondisi yang seimbang (proporsional). Kondisi tersebut menjadikan susunan tubuh manusia dapat berfungsi dengan baik. Allah menciptakan manusia dan menyempurnakannya dengan bentuk yang paling baik. Hal ini dijelaskan dalam Tafsir Al-Misbah (2002) bahwa kesempurnaan dan keseimbangan penciptaan manusia tidak hanya pada bentuk tubuh saja tetapi juga pada keberadaan akal dan ruh dalam tubuh manusia.

Berdasarkan dengan ayat tersebut dapat diketahui bahwa untuk dapat menjalankan fungsinya dengan baik, segala sesuatu harus berada dalam kondisi yang seimbang. Begitu juga sel, baik secara struktural maupun fungsional sebagai unit terkecil yang menyusun tubuh makhluk hidup memerlukan kondisi lingkungan pertumbuhan yang sesuai dan seimbang agar dapat berfungsi sebagaimana mestinya. Dalam kondisi *in vitro*, pertumbuhan dan perkembangan sel dapat terjadi apabila kondisi lingkungan yang disediakan sesuai dengan karakteristik sel tersebut.

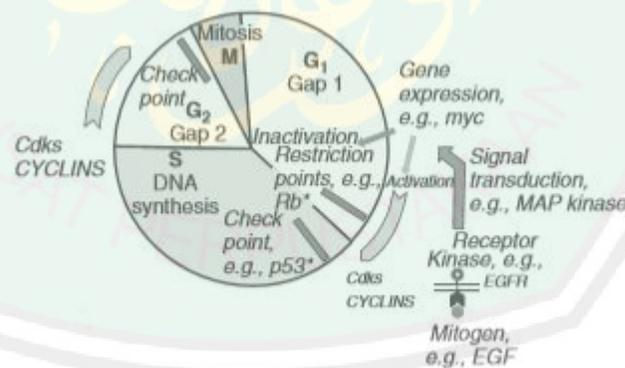
Kultur primer membutuhkan medium yang sesuai. Apabila medium tidak sesuai maka sel-sel didalamnya akan mati karena autolisis. Kultur primer dalam jangka waktu yang lama sebaiknya diberi nutrisi yang cukup dan antibiotik. Selain itu medium

kultur juga perlu diganti pada kurun waktu tertentu agar sisa-sisa metabolisme sel tidak menjadi kontaminan (Kalanjati, 2006).

2.3. Proliferasi Sel Hepar secara *in Vitro*

Sel hepar tikus berkembang dari sel progenitor (sel awal) yang belum berdiferensiasi (Dianat, *et al.*, 2013). Sel progenitor hepar dalam kultur *in vitro* mempunyai morfologi inti oval dengan sedikit sitoplasma (Tosh dan Alastair, 2005). Hristova *et al.* (2009) memaparkan bahwa morfologi sel hepar tikus berbentuk sel-sel memanjang (elongasi) dan terlihat jelas persinggungan sel satu dengan sel yang lainnya. Karakteristik utama sel hepar yaitu inti yang relatif besar dan sitoplasma yang terlihat padat. Inti (nuklei) oval dengan satu hingga tiga anak inti (nukleoli) dan sel-sel poligonal dengan inti yang relatif besar.

Proliferasi merupakan proses pertumbuhan sel berupa penambahan jumlah sel melalui siklus pembelahan sel. Proliferasi sel dapat terjadi melalui siklus sel yang terbagi dalam dua tahap yaitu tahap mitotik (M) dan interfase (I). Tahap mitotik yang mencakup mitosis dan sitokenesis adalah bagian terpendek siklus sel. Tahap interfase merupakan tahap terpanjang yang mencakup 90% dalam siklus sel (Campbell, 2008; Albert, 2002).



Gambar 2.2. Siklus Sel (Freshney, 2010)

Pada tahap interfase, sel akan menyalin kromosom-kromosom untuk persiapan proses pembelahan sel. Tahap interfase terbagi menjadi fase G₁ (Gap pertama), fase G₂ (Gap kedua) dan fase S (Sintesis). Dalam ke tiga tahap ini, sel akan memproduksi

organel sitoplasma seperti mitokondria dan retikulum endoplasma dan protein. Sedangkan duplikasi kromosom hanya terjadi pada tahap S (Campbell, 2008).

Pada tahap G1, pembelahan sel dimulai dari sintesis protein dan RNA. Setelah tahap G1 selesai, sel memasuki tahap S untuk sintesis DNA. Kemudian sel menuju tahap G2 persiapan sintesis RNA untuk proses pembelahan sel pada tahap selanjutnya yakni tahap mitotik (M). Dalam tahap ini, akan terjadi pembelahan sel dari satu sel menjadi dua sel (Freshney, 2005; Pustztai, 1996).

Pertumbuhan hasil kultur secara *in vitro* terbagi menjadi 3 tahapan (Freshney, 2010), yakni:

1. *Lag phase*

Lag phase merupakan tahapan setelah sel ditanam pada media kultur. Tahap ini merupakan tahap adaptasi bagi sel dalam lingkungan yang baru. Sel akan melekatkan diri pada substrat dan menyebar. Pada tahap ini, enzim-enzim baru akan disintesis, terjadi sedikit peningkatan dalam massa dan volume sel akan tetapi tidak ada peningkatan jumlah sel (Oyeleye *et al.*, 2016).

2. *Log phase*

Log phase merupakan tahap pertambahan jumlah sel karena sel telah melalui *lag phase* dan mengalami proliferasi. Tahap ini bergantung pada kecepatan pertumbuhan sel dan kepadatan sel yang ditanam. Trenggono (2009) menyatakan bahwa pada *log phase* akan terjadi pertumbuhan sel yang cepat berkisar antara 90-100% sehingga pada tahap ini adalah waktu terbaik untuk memanen hasil kultur.

3. *Plateu phase*

Plateau phase merupakan tahapan terakhir dalam kultur sel. Tahap ini terjadi setelah sel mencapai konfluen berupa penurunan proliferasi sel. Menurut Trenggono (2009) dalam tahap ini akan terjadi penurunan pertumbuhan sel normal berkisar antara 0-10% yang konfluen.

Pertumbuhan kultur sel hepar secara *in vitro* akan mengalami peningkatan hingga hari ke sepuluh. Pada hari selanjutnya pertumbuhan sel masuk pada tahap *plateu phase* yang ditandai dengan jumlah sel yang menurun (Kumar, *et al.*, 2002). Menurut Freshney (2005) penurunan jumlah sel pada tahap ini disebabkan karena sel-sel yang

tumbuh dengan cepat telah berdiferensiasi yang mengakibatkan pembelahan sel menjadi berkurang bahkan tidak terjadi.

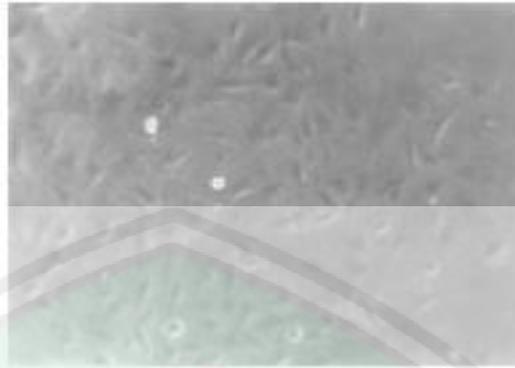
Tahapan-tahapan dalam pembelahan sel secara *in vitro* secara tersirat telah dijelaskan dalam firman Allah SWT di dalam Al-Quran Surat Nuh (71) ayat 14 yang berbunyi:

وَقَدْ خَلَقْنَاكُمْ أَطْوَارًا ۝١٤

“Padahal Dia sesungguhnya telah menciptakan kamu dalam beberapa tingkatan kejadian.”

Kata أَطْوَارًا berasal dari kata طور yang berarti *tingkatan* atau *tahapan* (Shihab, 2002). Dalam Tafsir Jalalain (Tanpa tahun) dalam menjelaskan bahwa kata أَطْوَارٍ merupakan jamak dari kata طور dan juga berkedudukan menjadi حال yang menjelaskan kondisi atau keadaan bahwa Allah SWT menciptakan manusia dari serangkaian proses mulai dari nutfah kemudian menjadi segumpal darah, kemudian segumpal daging hingga menjadi manusia yang sempurna. Hal ini pada kultur *in vitro* dapat ditunjukkan dalam tahap-tahap pertumbuhan sel. Menurut Trenggono (2009) setiap tahap pertumbuhan yang dilalui oleh sel mempunyai kondisi yang berbeda

Pada kondisi *in vitro*, sel hepar tikus neonatal menempel pada substrat dan menyebar dalam cawan setelah 48 jam dan mulai berproliferasi pada hari ke-5. Sedangkan sel hepar tikus dewasa hanya beberapa sel yang dapat menempel pada substrat dan tidak mengalami proliferasi pada hari ke-5 meskipun beberapa sel menempel pada substrat. Sel hepar tikus neonatus dapat bertahan hidup dalam selama lebih dari 21 hari pada kondisi normal. Sedangkan sel hepar tikus dewasa dapat hidup selama 13 hari pada medium selektif (Kumar, *et al.*, 2002).



Gambar 2.3. Kultur Sel Hepar Tikus pada hari ke-5 (Kumar, *et al.*, 2002)

2.4. Viabilitas dan Konfluenitas Sel

Viabilitas sel merupakan kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang. Semakin banyaknya jumlah sel hidup dibandingkan dengan sel mati dapat menunjukkan kemampuan pertumbuhan dan perkembangan sel yang tinggi (Takeuchi, 2014). Untuk mengevaluasi keberhasilan kultur dapat menggunakan viabilitas sel sebagai parameternya. Viabilitas sel dapat diuji menggunakan pewarnaan yang didasarkan pada membran sel. Sel yang hidup tidak mampu mengikat zat warna karena membran sel yang utuh tidak dapat ditembus oleh zat warna sehingga sel tidak akan terwarnai. Sedangkan pada membran sel yang mati atau rusak mampu mengikat zat warna sehingga sel akan terwarnai. Pewarna yang dapat digunakan dalam uji viabilitas sel yakni nigrosin, eritrosin dan *trypan blue* (Trenggono, 2009).

Menurut Bolt (2001) uji viabilitas sel pada umumnya dilakukan dengan perhitungan sel menggunakan hemositometer dan zat warna *trypan blue*. Pewarna *Trypan blue* akan menunjukkan perbedaan antara sel yang hidup dan mati dengan cara sel yang hidup akan terlihat bening (tidak berwarna) karena struktur membran sel tersebut utuh sehingga zat warna tidak dapat berikatan dengan sel. Sedangkan pada sel yang mati terlihat berwarna biru karena zat warna berikatan dengan protein dalam plasma pada membran sel yang rusak. Penggunaan Konsentrasi yang efektif untuk uji viabilitas sel menggunakan *trypan blue* adalah sebesar 0.5% karena tidak dapat merubah integritas membran sel dan dapat memperlambat kematian sel.

Wulandari (2003) memaparkan bahwa selain viabilitas sel pertumbuhan kultur sel juga dapat dilihat dari abnormalitas dan konfluenitas sel. Konfluenitas sel digunakan sebagai parameter kultur untuk dapat melihat pertumbuhan sel dan interaksinya dengan lingkungan (Sa'diyah, 2019). Budiono (2002) memaparkan bahwa konfluenitas sel merupakan keadaan dimana seluruh substrat sudah terpakai oleh sel dan sel saling berhubungan antara sel satu dengan sel yang lain.

Konfluenitas sel merupakan tumbuh meratanya sel sampai menutupi cawan kultur. Menurut Kurnia dan Kholifah (2012) pengukuran konfluenitas sel mencakup persentase sel dalam mencapai konfluen. Persentase 0% pada sel yang belum melekat pada cawan kultur, persentase 25% pada sel yang telah memenuhi seperempat cawan kultur, persentase 50% pada sel yang telah memenuhi setengah dari cawan kultur, persentase 75% pada sel yang telah memenuhi tiga perempat cawan kultur dan persentase 100% pada sel yang telah memenuhi cawan kultur.

2.5. Tinjauan Umum Propolis

Kata propolis berasal dari bahasa Yunani yang terdiri dari kata *pro* dan *polis*. Kata *pro* yang berarti didepan atau sebelum dan *polis* yang berarti kota atau komunitas. Propolis (*bee glue*) merupakan produk lebah madu yang berasal dari getah atau resin tumbuhan. Propolis digunakan lebah madu untuk melindungi dinding sarang dan menjaga suhu di dalamnya agar tetap stabil (Agca, *et al.*, 2017). Propolis melindungi sarang lebah madu dengan cara menutup celah-celah di dinding sarang. Hal tersebut merupakan upaya perlindungan diri alami terhadap musuh, terutama virus dan bakteri (Ramadhan, dkk, 2016).

Propolis dihasilkan lebah madu dengan cara getah dari berbagai jenis tumbuhan dikumpulkan dan kemudian bercampur dengan saliva dan enzim-enzim pada lebah (Herawati, 2015). Propolis yang dihasilkan oleh lebah madu pada umumnya mempunyai tekstur lengket karena mengandung getah tumbuhan yang bercampur dengan *bee wax* dan cairan lebah. Propolis mempunyai bau yang khas dan berwarna kuning kehijauan hingga coklat gelap. Hal tersebut tergantung pada sumber makanan yang diperoleh dan usianya (Banskota, *et al.*, 2000).



Gambar 2.4. Propolis (dokumen pribadi, 2018).

Propolis selain bermanfaat bagi lebah ternyata juga bermanfaat bagi manusia. Beberapa penelitian memaparkan bahwa propolis mempunyai aktivitas biologis yang luas diantaranya kemampuan anti-mikroba (Susilo, 2009; Kalia *et al.*, 2016), anti-tumor (Tyastuti, 2006), anti-virus (Hazem, *et al.*, 2017) anti-inflamasi (Barra *et al.*, 2015), anti-malaria (Olayemi, 2014), anti-kanker (Sawicka, *et al.*, 2012), Hepatoprotektif (Ramadan, *et al.*, 2015), antioksidan (Alkis, 2015) dan mampu menstimulus sistem imun (Kalsum, *et al.*, 2017). Hal tersebut menunjukkan bahwa propolis yang dihasilkan oleh lebah madu dapat menjadi obat bagi suatu penyakit.

2.5.1. Kandungan Propolis

Propolis terdiri dari campuran kompleks resin tumbuhan yang mengandung 50% resin tumbuhan, 30% wax, 10% minyak esensial dan aromatik, 5% *pollen* dan 5% substansi organik (Toreti, *et al.*, 2013). Pada saat ini, lebih dari 300 unsur pokok kimiawi telah diidentifikasi dalam propolis dari berbagai daerah. Komponen kimiawi pada propolis meliputi polifenol, flavonoid, asam fenolik dan turunannya, keton, aldehid, terpenoid, sterol, vitamin, asam amino dan zat aromatik lainnya (Al-Jumaily, *et al.*, 2014).

Kandungan kimia pada propolis bergantung pada populasi tumbuhan yang berada disekitar sarang lebah (Babinska, *et al.*, 2014). Selain itu, metode ekstraksi juga mempengaruhi kandungan kimia pada propolis (Hasan, dkk, 2013). Propolis harus dimurnikan menggunakan pelarut karena tidak dapat digunakan sebagai bahan mentah (Pietta *et al.*, 2002). Ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang berbeda akan

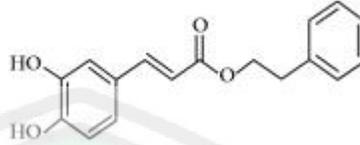
menghasilkan komponen yang berbeda dan akan mempengaruhi aktivitasnya (Sforzin, 2011). Ekstraksi propolis secara umum dilakukan dengan teknik maserasi menggunakan pelarut organik (Hasan, dkk, 2013). Propolis biasanya diekstrak dengan menggunakan etanol atau air pada konsentrasi yang berbeda sebagai pelarut (Park dan Ikegaki, 1998).

Dalam penelitian ini pelarut yang digunakan adalah etanol. Menurut Posangi (2000) etanol merupakan pengeksktraktor polar. Hal ini dikarenakan senyawa aktif yang bersifat polar seperti flavonoid dan lain sebagainya dapat diekstraksi oleh etanol. Pelarut etanol juga bersifat universal sehingga selain dapat mengekstraksi senyawa polar juga dapat mengekstraksi senyawa non polar (Nuri, 2013). Selain itu menurut Hastuti, dkk (2013) etanol termasuk pelarut golongan alkohol yang dapat lebih banyak melarutkan polifenol dibandingkan pelarut air. Hal tersebut dikarenakan alkohol lebih efektif dalam melepas senyawa polifenol dengan cara mendegradasi dinding sel yang bersifat non polar. Senyawa yang diperoleh dari ekstraksi propolis menggunakan etanol adalah polifenol, flavonoid, tanin, terpenoid dan sterol (Fokt, *et al.*, 2010).

Senyawa fenolik merupakan komponen propolis yang paling tinggi, diantaranya adalah asam fenolik, aldehida fenolik, fenol dan turunannya, ketofenol dan senyawa lainnya. Komponen penyusun utama asam fenolik dalam propolis adalah *benzoic acid* dan *cinnamic acid* beserta turunannya (Gorecka, *et al.*, 2014). Salah satu turunan *cinnamic acid* dalam propolis yang mempunyai peran antioksidan adalah *caffeic acid*.

Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) merupakan salah satu komponen utama pada propolis. CAPE merupakan ester asam *caffeic* dan termasuk turunan asam fenolik yang memiliki struktur mirip flavonoid (Ozen, *et al.*, 2004). CAPE merupakan komponen senyawa bioaktif alami yang diperoleh dari propolis melalui proses ekstraksi. CAPE memiliki nama kimia berupa 2-phenylethyl (2E)-3-(3,4-dihydyphenyl). Pertama kali senyawa CAPE diidentifikasi oleh Grunberged *et al.* sebagai hidrofobik polifenol. Ester polifenol ini juga bisa disintesis oleh reaksi *caffeic acid* dengan *phenetyl alcohol*. CAPE merupakan polifenol dengan struktur grup

hidroksi dengan cincin katekol yang berperan penting dalam berbagai aktivitas biologi (Murtaza, *et al.*, 2014).



Gambar 2.5. Struktur Kimia *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (Kumazawa, 2010)

2.5.2. Peran Propolis terhadap Kultur Sel Hepar Tikus

Dalam penelitian ini, bahan tambahan yang digunakan adalah ekstrak propolis. Ekstrak propolis pada kultur sel hepar dapat berperan sebagai antioksidan dan stimulator sel. Propolis memiliki senyawa CAPE yang merupakan penyusun utama propolis dengan aktivitas biologis yang luas meliputi penghambatan *nuclear factor kappa-B*, penghambatan proliferasi sel, induksi *cell cycle arrest* dan apoptosis (Huang, Shuai, *et al.*, 2014).

CAPE dapat meningkatkan ekspresi dari *Epidermal Growth Factor* (EGF). EGF merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang dapat meregulasi proliferasi pada sel hepar (Fausto N., *et al.*, 1995). Li *et al.*, (2015) memaparkan bahwa golongan senyawa *Caffeic Acid* dapat meningkatkan pertumbuhan sel melalui aktivasi *extracellular signal regulated kinase* (ERK). Aktivasi ERK penting dalam proliferasi dan kelangsungan hidup sel karena dapat memicu untuk memasuki siklus sel melalui *growth factor* (Guegan, J.P *et al* 2012). Dengan adanya ekspresi dari EGF, sel akan memasuki siklus sel, melakukan mitosis dan proliferasi meningkat.

Propolis juga dapat berperan sebagai antioksidan yang dapat mencegah kerusakan komponen seluler akibat radikal bebas. Pada media kultur sangat dibutuhkan adanya antioksidan untuk menstabilkan ROS. Hal ini bertujuan untuk mengurangi terjadinya kerusakan oksidatif (Stiphanuk, 2000).

Senyawa polifenol dalam propolis dapat berperan sebagai antioksidan yang kuat dan regulator metabolisme sel. Polifenol dapat melakukan penetrasi ke dalam sitoplasma melalui membran plasma dengan cara berinteraksi dengan senyawa atau

molekul pada permukaan membran sel. Polifenol juga dapat mempengaruhi stabilitas osmotik, kelarutan, difusi dan permeabilitas membran sel terhadap senyawa yang larut air, berinteraksi dengan membran dan fusi sel (Tarahovsky, 2008). Selain itu, senyawa golongan fenol dapat berperan sebagai faktor pemicu proliferasi sel. Hal ini dikarenakan senyawa fenol mempunyai aktivitas seperti estrogen (Paluputturi dan Dayapulae, 2011). Adanya aktivitas estrogen dapat mendukung proliferasi hepatosit secara *in vitro*. Beberapa studi juga menyatakan bahwa estrogen menstimulasi proliferasi hepatosit setelah *partial hepatectomy* melalui interaksi ligan-reseptor (Uebi, *et al.*, 2014). Interaksi ligan-reseptor tersebut dapat berikatan dengan *estrogen response element* (ERE) dan akan mengaktifasi transkripsi suatu gen dalam menghasilkan mRNA untuk mensintesis protein yang dapat mempengaruhi proliferasi sel (Ikhwati, 2018 ; Meng dan Lu, 2019).

Selain polifenol, senyawa flavonoid juga mempunyai kemampuan antioksidan yang dapat melindungi sel dari kerusakan akibat *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Nijveldt, *et al.*, 2001). Kemampuan Flavonoid mencegah kerusakan sel dapat melalui dua cara yakni flavonoid menjadi komponen hidrofobik membran sel saat masuk ke dalam sel atau dengan ikatan hidrogen antara gugus polar kepala lipid yang ada diantara air dan lipid dengan flavonoid (Oteiza *et al.*, 2005). Selain itu, flavonoid dapat menonaktifkan ROS melalui reaksi antara flavonoid dengan molekul bebas yang membentuk radikal. Reaksi tersebut relatif lebih stabil dan dapat bertahan lebih lama hingga bereaksi dengan produk non radikal (Widayati, 2019).

Flavonoid dapat melakukan penetrasi ke dalam sel melalui membran sel. Flavonoid yang sudah menembus ke dalam sel akan terakumulasi di bawah gugus fosfat dan secara lateral berdifusi ke dalam bidang lapisan ganda (Tarahovsky, *et al.*, 2014). Ini akan membantu sel untuk dapat melindungi membran sel dari radikal bebas. Hal tersebut karena cincin hidroksil pada flavonoid dapat berperan sebagai *free radical scavenging* dengan mendonasikan hidrogen dan elektron ke radikal hidroksil, peroksil dan proksinitrit sehingga mampu menstabilkannya dan menghasilkan senyawa yang lebih stabil (Kumar S., *et al.*, 2013; Nijveldt R. J., *et al.*, 2001).

Kandungan tanin dalam ekstrak propolis merupakan kelompok senyawa fenol, flavonoid dan polifenol yang mempunyai kemampuan dalam menjaga membran sel. Ini disebabkan karena adanya interaksi antara residu asam galat tanin dan komponen kepala lipid sehingga permukaan bilayer tertutupi. Interaksi tersebut dapat mendukung adanya interaksi elektrostatik antara elektron-elektron pada cincin fenol dengan gugus $-N^+(CH_3)_3$ pada fosfatidilkolin atau sphingomyelin yang terdapat pada permukaan membran plasma. Adanya interaksi-interaksi tersebut akan menghambat terjadinya oksidasi lipid sehingga struktur, integritas dan permeabilitas membran sel terjaga (Tarahovsky, 2008).

Adanya Aktivitas senyawa-senyawa tersebut dapat mendukung kelangsungan hidup sel yang memungkinkan terjadinya peningkatan viabilitas dan proliferasi sel. Hal ini berhubungan dengan peran antioksidan dalam menjaga struktur dan integritas membran sel. Dengan terjaganya struktur dan integritas membran sel maka juga akan terjaga permeabilitas membran sel sehingga proses transportasi keluar masuknya materi untuk kehidupan sel dapat berjalan dengan baik dan maksimal. Proses ini menjadikan sel mampu menjalankan aktivitas biologisnya dengan baik dan optimum untuk tumbuh dan berkembang (Sumardi dan Marianti, 2007).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian tentang Pengaruh Ekstrak Propolis terhadap Perkembangan Sel Hepar Tikus (*Rattus novergicus*) secara *In Vitro* termasuk dalam penelitian eksperimental yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terbagi terdiri atas 7 perlakuan dan 3 kali ulangan sebagai berikut :

1. Perlakuan 1 (P1) : kultur sel hepar tikus tanpa pemberian ekstrak propolis.
2. Perlakuan 2 (P2) : kultur sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis 100 µg/mL.
3. Perlakuan 3 (P3) : kultur sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis 120 µg/mL.
4. Perlakuan 4 (P4) : kultur sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis 140 µg/mL.
5. Perlakuan 5 (P5) : kultur sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis 160 µg/mL.
6. Perlakuan 6 (P6) : kultur sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis 180 µg/mL.
7. Perlakuan 7 (P7) : kultur sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis 200 µg/mL.

3.2 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini terdiri dari 3 variabel, yaitu:

1. Variabel terikat : pertumbuhan sel hepar tikus meliputi konfluenitas dan viabilitas sel.
2. Variabel bebas : ekstrak propolis dengan konsentrasi berbeda, yaitu 100µg/mL, 120µg/mL, 140µg/mL, 160µg/mL, 180µg/mL dan 200 µg/mL.
3. Variabel kontrol : suhu, CO₂, alat dan bahan.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian Pengaruh Ekstrak Propolis terhadap Pertumbuhan Sel Hepar Tikus (*Rattus novergicus*) secara *In Vitro* dilakukan pada bulan Juli 2020 di Laboratorium Kultur Jaringan Hewan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.4.1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah inkubator CO₂ 5% (HERA Cell 150, ThermoScientific, Jepang), oven (Heraeus, ThermoScientific, Jerman), mikroskop inverted (Nikon Eclipse, Jepang), autoklaf (Daihan Labtech, Biomedic, Korea), Laminar Air Flow (LAF) (Vertical Air Flow, Alabtech, Korea), sentrifus (Labatuge 200, ThermoScientific, Jepang), filter milipore 0,22 µl, *cell countess*, vortex (tipe 37600, thermolyne, Malaysia), botol ulir (schott), cawan petri, tabung sentrifugasi 15 ml, erlenmeyer, timbangan analitik (Sartorius, finlandia), Tissue Culture Dish (TC dish), kulkas (Clasio XD7, Toshiba), gunting, rak tabung reaksi, aluminium foil, tabung reaksi, pinset, *nurse cap*, tisu, *yellow tip*, bunsen, mikropipet 100-1000 µl (BIORED), mikropipet 20-200 µl (BIORED), *blue tip*, corong kaca, masker, *handgloves*, kain sablon, spatula, korek api dan kertas label.

3.4.2. Bahan

Bahan yang digunakan meliputi hepar tikus umur 3-4 hari, Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma), media *Dulbeccos Modified Eagles Medium with High Glucose* (DMEM) (12100-038, Gibco, USA), Phosphat Buffer Saline (PBS, Gibco), streptomycin (meiji indonesia), penicillin (meiji indonesia), NaHCO₃ (himedia), HEPES (promega, USA), propolis, serum 10%, DMSO, NaCl 0,9%, DI steril, alkohol 70%, aquades, tripsin (sigma, Jerman), *trypan blue*, wipol, *handwash*, tipol dan sabun pencuci.

3.5 Prosedur Penelitian

Prosedur dalam penelitian ini meliputi preparasi alat, preparasi bahan dan pelaksanaan penelitian sebagai berikut :

3.5.1. Preparasi Alat

Sterilisasi Alat-alat yang digunakan dilakukan dengan merendam alat dalam air yang ditambah tipol dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah itu, sebanyak 21 kali alat dibilas menggunakan air dan pada bilasan terakhir menggunakan aquades. Kemudian

alat dikeringkan selama 1 jam di dalam oven bersuhu 60°C. Alat lalu dibungkus alumunium foil dan disterilisasi sesuai dengan bahan alat.

Sterilisasi kering dilakukan selama 3 jam pada alat yang berbahan kaca menggunakan oven bersuhu 121°C. Steriliasasi basah dilakukan selama 15 menit pada alat yang berbahan plastik dan tidak tahan panas dengan autoklaf bersuhu 121°C dan tekanan 15 atm. Alat yang telah disterilisasi basah dikeringkan dalam oven bersuhu 60° selama 1 jam. Alat-alat yang telah disterilisasi dimasukkan ke dalam LAF sebelum digunakan untuk dipapar sinar UV.

3.5.2. Preparasi Bahan

3.5.2.1. Pembuatan Ekstrak

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

3.5.2.2. Pembuatan Stok Ekstrak Propolis

Stok ekstrak propolis dibuat dengan mengencerkan ekstrak propolis sebanyak 100 mg ke dalam 100 ml larutan stok DMSO 5%. Diperoleh larutan stok ekstrak propolis dengan konsentrasi 1 mg/ml atau 1000 µg/mL. Larutan stok kemudian disimpan di dalam lemari pendingin.

3.5.2.3. Pembuatan Media DMEM

Pembuatan media stok DMEM terdiri dari 0,006 g penicillin, 0,28 g HEPES, 0,37 g NaHCO₃, 0,01 g streptomycin dan 1,35g DMEM yang dilarutkan dalam 100 mL DI steril dan dihomogenkan. Bahan yang telah homogen disaring menggunakan *syringe filter* 0,2 µm. Stok media kemudian disimpan dalam lemari pendingin hingga digunakan. Pembuatan media tersebut dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF).

3.5.2.4. Pembuatan Media Pencuci dan Media Kultur

Media kultur sel hepar tikus dibuat dari media stok DMEM yang ditambah 10% FBS. Dimasukkan 3 ml DMEM 10% masing-masing media tanam ke dalam cawan kultur. Sedangkan media pencuci dibuat dari 1 ml media DMEM 10%, 2 ml media DMEM 0% (tanpa FBS), antibiotik (penicillin dan streptomycin) dan NaCl 0,9%.

Media kultur dan media pencuci dibuat pada dilakukannya penanaman sel dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO₂.

3.5.3. Isolasi dan Kultur Sel Hepar

Tikus berusia 3-4 hari dibedah dibagian abdomen setelah didislokasi dan diambil organ heparnya. Hepar yang diperoleh dicuci dengan NaCl 0,9% sebanyak 3 kali. Kemudian hepar dicacah dan dihomogenkan dengan *syringe* 3 ml. Hepar yang sudah dicacah hingga homogen dimasukkan dalam tabung sentrifugasi.

Sentrifugasi dilakukan sebanyak 3 kali selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Larutan yang digunakan pada sentrifugasi pertama dan kedua adalah NaCl 0,9%, sedangkan larutan yang digunakan pada sentrifugasi ketiga adalah media DMEM 0%. Sentrifugasi tersebut akan menghasilkan supernatan dan pelet. Pada hasil sentrifugasi pertama dan kedua dibuang supernatan dan disisakan peletnya. Diambil dengan mikropipet jika terdapat endapan darah pada pellet agar tidak menjadi sumber kontaminan. Selanjutnya Pelet hasil sentrifugasi kedua ditambahkan media DMEM 0% sebanyak 2 ml dan disentrifugasi kembali. Hasil sentrifugasi ketiga dibuang kembali supernatan dan disisakan peletnya. Pelet kemudian ditambah dengan media pencuci DMEM 10% sebanyak 1 ml dan dihomogenkan. Diambil sebanyak 50 µl pellet dan dimasukkan pada masing-masing media tanam. Media tanam kemudian diinkubasi dan diganti setiap 3 kali sehari.

3.5.4. Pengamatan Hasil Kultur

Pengamatan pertumbuhan kultur sel hepar tikus dilakukan setelah hasil kultur konfluen 80% (Hampir memenuhi seluruh permukaan kultur) dengan parameter konfluenitas dan viabilitas sel.

3.5.4.1. Konfluenitas Sel

Konfluenitas sel diamati di bawah mikroskop inverted setelah diinkubasi. Penentuan konfluenitas sel dilakukan menggunakan software *ImageJ Fiji*. Software tersebut dapat digunakan untuk perhitungan konfluenitas dalam pertumbuhan sel. Hasil analisis dikenal sebagai *area fraction* yang mewakili jumlah luas permukaan yang ditutupi oleh sel dalam area yang difoto. Hasil tersebut akan menunjukkan nilai konfluenitas sel pada *TC dish* secara keseluruhan (Busschots S., *et al.*, 2015).

3.5.4.2. Viabilitas Sel

Langkah pertama sebelum pengamatan viabilitas sel adalah media kultur sel dibuang terlebih dahulu. Kemudian sel pada media dicuci sebanyak 2 kali menggunakan PBS yang selanjutnya ditambahkan 500 μ l tripsin-EDTA 0,25% dan dihomogenkan. Setelah homogen, selama 3 menit sel diinkubasi dengan suhu 37°C dan CO₂ 5%. Hasil tripsinasi diambil sebanyak 10 μ l untuk diwarnai dengan 10 μ l 0,4% *trypan blue*. Sel yang sudah ditambah dengan *trypan blue* diamati di bawah mikroskop untuk dapat diamati viabilitasnya.

Viabilitas sel dapat terlihat dari jumlah sel yang mati dan hidup. Sel yang hidup tidak akan terwarnai, sedangkan sel yang mati akan terwarnai oleh *trypan blue*. Pengamatan viabilitas sel menggunakan *cell countess* dengan cara diambil pellet sebanyak 5 μ l dan *trypan blue* sebanyak 5 μ l kemudian dihomogenkan. Diambil sebanyak 5 μ l pellet yang sudah bercampur dengan *trypan blue* dan dimasukkan ke dalam *chamber*. Perhitungan sel akan muncul pada layar *cell countess* dengan warna hijau untuk persentase sel hidup dan merah untuk persentase sel mati.

3.6. Analisis Data

Analisis data yang diperoleh dilakukan dengan uji *One Way ANOVA (Analysis of Variance)* untuk membandingkan ada tidaknya pengaruh perlakuan yang diberikan antara dua atau lebih kelompok data independen (Kusriningrum, 2012). Syarat agar data dapat dianalisis dengan *One Way ANOVA* adalah data yang diperoleh harus homogen dan terdistribusi normal. Apabila data tidak homogen dan terdistribusi normal, maka data ditransformasi terlebih dahulu.

Apabila hasil menunjukkan perbedaan perlakuan berbeda nyata $\alpha=5\%$, maka dilakukan uji lanjut yang berdasarkan nilai Koefisien Keragaman (KK). Apabila KK kecil (<5%) maka dilakukan uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ). Apabila nilai KK besar (10-20%) maka uji lanjut yang digunakan adalah Duncan. Apabila nilai KK sedang (5%-10%), maka dilakukan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT) (Hanafiah, 2010).

BAB IV PEMBAHASAN

Berkaitan dengan fungsi hepar sebagai pusat metabolisme nutrisi dan biotransformasi bahan kimia, sel hepar merupakan sel yang sering terpapar oleh bahan-bahan kimia (Jevas, 2017). Paparan tersebut dapat menyebabkan kerusakan pada sel hepar. Oleh sebab itu, untuk mencegah terjadinya kerusakan sel perlu adanya zat yang dapat melindungi sel hepar.

Propolis merupakan substansi lengket seperti lem yang dihasilkan oleh lebah madu dari resin tumbuhan. Dalam beberapa penelitian, propolis menunjukkan kemampuannya sebagai hepatoprotektif dan antioksidan (Ramadan, *et al.*, 2015; Almahdy, *et al.*, 2018). Hal ini karena propolis mengandung berbagai senyawa kimia seperti flavonoid, polifenol dan tanin. Kandungan-kandungan tersebut dibutuhkan dalam kultur untuk dapat mendukung pertumbuhan sel.

Dalam kultur *in vitro* selain memiliki karakteristik yang berbeda, sel juga memiliki respon yang berbeda-beda. Respon tersebut merupakan reaksi sel atas faktor eksternal yang masuk ke dalam sel. Secara *in vitro* respon tersebut dapat dilihat melalui berbagai parameter seperti konfluenitas dan viabilitas. Kedua parameter tersebut menggambarkan kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang dalam media kultur. Pada penelitian ini pemberian ekstrak propolis menunjukkan hasil yang berbeda terhadap konfluenitas dan viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*). Berikut ini merupakan hasil penelitian pengaruh ekstrak propolis terhadap pertumbuhan sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro*.

4.1 Pengaruh Ekstrak Propolis terhadap Konfluenitas Sel Hepar Tikus (*Rattus novergicus*) secara *In Vitro*

Konfluenitas merupakan tumbuh meratanya sel hingga menutupi cawan kultur. Menurut Sadiyah (2019) apabila sel telah mencapai konfluen, maka sel dalam media kultur telah memakai substrat dan sel saling berhubungan antara satu dengan yang lain. Dalam penelitian ini, hasil konfluenitas kultur sel hepar tikus yang diamati dan dianalisis menggunakan *ImageJ* berupa data rata-rata persentase dari masing-masing

perlakuan. Berikut ini tabel 4.1 merupakan rata-rata konfluenitas sel hepar tikus dengan dan tanpa pemberian ekstrak propolis secara *in vitro* yang dianalisis menggunakan *ImageJ*.

Tabel 4.1 Hasil rata-rata konfluenitas (%) sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro* yang dianalisis menggunakan *ImageJ* dengan dan tanpa pemberian ekstrak propolis

Perlakuan	Rerata konfluenitas (%) \pm SD
P1 (kontrol)	7.68 \pm 0.918
P2(100 μ g/mL)	10.11 \pm 2.648
P3 (120 μ g/mL)	9.80 \pm 2.552
P4 (140 μ g/mL)	12.23 \pm 0.722
P5 (160 μ g/mL)	11.48 \pm 2.797
P6 (180 μ g/mL)	11.48 \pm 2.797
P7 (200 μ g/mL)	9.43 \pm 2.303

Berdasarkan tabel 4.1 menunjukkan konfluenitas sel hepar tikus yang tidak diberi ekstrak propolis (P1) memiliki rata-rata sebesar 7.68 \pm 0.918. Konsentrasi ekstrak propolis yang memiliki nilai konfluenitas sel hepar tikus paling tinggi berturut-turut adalah P4 sebesar 12.23 \pm 0.722, P5 dan P6 sebesar 11.48 \pm 2.797, P2 sebesar 10.11 \pm 2.648, P3 sebesar 9.80 \pm 2.552 dan paling rendah P7 sebesar 9.43 \pm 2.303. Berdasarkan hasil tersebut dapat dilihat bahwa konfluenitas sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis memiliki rata-rata konfluenitas yang lebih tinggi disbanding dengan yang tidak diberi ekstrak propolis. Hal ini dapat diketahui bahwa ekstrak propolis dapat mempercepat proses konfluenitas sel hepar tikus secara *in vitro*. Propolis dapat mempercepat konfluenitas sel hepar karena mengandung senyawa-senyawa yang dapat membantu pertumbuhan sel.

Data rata-rata tersebut kemudian diuji secara statistik dengan SPSS v16.0. Pengujian yang dilakukan yaitu uji normalitas (*Kolmogorov-Smirnov*) dan uji homogenitas (*Levene test*). Hasil kedua pengujian tersebut dalam penelitian ini menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen. Data terdistribusi normal dan homogen karena memiliki nilai signifikansi 0,68 dan 0,27. Kedua hasil tersebut bernilai lebih besar dari 0,05 (Lampiran 2). Dengan demikian data tersebut memenuhi

syarat untuk dianalisis secara statistik menggunakan *one way* ANOVA. Berikut ini tabel 4.2 merupakan hasil analisis konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus novvergicus*) dengan dan tanpa ekstrak propolis.

Tabel 4.2 Hasil analisis konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus novvergicus*) yang diberi ekstrak propolis selama 3 hari menggunakan *one way* ANOVA.

SK	Db	JK	KT	F	Sig
Perlakuan	6	61.069	10.178	1.987	0.113
Galat	21	107.566	5.122		
Total	27	168.636			

Hasil analisis statistik konfluenitas sel hepar tikus tanpa dan dengan ekstrak propolis memperoleh nilai signifikansi sebesar 0.113. Berdasarkan hasil tersebut nilai signifikansi lebih besar dari 0.05, sehingga dapat disimpulkan bahwa H0 diterima dan H1 ditolak yang artinya secara statistik ekstrak propolis tidak berpengaruh secara nyata terhadap konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus novvergicus*) secara *in vitro*. Hal tersebut dapat disebabkan karena nilai konfluenitas yang dihasilkan memiliki rentang nilai yang rendah antara perlakuan satu dengan yang lain sehingga secara statistik dianggap tidak berbeda secara nyata. Dengan demikian hasil konfluenitas sel yang diperoleh tidak dapat diuji lanjut karena menunjukkan tidak berpengaruh secara nyata.

Perkembangan sel dalam kultur *in vitro* menurut Decker *et al.*, (2000) akan mengalami pertumbuhan yang cepat apabila terdapat faktor pertumbuhan dan senyawa yang dapat menyeimbangkan kondisi sel dalam media. Kondisi sel yang tidak seimbang dapat menyebabkan sel menjadi lambat untuk mencapai konfluen. Penambahan ekstrak propolis pada kultur sel hepar tikus menunjukkan hasil yang tidak berpengaruh terhadap konfluenitas sel. Hal tersebut dapat disebabkan karena faktor internal dan eksternal.

Pada penelitian ini, nilai viabilitas sel hepar tikus adalah sebesar 15%. Li, *et al.*, (2009) memaparkan bahwa sel yang akan ditanam dalam media kultur harus memiliki nilai viabilitas sebesar 90%. Selisih nilai viabilitas sel yang akan ditanam dengan sel

yang harus ditanam adalah sebesar 75%. Sel yang akan ditanam pada penelitian ini tergolong rendah sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan sel.

Tidak berpengaruhnya ekstrak propolis terhadap konfluenitas sel hepar tikus secara *in vitro* pada penelitian ini juga dapat disebabkan karena kualitas bahan yang digunakan. Pada penelitian ini, propolis yang digunakan adalah *raw propolis* yang diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% yang belum teruji kandungannya. Menurut penelitian Chan, *et al.*, (2012) meskipun propolis pada dasarnya memiliki kandungan utama senyawa polifenol, akan tetapi komposisi senyawa kimia propolis bervariasi tergantung pada kondisi geografisnya. Hal tersebut akan mempengaruhi kemampuan propolis yang dalam penelitian ini sebagai antioksidan dan stimulator sel. Penelitian Rosyidi, dkk (2018) menunjukkan bahwa dengan spesies lebah yang sama, propolis yang diperoleh dari Kota Batu dan Mojokerto memiliki nilai fenolik, flavonoid dan aktivitas antioksidan yang berbeda.

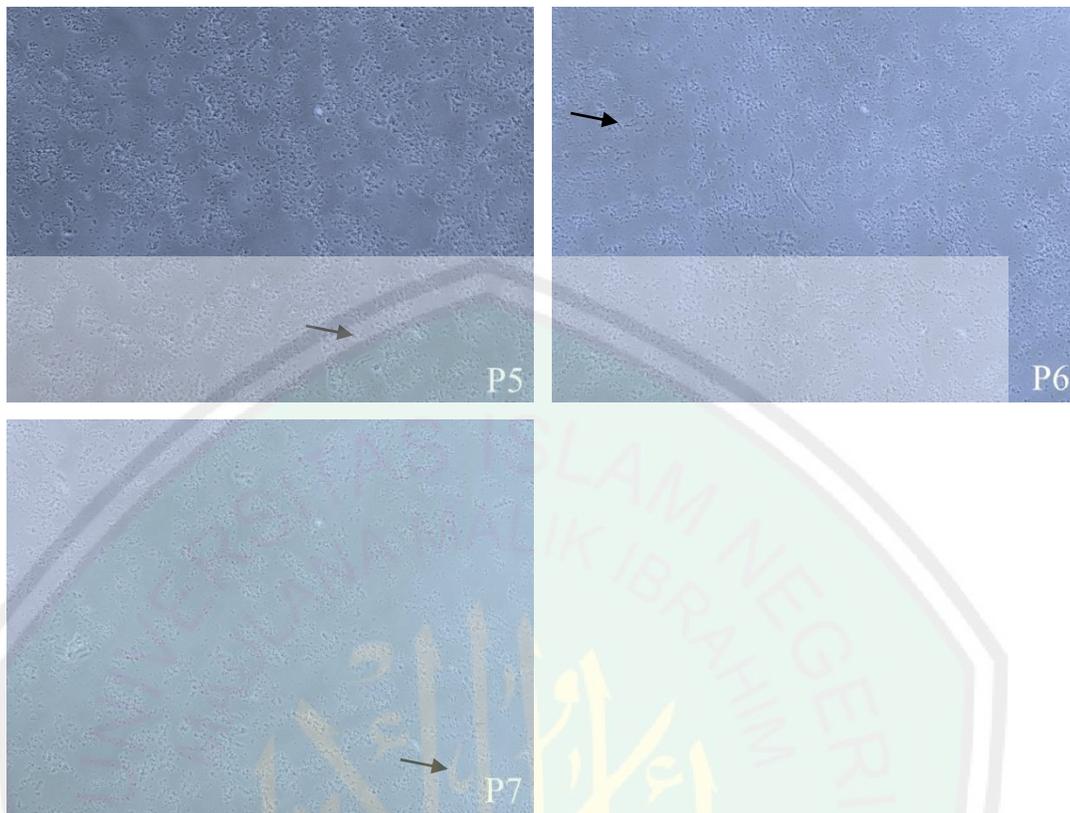
Selain itu, terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi konfluenitas kultur sel seperti kecepatan tumbuh dan kepadatan sel yang ditanam serta kepadatan sel yang dapat menghambat proliferasi sel (Trenggono, 2009). Konsentrasi sel yang ditanam dapat mempengaruhi kepadatan penanaman dan kecepatan tumbuh sel. Pertumbuhan dan perkembangan sel akan membutuhkan waktu yang lebih lama apabila konsentrasi sel yang ditanam terlalu sedikit.

Freshney (2005) memaparkan bahwa pada multiwell 24 yang memiliki luas permukaan 2 cm^2 , konsentrasi sel yang harus ditanam berkisar 2×10^3 hingga 2×10^5 sel/mL. Pada penelitian ini sel hepar ditanam dalam *culture dish* yang berukuran 35 mm dengan luas permukaan 9 cm^2 sehingga konsentrasi sel yang harus ditanam berkisar 9×10^3 hingga 9×10^5 sel/mL. Akan tetapi pada penelitian ini konsentrasi sel yang ditanam sebesar $2,20 \times 10^7$ sel/mL dalam *culture dish* 35 mm. Konsentrasi tersebut melebihi kisaran konsentrasi sel yang harus ditanam pada *culture dish* 35 mm sehingga persaingan sel untuk memperoleh nutrisi dan ruang untuk tumbuh cukup tinggi. Persaingan tersebut dapat memungkinkan terjadinya kematian sel karena nutrisi dan ruang untuk tumbuh tidak sepadan dengan jumlah sel yang ada. Menurut Krampe dan Mohamed (2010) kepadatan sel yang tinggi dalam kultur dapat berdampak pada

keterbatasan transportasi nutrisi, oksigen, akumulasi produk samping metabolisme dan peningkatan osmolaritas. Lincoln dan Michael (1998) menjelaskan bahwa sel-sel yang sudah mati dan tetap berada didalam media kultur dapat menjadi sumber kontaminan dan mengganggu proliferasi sel yang masih hidup.

Pengaruh ekstrak propolis terhadap konfluenitas sel hepar tikus secara *in vitro* juga dapat dilihat dari gambar pengamatan kultur sel hepar tikus. Gambar pengamatan tersebut menunjukkan morfologi dan penyebaran sel hepar tikus dalam cawan kultur dengan dan tanpa ekstrak propolis. Berikut ini gambar 4.1 merupakan gambar pengamatan konfluenitas kultur sel hepar tikus dengan dan tanpa ekstrak propolis.





Gambar 4.1. Kultur sel hepar tikus dengan dan tanpa ekstrak propolis yang diamati pada hari ke-3 menggunakan mikroskop *inverted* (200x). P1: (tanpa ekstrak propolis), P2: (100 µg/ml), P3: (120 µg/ml), P4: (140 µg/ml), P5: (160 µg/ml), P6: (180 µg/ml) dan P7: (200 µg/ml).

Berdasarkan gambar pengamatan 4.1 di atas, dapat dilihat pada P1 (tanpa ekstrak propolis) dan P2,P3,P4,P5,P6 dan P7 (dengan ekstrak propolis) cenderung memiliki kepadatan dan persebaran sel yang hampir sama rata. Oleh karena ekstrak propolis yang diberikan menunjukkan kepadatan dan persebaran sel yang hampir sama sehingga secara statistik dianggap tidak berbeda secara nyata.

Penampakan hasil konfluenitas sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis pada hari ke-3 juga memiliki hasil yang hampir sama dengan hasil pada hari ke-6. Hasil tersebut dapat dilihat pada gambar pengamatan hari ke-3 dan hari ke-6 dari banyaknya sel yang sudah berkoloni meskipun terdapat beberapa *single cell* dan sedikit terbentuk juluran-juluran sel (Lampiran 3). Dalam penelitian Kumar *et al.*, (2002) sel hepar tikus konfluen setelah hari ke-5 meskipun tidak disebutkan persentasenya. Hal ini diketahui

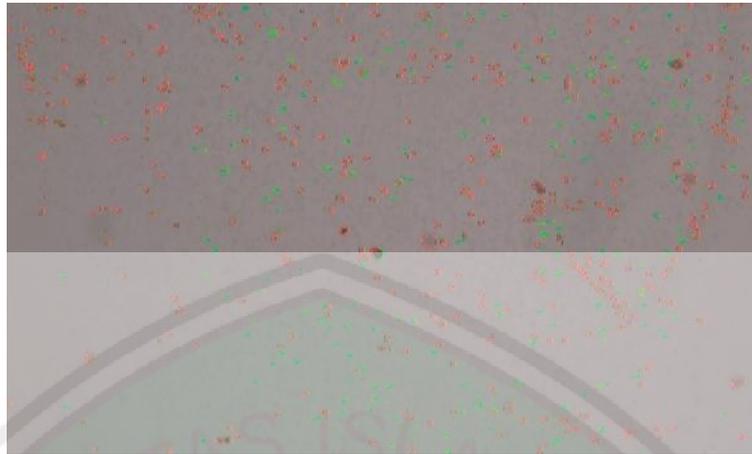
dengan banyaknya juluran-juluran sel yang terbentuk pada permukaan substrat. Sedangkan dalam penelitian ini, sejak melekatnya sel pada hari ke-3 hingga hari ke-6 sedikit juluran-juluran sel yang terbentuk.

Secara *in vitro* lingkungan pertumbuhan sangat berpengaruh terhadap sel. Sel akan menyesuaikan diri sebagai respon terhadap sinyal yang ada dalam lingkungannya (Berg, *et al.*,2002). Pada kondisi seperti ini, selain adanya respon sel untuk mempertahankan hidupnya sebagai akibat adanya kompetisi antar sel, sel juga merespon adanya faktor eksternal yang masuk ke dalam sel yaitu ekstrak propolis. Hal ini menjadikan kerja sel dalam merespon lebih berat sehingga akan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan sel termasuk terbentuknya ekspansi sel yang lebih lama. Akan tetapi hal ini masih perlu dikonfirmasi kembali.

4.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (*Rattus Novergicus*) secara *In Vitro*.

Viabilitas merupakan kemampuan sel dalam mempertahankan hidupnya untuk tumbuh dan berkembang. Browne dan Mohamed (2011) memaparkan bahwa dalam kultur sel mamalia, viabilitas yang optimum sangat penting untuk menjaga kualitas kultur. Apabila jumlah sel yang hidup semakin banyak dibandingkan dengan jumlah sel yang mati maka dapat menunjukkan kemampuan pertumbuhan dan perkembangan sel yang tinggi (Takeuchi, 2014).

Pada penelitian ini, konsentrasi sel yang ditanam sebesar 2.70×10^7 sel/ml dengan viabilitas sebesar 15%. Perhitungan viabilitas dilakukan pada hari ke-6 dengan menggunakan *cell countess*. Pada *cell countess* akan terlihat penampakan sel yang ditandai dengan warna hijau dan merah. Berikut ini gambar 4.2 merupakan gambar perhitungan viabilitas sel menggunakan *cell countess*



Gambar 4.2. Viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) dengan pewarnaan *trypan blue* 0,4% menggunakan *countess*; hijau: sel hidup, merah: sel mati.

Pengamatan viabilitas dengan *cell countess* menunjukkan bahwa sel yang hidup terlingkari dengan warna hijau, sedangkan sel yang mati terlingkari dengan warna merah. Selain itu, pengamatan tersebut juga menghasilkan data berupa rata-rata persentase sel yang hidup dan sel yang mati pada tiap-tiap perlakuan. Berikut ini tabel 4.3 merupakan rata-rata persentase viabilitas sel hepar tikus dengan dan tanpa ekstrak propolis.

Tabel 4.3 Rata-rata viabilitas (%) sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) dengan dan tanpa ekstrak propolis secara *in vitro* pada hari ke-6

Perlakuan	Rerata viabilitas (%) \pm SD
P1 (0 $\mu\text{g/mL}$)	24.75 \pm 2.63
P2 (100 $\mu\text{g/mL}$)	50.50 \pm 21.23
P3 (120 $\mu\text{g/mL}$)	43.25 \pm 9.74
P4 (140 $\mu\text{g/mL}$)	49.00 \pm 10.89
P5 (160 $\mu\text{g/mL}$)	37.50 \pm 5.97
P6 (180 $\mu\text{g/mL}$)	38.50 \pm 8.10
P7 (200 $\mu\text{g/mL}$)	35.00 \pm 5.83

Pada tabel 4.3 menunjukkan bahwa viabilitas sel hepar tikus yang tidak diberi ekstrak propolis (P1) memiliki rata-rata sebesar 24.75 \pm 2.63. Konsentrasi pemberian ekstrak propolis yang memiliki nilai viabilitas sel hepar tikus paling tinggi berturut-turut adalah P2 sebesar 50.50 \pm 21.23, P4 sebesar 49.00 \pm 10.89, P3 sebesar 43.25 \pm

9.74, P6 sebesar 38.50 ± 8.10 , P5 sebesar 37.50 ± 5.97 dan yang paling rendah P7 sebesar 35.00 ± 5.83 . Berdasarkan hasil tersebut dapat dilihat bahwa viabilitas sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis memiliki rata-rata viabilitas yang lebih tinggi disbanding dengan yang tidak diberi ekstrak propolis. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak propolis dapat meningkatkan viabilitas sel hepar tikus secara *in vitro*.

Data rata-rata yang diperoleh kemudian diuji secara statistik dengan SPSS v16.0. Pengujian yang dilakukan adalah uji normalitas (*Kolmogorov-Smirnov*) dan uji homogenitas (*Levene test*). Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen. Data terdistribusi normal dan homogen karena mempunyai nilai signifikansi 0,85, dan 0,09. Kedua nilai tersebut bernilai lebih besar dari 0,05 (Lampiran 3). Dengan demikian data memenuhi syarat untuk dianalisis secara statistik menggunakan *one way* ANOVA. Berikut ini tabel 4.4 hasil analisis ANOVA *one way* viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novvergicus*) yang diberi ekstrak propolis pada hari ke-6.

Tabel 4.4 hasil analisis ANOVA *one way* viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novvergicus*) dengan dan tanpa ekstrak propolis pada hari ke-6.

SK	Db	JK	KT	F	Sig
Perlakuan	6	1870.2	311.70	2.70	0.04
Galat	21	2420.5	115.26		
Total	27	4290.2			

Berdasarkan tabel 4.4 dapat diketahui nilai sig lebih kecil dari 0.05, yaitu 0.04 < 0.05, sehingga H1 diterima dan H0 ditolak yang artinya ekstrak propolis berpengaruh nyata terhadap viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novvergicus*) secara *in vitro*. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak propolis berpengaruh terhadap viabilitas kultur sel hepar tikus. Oleh karena hasil yang diperoleh berpengaruh secara nyata maka data harus diuji lanjut.

Uji lanjut yang dilakukan ditentukan berdasarkan nilai keragaman koefisien (KK) yang diperoleh. Nilai keragaman koefisien yang diperoleh adalah 26%. Menurut Hanafiah (2016) jika nilai KK besar (pada kondisi homogen minimal 10% atau pada

kondisi heterogen 20%) maka diuji lanjut menggunakan uji Duncan (DMRT). Berikut tabel 4.4 merupakan hasil uji Duncan pada taraf signifikansi 5%.

Tabel 4.5 Uji Duncan pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro* pada hari ke-6.

Perlakuan	Rata-rata viabilitas (%) \pm SD	Notasi (5%)
P1 (0 μ g/mL)	24.75 \pm 2.63	a
P2 (100 μ g/mL)	50.50 \pm 21.23	b
P3 (120 μ g/mL)	43.25 \pm 9.74	b
P4 (140 μ g/mL)	49.00 \pm 10.89	b
P5 (160 μ g/mL)	37.50 \pm 5.97	ab
P6 (180 μ g/mL)	38.50 \pm 8.10	ab
P7 (200 μ g/mL)	35.00 \pm 5.83	ab

Berdasarkan tabel 4.5 dapat diketahui bahwa pengaruh ekstrak propolis terhadap sel hepar tikus pada perlakuan P5 (160 μ g/mL), P6(180 μ g/mL) dan P7 (200 μ g/mL) memiliki notasi yang sama dengan P1 (0 μ g/mL). Artinya pada perlakuan P1, P5, P6 dan P7 memiliki pengaruh yang sama (tidak berbeda nyata). Pada perlakuan P2(100 μ g/mL), P3 (120 μ g/mL) dan P4 (140 μ g/mL) juga memiliki pengaruh yang sama dengan P5, P6 dan P7. Akan tetapi P2, P3 dan P4 memiliki pengaruh yang berbeda nyata dengan P1 yang ditandai dengan notasi b dan a. Hal ini menunjukkan perbedaan pengaruh ekstrak propolis yang signifikan ditunjukkan oleh notasi pada ketiga perlakuan tersebut.

Perlakuan P2 merupakan perlakuan yang memiliki nilai pengaruh tertinggi dalam meningkatkan viabilitas sel hepar tikus secara *in vitro* yaitu sebesar 50,50 \pm 21.23 % dengan konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan dengan P3 dan P4. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak propolis sebesar 100 μ g/mL dapat meningkatkan viabilitas sel hepar tikus dibandingkan P1 (tanpa ekstrak propolis). Selisih nilai viabilitas sel hepar tikus antara P1 dan P2 adalah sebesar 25.75%.

Tingginya nilai viabilitas pada perlakuan P2 dibanding perlakuan yang lain dapat dikarenakan adanya kandungan Flavonoid, tanin dan polifenol yang dapat menjaga integritas membran sel dari kerusakan sehingga metabolisme sel dapat berjalan secara optimal. Hal ini berkaitan dengan potensinya sebagai antioksidan dan

stimulator sel. Integritas membran sel sangat dibutuhkan untuk dapat mempertahankan keseimbangan sel. Menurut Sumardi dan Marianti (2007) dengan terjaganya struktur dan integritas membran sel maka permeabilitas membran sel juga akan terjaga sehingga proses transportasi keluar masuknya materi untuk kehidupan sel dapat berjalan dengan baik dan maksimal dalam mendukung pertumbuhan dan perkembangan sel.

Senyawa yang dapat berperan sebagai antioksidan dalam propolis adalah flavonoid, polifenol dan tanin. Flavonoid dapat berperan sebagai *free radical scavenging* sehingga mampu melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas. Flavonoid menstabilkan radikal bebas dengan mendonasikan hidrogen dan elektron ke radikal hidroksil, peroksil dan proksinitrit (Kumar S., *et al.*, 2013; Nijveldt R. J., *et al.*, 2001). Reaksi antara flavonoid dan senyawa radikal tersebut dapat menghasilkan senyawa yang lebih stabil dan dapat bertahan lebih lama hingga bereaksi dengan produk non radikal (Widayati, 2019).

Selain flavonoid, tanin dalam ekstrak propolis yang merupakan kelompok senyawa flavonoid, fenol dan polifenol juga dapat menjaga keutuhan membran sel. Tanin menjaga membran sel dengan adanya interaksi antara residu asam galat tanin dan komponen kepala lipid pada permukaan bilayer. Hal tersebut dapat menghambat terjadinya oksidasi lipid (Tarahovsky, 2008). Dengan kemampuan flavonoid dan tanin tersebut struktur, integritas dan permeabilitas membran sel terjaga sehingga metabolisme sel dapat berjalan secara optimal dan dapat meningkatkan viabilitas sel.

Dalam ekstrak propolis terdapat kandungan polifenol yaitu *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE) yang merupakan turunan dari *Caffeic acid* (Ozen, *et al.*, 2004). Menurut Li, *et al.*, (2015) senyawa golongan *Caffeic acid* dapat mengaktifkan *extracellular signal regulated kinase* (ERK). Aktivasi ERK dapat mentransduksi sinyal faktor pertumbuhan yang menginduksi diferensiasi atau proliferasi sel yang menghasilkan respon stres, pertumbuhan *cell arrest* dan apoptosis. Jannah (2019) dan Guegan J.P. *et al.*, (2012) memaparkan bahwa ERK yang teraktivasi akan memfosforilasi banyak target termasuk faktor transkripsi yang akan menginduksi berbagai protein dalam siklus sel. Faktor transkripsi yang terfosforilasi kemudian akan mengaktifkan gen yang menginduksi siklus sel melalui *Epidermal Growth Factor*

(EGF). Dengan meningkatnya ekspresi gen tersebut sel akan memasuki siklus sel, melakukan mitosis dan proliferasi sel akan meningkat sehingga potensi terjadinya apoptosis berkurang. Apabila potensi terjadinya apoptosis berkurang, maka diharapkan viabilitas sel akan bertambah.

Hasil diatas menunjukkan bahwa produk yang dihasilkan oleh lebah memiliki manfaat seperti antioksidan dan stimulator sel. Allah menyisipkan manfaat tersebut pada lebah yang tersirat dalam Al-Qur'an pada surat An-Nahl ayat 69 yang berbunyi:

ثُمَّ كُلِي مِن كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِّلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ^{٦٩}

“Kemudian makanlah dari segala (macam) buah-buahan lalu tempuhlah jalan Tuhanmu yang telah dimudahkan (bagimu). Dari perut lebah itu keluar cairan (madu) yang bermacam-macam warnanya, didalamnya terdapat obat yang menyembuhkan bagi manusia. Sungguh pada demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berpikir.”

Kalimat *فِيهِ شِفَاءٌ لِّلنَّاسِ* yang artinya *“didalamnya terdapat obat yang menyembuhkan bagi manusia”*. Menurut Tafsir Al-Qurtubi (2008) kata *hi* dalam kalimat tersebut kembali pada kata *شَرَابٌ*. Dengan kata lain, terdapat manfaat bagi manusia pada cairan yang dihasilkan oleh lebah madu. Lebah tidak hanya menghasilkan madu, tetapi juga menghasilkan *royal jelly*, *bee wax*, *bee pollen* dan propolis yang juga memiliki manfaat. Adanya manfaat tersebut tersirat dalam Al-Quran Surat Ali-Imran ayat 191 yang berbunyi:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَٰذَا بَطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ^{١٩١}

(Yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka.

Menurut tafsir Ibnu Katsir (2004) kata *بَطِلًا* dalam ayat tersebut menjelaskan keadaan bahwa Allah tidak menciptakan suatu keadaan dengan sia-sia. Dengan kata

lain segala sesuatu yang diciptakan Allah baik di bumi dan di langit tidak ada yang sia-sia. Seperti halnya Allah menciptakan propolis yang memiliki manfaat bagi manusia.

Berdasarkan tabel 4.3 di atas menunjukkan bahwa rata-rata viabilitas sel hepar tikus dengan konsentrasi ekstrak sebesar 200 µg/ml pada perlakuan P7 menurun menjadi 35%, akan tetapi tidak lebih rendah dari kontrol (tanpa ekstrak propolis) yaitu 24.75%. Penelitian Banskota (2000) melaporkan bahwa konsentrasi ekstrak propolis sebesar 200 µg/ml dapat menurunkan viabilitas sel hepar tikus secara *in vitro*. Hal tersebut dikarenakan kandungan ester dari *cinnamic acid* yang berperan sebagai antioksidan yang kuat dalam propolis. Agca (2017) memaparkan bahwa konsentrasi antioksidan yang tinggi mampu menghambat sinyal molekuler, perubahan kondisi redoks sel, memodulasi aktivitas onkogen yang mendorong apoptosis sel. Menurut Lincoln dan Michael (1998) menjelaskan bahwa sel-sel yang mati dan tetap berada pada media kultur dapat menjadi sumber kontaminan dan mengganggu proliferasi sel yang masih hidup. Oleh sebab itu, pada konsentrasi ekstrak propolis sebesar 200 µg/ml viabilitas sel hepar menurun.

Walaupun propolis yang ditambahkan dalam media kultur memiliki kemampuan sebagai antioksidan akan tetapi penggunaan propolis tidak boleh berlebihan karena akan mengganggu pertumbuhan sel. Hal ini selaras dengan firman Allah dalam Surat Al A'raf (7) ayat 31 yang berbunyi:

يٰۤاٰدَمُ خُذْ زِينَتَكَ مَعَكَ عِنْدَ كُلِّ مَسْجِدٍ وَكُلْ وَاشْرَبْ وَلَا تُسْرِفْ ۗ إِنَّهُ لَا يُحِبُّ الْمُسْرِفِيْنَ ۝۳۱

“Hai anak Adam, pakailah pakaianmu yang indah di setiap (memasuki) mesjid, makan dan minumlah, dan janganlah berlebih-lebihan. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang berlebih-lebihan.”

Tafsir Al-Misbah (2002) menjelaskan bahwa penggalan akhir ayat dalam surat Al A'raf (7) ayat 31 menjadi salah satu prinsip menyangkut kesehatan yang diletakkan agama dan diakui oleh para ilmuwan. Menurut Al-Jazairi (2007) kalimat وَلَا تُسْرِفُوا yang artinya “jangan berlebih-lebihan” berasal dari kata اسرف yang termasuk dalam kata sifat. Kata tersebut dapat diartikan sikap yang berlebihan (melebihi batas dari yang seharusnya) dalam segala hal. Perintah tersebut tidak hanya berlaku untuk makan dan

minum saja, akan tetapi dalam segala hal. Terkait dengan penelitian ini, ekstrak propolis yang diberikan ke dalam media kultur dapat menjadi sumber nutrisi bagi sel hepar tikus dalam mendukung pertumbuhan sel hepar secara *in vitro*. Akan tetapi apabila konsentrasi ekstrak terlalu tinggi (berlebihan) maka dapat ekstrak tersebut bersifat toksik terhadap sel hepar sehingga menghambat pertumbuhan dan perkembangan sel. Dalam ayat tersebut perintah makan dan minum tidak berlebihan (melebihi batas) merupakan tuntunan yang harus disesuaikan dengan kondisi setiap orang (Al-Misbah, 2002). Sama halnya dengan kondisi tiap orang yang berbeda-beda, setiap sel dalam tubuh manusia juga memiliki kemampuan merespon yang berbeda-beda. Menurunnya viabilitas sel pada konsentrasi 200 µg/ml dapat menjadi batas kemampuan sel hepar dalam merespon ekstrak propolis yang diberikan sehingga terjadi penurunan viabilitas sel.

Ekstrak propolis yang ditambahkan dalam media kultur DMEM dengan FBS 10% dapat berperan dalam meningkatkan viabilitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vitro*. Hal tersebut berkaitan dengan kandungan bahan aktif seperti polifenol, flavonoid dan tanin yang dapat menjaga integritas membran sel dan memicu terjadinya proliferasi sel. Terjaganya integritas sel dan tingkat proliferasi sel yang tinggi akan dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan sel secara optimal

Hasil penelitian yang diperoleh, tabel 4.3 menunjukkan bahwa terdapat peningkatan nilai rata-rata viabilitas sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis pada konsentrasi 100 µg/ml sebesar 50.5% dan mulai mengalami sedikit penurunan pada konsentrasi 120 µg/ml menjadi 43.25%. Akan tetapi nilai rerata viabilitas sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis pada konsentrasi 140 µg/ml meningkat kembali menjadi 49 %, pada konsentrasi 160 µg/ml sebesar 37.5%, pada konsentrasi 180 µg/ml sebesar 28.5% dan pada konsentrasi 200 µg/ml sebesar 30.66%. Nilai rata-rata viabilitas sel yang cenderung naik dan turun tersebut dimungkinkan karena nilai viabilitas sebelum sel ditanam tergolong rendah sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan sel dalam media kultur. Li, *et al.*, (2009) memaparkan bahwa kualitas sel yang baik sebelum ditanam harus memiliki nilai viabilitas sekitar 90%. Akan tetapi dalam penelitian ini, nilai viabilitas sel sebelum ditanam sebesar 15%. Selisih nilai

viabilitas sel yang ditanam pada penelitian ini dengan sel yang harus ditanam adalah sebesar 75%. Dengan demikian, sel yang ditanam pada penelitian ini memiliki viabilitas yang tergolong rendah. Apabila viabilitas sel yang ditanam rendah, maka akan mempengaruhi pertumbuhan sel.



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak propolis tidak berpengaruh terhadap konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro*, akan tetapi berpengaruh terhadap viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro*.
2. Konsentrasi ekstrak propolis yang berpengaruh terhadap viabilitas sel hepar tikus (*Rattus novergicus*) secara *in vitro* dengan nilai tertinggi diperoleh pada 100 µg/mL.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat disarankan:

1. Sel yang akan dikultur harus memiliki viabilitas $\pm 90\%$ sehingga diperoleh nilai viabilitas yang lebih baik.
2. Perlu dilakukan uji kandungan ekstrak propolis untuk dapat memperoleh informasi senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya.
3. Perlu ditambahkan parameter *Population Double Time* (PDT) untuk dapat mengetahui tingkat proliferasi sel hepar tikus yang diberi ekstrak propolis.

DAFTAR PUSTAKA

- Agca, C. A; A. A. Tykhomyrov ; G. Baydas dan V. S. Nedzvetsky. 2017. Effect of a Propolis Extract on The Viability of and Level of Cytoskeletal and Regulatory Proteins in Rats Brain Astrocytes: an *In Vitro* Study. *Neurophysiology*. 49 (4).
- Albert, B. D. 2002. *cell Communication in Molecular Biology of The Cell, edisi 4*. New York: Garland Publishing Inc.
- Al-Jazairi, Syekh Abu Bakar Jabir. 2007. *Tafsir Al-Qur'an Al-Aisar*. Jakarta: Darus Sunnah.
- Al-Jumaily, Essam F.; Raghad S. Al-Obaidiand; Jasim M. Abdulla. 2014. Hepatoprotective Activity of Flavonoids Purified and Ethanolic Extract from Iraqi Propolis Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage in Male Mice. *IOSR journal of pharmacy*. 4.3.
- Alkis, H.E; A. Kuzhan; A. Dirier; M. Tarakcioglu; E. Demir; E. Saricicek; T. Demir; A. Ahlatci; A. Demirci; K. Cinar; S. Taysi. 2015. Neuroprotective Effect 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).
- Al-Mahalli, Jalaludin Muhammad Ibnu Ahmad dan Jalaludin Abdurrahman Ibnu Abu Bakar As-Suyuthi. Tanpa Tahun. *Tafsir Al-Qur'an Al-'Adzim*. Darul Ihya', Indonesia.
- Almahdy, Nur Azlin, Helmi Arifin dan Harrizul Rivai. 2018. Propolis Hepatoprotector Effect on Liver Damage of White Mice Induced by Valproic Acid. *Innternational Journal of Pharmaceutical Sciences and Medicine*.3 (8).
- Al Qurthubi, Syekh Imam. 2008. Diterjemahkan oleh Asmuni. *Tafsir Al Qurthubi Jilid 10*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Andiana, Mashita; Yanita Rachmawati, M.Sc; Drh. Sri Susila Andayani. 2017. Kultur Sel Baby Hamster Kidney (BHK) Menggunakan Media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). *Journal of Tropical Biology*. 1 (1).
- Babinska, I.; K.Kleczek; W. Makowski; J. Szarek. 2013. Effect of Feed and Supplementation with Propolis on Liver and Kidney Morphology in Broiler Chickens. *Pak Vet J*. 33 (1).
- Bankova, V.S., S. L. de Castro dan M.C. Marcucci. 2000. Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin. *Apidologie*. 31 (3-15).
- Banskota, Arjun H., Yasuhiro Tezuka, I Ketut Adnyana, Kiyoshi Midorikawa, Katsumichi Matsushige, Dejair Message, Alfredo A. G., Huertas, Shigetoshi Kadota. 2000. Cytotoxic, Hepatoprotective and Free Radical Scavenging Effect of Propolis from Brazil, Peru, The Netherland and China. *Journal of Ethnopharmacology*. 72: 239-246.
- Barra, Gabriela Valenzuela, Consuelo Castro, Catalina Figueroa, Andres Barriga, Ximena Silva, Beatriz de las Heras, Sonsoles Hortelano dan Carla Delporte. 2015. Anti-inflammatory Activity and Phenolic Profile of Propolis from Two Locations in Region Metropolitana de Santiago Chile. *Journal of Ethnopharmacology*. 168 (37-44).

- Berg, Jeremy M., John L.T. dan Lubert S. 2002. *Biochemistry 5th Edition*. New York: W H Freeman.
- Bolt, M. W. 2001. Effect of Vitamin E on Cytotoxicity of Amidorane and N-desethylamidarone in Isolated Hamster Lung Cell. *Toxicology*.166 (3).
- Browne, Susan M dan Mohamed Al-Rubeai. 2011. Defining Viability in Mammalian Cell Cultures. *Biotechnol Lett*. DOI 10.1007/s10529-011-0644-2.
- Budiono, A. 2000. Teknik Aseptik dan Upaya Mencegah Kumanisasi pada Kultur Jaringan. Modul Pelatihan Dosen Universitas Bogor.
- Busschots, Steven; Sharon O' Toole; John J. O'Leary; Britta Stordal. 2014. Non-Invasive and Non Destructive Measurements of Confluence in Cultured Adherent Cell Lines. *G Model MEX*. 48 (1-6).
- Campbell, Neil. 2008. *Biologi Jilid 1*. Jakarta: Erlangga.
- Chan, Godfrey Chi-Fung; Ka-Wai Cheung; Daniel Man-Yuen Sze. 2012. The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis. *Clinic Rev Allerg Immunol*. DOI 10.1007/s12016-012-8322-2.
- Decker, E. A., C. Fautsman dan C.J Lopez-Bote. 2000. *Antioxidant in Muscle Food*. Canada: John Willey and Sons, Inc.
- Dianat, Noushin; Clara S.; Ludovic V.; Anne W. dan Anne Dubbart-Kupperschmitt. 2013. Human Pluripotent Stem Cells for Modelling Human Liver Diseases and Cell Therapy. *Current Gene Therapy*. 13:120-132.
- Eidi, Akram; Pejman Mortazavi; Maryam Bazargan dan Jalal Zaringhalam. 2012. Hepatoprotective Activity of Cinnamon Ethanolic Extract Against CCl₄-Induced Liver Injury in Rats. *EXCLI Journal*. 11:495-507.
- Fausto, N. A. D. Laird dan E. M. Webber. 1995. Role of Growth Factors and Cytokines in Hepatic Regeneration. *The FASEB Journal*. 9: 1527-1536.
- 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.
- Freshney. R. Ian. 2005. *Culture Of Animal Cells : A Manual of Basic Technique and Specialized Applications Sixth Edition*. USA : A John Wiley and Sons.
- Gorecka, Anna Kurek; Anna Rzepecka-Stojko; Michal Dorecki; Jerzy Stojko; Marian Sosada dan Grazyna Swierczek- Zieba. 2014. Review Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. *Molecules*. 19:78-101.
- Grunberger, J; R.Banerjee; K.Eisinger. 1988. Preferential Cytotoxicity on Tumor Cells by Caffeic Acid Phenethyl Ester Isolated from Propolis. *Experientia*. 18 (1).
- Guegan, Jean P., Christophe F. dan Georges Baffet. 2012. The MAPK MEK1/2 ERK ½ Pathway and Its Implication in Hepatocyte Cell Cycle Control. *International Journal of Hepatology*. DOI 10.1155/2012/328372.
- Halim, Danny, dr ; Harry Murti, S.Si ; Ferry Sandra, drg., Ph.D, LFIBA, CIPM ; Prof. Arief Boediono, drh., Ph.D ; Dr. Tono Djuwantono, dr., Sp.OG(K), M.Kes.; Boenjamin Setiawan, dr., Ph.D. 2010. *Stem Cell Dasar Teori dan Alikasi Klinis*. Jakarta : Erlangga.
- Hanafiah, K. A. 2016 *rancangan Percobaan: Teori dan Aplikasi*. Palembang: Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya.

- Hastuti, Riani Dwi; Diding Prasetyo; Sri Hartati Handinoto. 2013. Perbedaan Kadar Caffeic Acid Phenethyl Ester pada Propolis Ekstrak Etanol dan Ekstrak Air. *Biofarmasi*. 11(2).
- Hazem, Abbas, Ioana Madalina Pitica-Aldea, Carmen Popescu, Lilia Matei, Denisa Dragu, Mihaela Economescu, Irina Alexiu, Iuliana Crisan, Carmen Cristina Diaconu, Coralia Bleotu, Dumitru Lupuliasa. 2007. The Antiviral/Virucidal Effect of Alcoholic and Aqueous Extract With Propolis. *Farmacia*. 65 (6).
- 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*. 47 (2).
- Havens, Courtney G.; Alan Ho; Naohisa Y.; Steven F.D. 2006. Regulation of Late G1/S Phase Transition APC^{Cdh1} by Reactive Oxygen Species. *Molecular and Cellular Biology*. 26 (12).
- Huang, Shuai, Cui-Ping Zhang, Kai Wang, George Q. Li dan Fu-Liang Hu. 2014. Recent Advances in The Chemical Composition of Propolis. *Molecules*. 19 (19610-19632).
- Hudu, Shuaibu Abdullahi; Ahmed Subeh Alshrari; Ahmad Syahida; Zamberi Sekawi. 2016. Cell Culture, Technology; enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 10 (3).
- Hristova, E., P. Todorov and A. Krill. 2009. Morphological Characteristics of Ovine Fetal Liver Cells. *Journal of Agricultural Sciences*. Vol.5(4): 498-503.
- Ibnu Katsir. 2004. Diterjemahkan oleh M. Abdul Ghoffar, dkk. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 6*. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'i
- Ikhwati, Zullies. 2018. *Farmakologi Molekuler: Target Aksi Obat dan Mekanisme Molekulernya*. Jogjakarta: UGM Press.
- Ishibashi, Hiromi; Minoru Nakamura; Atsumasa Komori; Kiyoshi Migita; Shinji Shimoda. 2009. Liver Architecture, Cell Function and Disease. *Immunopathology*. 31 (3).
- Istiana, Noer. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Alga Hijau Biru (Spirulina) terhadap Viabilitas dan Proliferasi Sel Saraf Otak Tikus (*Rattus norvegicus*) Secara In Vitro [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Jannah, Miftakhul. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis terhadap Viabilitas dan Nilai *Population Doubling Time* (PDT) Sel Otak Tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in Vitro* [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Jaelani, 'Abdul Qadir, Syekh. 2011. *Tafsir al-Jaelani/Syekh 'Abdul Qadir Jaelani*. Penerjemah, Abdul hamid dan Tim sahara. Jakarta: Sahara.
- Jevas, Ozougwu C. Ph. D. 2017. Physiology of The Liver. *Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*. 4 (8).
- Kalia, Preeti, Neelima R. Kumar dan Kusum Harjai. 2016. Effect of Propolis Extraction on Hematotoxicity and Histological Changes Induced by Salmonella Enterica Serovar Typhimurium in Balb/c Mice. *Arch Biol Sci*. 68 (2).
- Kalanjati, Woro Wulandari. 2006. Perbedaan Konfluenitas dan Viabilitas Sel Kultur Primer Sel Fibroblas dari Jaringan Daun Telinga Rusa Bawean (*Axis kuhlii*) [Skripsi]. Surabaya: Universitas Airlangga.

- Kermanizadeh, Ali. Birgit K. G; Garry R. H. dan Vicki Stone. 2012. An *In Vitro* Liver Model-Assessing Oxidative Stress and Genotoxicity Following Exposure of Hepatocytes to A Panel of Engineered Nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*. 9(28).
- Khumairoh, Ika; Irma M. Puspitasari. 2016. *Kultur Sel. Farmaka*. 14 (2).
- Klingbeil, M. Fatima; Marisa Roma Herson; Elier B. Cristo; Decio dos Santos Pinto Jr; Daniele Yoshito; Monica B. Mathor. 2009. Comparison of Two Cellular Harvesting Methods for Primary Human Oral Culture of Keratinocytes. *Cell Tissue Bank*. 10:197-204.
- Kulsum Nurbani, Ahmad Sulaeman, Budi Setiawan dan I Wayang Teguh Wibawan. 2017. Preliminary Studies of The immunomodulator Effect of The Propolis *Trigna* spp. Extract in a Mouse Model. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 10 (2).
- Kumar, Anil PR; Bindu Menon; Anil Kumar TV dan Kumari TV. 2002. Culture of Neonatal Rat Liver Cells: A Preliminary Observation. *Trends Biomater. Artif. Organs*. 16(1).
- Kumar, Shiv. 2011. Free Radicals and Antioxidant: Human and Food System. *Advances in Applied Science Research*. 2 (1).
- Kumar, vinay, MD, FRCPath; Ramzi S. Cotran, MD; Stanley L. Robbins, MD. 2007. Buku Ajar Patologi Robbins, Edisi 7 Volume 1. Terjemahan: Awal Prasetyo. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Kumar Shashank dan Abhay K. Pandey. 2013 Chemistry and Biological Activities of Flavonoid: An Overview. *The scientific world journal*. DOI: 10.1155/2013/162750
- Kurnia, Ema W. dan Kholifah Holil. 2012. Efek Vitamin C dalam Medium DMEM terhadap Pertumbuhan Sel Paru-paru Fetus Hamster secara *In vitro*. *El-hayah*. 3(1).
- Krampe, Britta dan Mohamed Al-Rubeai. 2010. Cell Death in Mammalian Cell Culture: Molecular Mechanism and Cell Line Engineering Strategies. *Cytotechnology*. 62: 175-188.
- Leland, Diane S. dan Christine C. Ginocchio. 2007. Role of Cell Culture for Virus Detection in The Age of Technology. *Clin. Microbiol. Rev*. 20 (1).
- Li, Zhou, Rusen Yang, min Yu, Fan Bai, Cheng Li, dan Zhong Lin Wang. 2009. Cellular Level Biocompatibility and Biosafety of ZnO Nanowires. *The Journal of Physical Chemistry*. 112(15).
- Li, F., Vijayasankaran N., Shen A., Kiss R., Amanullah A. 2010. Cell Culture Processes for Monoclonal Antiody Production. *MAbs*. 2 (5)
- Li, Y., L. J. Chen, F. Jiang, Y. Yang, X.X. Wang, Z. Zhang, Z. Li dan L. Li. 2015. Caffeic Acid Improves Cell Viability and Protects Against DNA damage: Involvement of Reactive Oxygen Species and Extracellular Signal-Regulated Kinase. *Brazillian Journal of Medical and Biological Research*. DOI 10.1590/1414-431X20143729.
- Lin, Li-Sen; Jun-Feng Wang; Jibin Sing; Yijing Liu; Guizhi Zhu; Yunlu Dai; Zheyu Shen; Rui Tian; Justin Song; Zhantong Wang; Wei Tang; Guocan Yu; Zijian Zhou; Zhen Yang; Tao Huang; Gang Niu; Huang-Hao Yang; Zhi Yi Chen;

- Xiaoyuan Chen. 2019. Cooperation of Endogenous and Exogenous Reactive Oxygen Species Induced by Zinc Peroxide Nanoparticles to Enhance Oxidative Stress-Based Cancer Therapy. *Theranostics*. 9 (24).
- Lincoln, Carolyn K. dan Michael G. Gabridge. 1998. Cell Culture Contamination: Source, Consequences, Prevention and Elimination Chapter 4 Methods in Cell Biology Vol. 57. New York: Bionique Testing Laboratories.
- Lipinski, Boguslaw. 2011. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. DOI: 10.1155/2011/809696.
- Malole, M. B. 1990. *Kultur Sel dan Jaringan Hewan*. Bogor: IPB.
- Marcucci, M.C. 1995. Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. *Apidologie*. 26: 83-89.
- Meng, Ye dan Lu Zong. 2019. Estrogen Stimulates SREBP2 Expression in Hepatic Cell Lines Via an Estrogen Response Element in The SREBP2 Promoter. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 24 (65).
- Miranda, J.L dan Ramos A.F.N. 2007. Propolis: A Review of Its Anti-Inflammatory and Healing Actions. *J.Venom. Anim. Toxins incl.Trop.Dis*. 13 (4).
- Mitry R.; R. Hughes R.D. 2012. Introduction to Human Cell Culture Protocols . Method in Molecular Biology.
- Murtaza, Ghulam, Sabiha Karim, Muhammad Rouf Akram, Shujaat Ali Khan, Saira Azhar, Amara Mumtaz dan Muhammad Hassam Hassan Bin Asad. 2014. Review Article Caffeic Acid Phenethyl Ester and Therapeutic Potentials. *Biomed Research International*. DOI:10.1155.
- Najafi, Mohsen Fathi, Fatemeh Vahedy, Mohammad Seyyedini, Hamid Reza Jomehzadeh dan Kazem Bozary. 2007. Effect of Water Extract of Propolis on Stimulation and Inhibition of Different Cell. *Cytotechnology*. 54: 49-56.
- Nijveldt, Robert J.; Els van Nood; Danny EC van Hoorn; Petra G Boelens; Klaske van Norren dan Paul AM van Leeuwen. 2001. Flavonoid: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. *Am J Clin Nutr*. 74: 418-425.
- Olayemi, Kayode I.2014. Therapeutic Potentials of Nigerian Insect-Propolis Against The Malarial Parasite *Plasmodium berghei* (Haemosporida: Plasmodidae). *American Journal of Drug Discovery and Development*. 4 (4).
- Oteiza, Patricia I.; Alejandra G. Erlejman; Carl L. Keen; Sandra Viviana Verstraeten dan Cesar Fraga. 2005. Flavonoid-Membrane Interaction: A Protective Role of Flavonoid Membrane Surface?. *Clinical and Developmental Immunology*. 12(1).
- Oyeleye O. O.; Agundeji S. T; Ola S. I. dan Omitogun O. G. 2016. Review Basic of Animal Cell Culture: Foundation for Modern Science. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev*. 11 (2).
- Ozen S, Akyol O, Iraz M, Sogut S, Ozugurlu F, Ozyurt H, Odaci E, Yildirim Z. 2004. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 24 (1): 27-35.
- Park YK, Ikegaki M. 1998. Preparation water and ethanolic extract of propolis and evaluation of preparations. *Bioschi Biotechnol Biochem* 62 (11): 2230-2232.

- Pietta PG, Gardana C, Pietta AM. 2002. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73 (1): 7-20.
- Posangi, J. 2000. *Buku Penuntun Praktikum: Ekstraksi*. Manado: Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Unsrat.
- Puluputturi, Sreedhar dan Jhansi Rani Dayapulae. 2011. Phytoestrogens: Risk and Benefits. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research*. 10(1).
- Pusztai, L.; C. E. Lewis dan E. Yap. 1996. *Cell Proliferation in Cancer Regulation Mechanism of Neoplastic Cell Growth*. New York: Oxford University Press.
- Ramadan, Amer, Gamal Soliman, Sawsan S. Mahmoud, Salwa M. Nofal, Rehab Fawzy Abdel-Rahman. 2015. Hepatoprotective and Hepatotherapeutic Effects of Propolis Against D-Galactosamine/Lipopolysaccharide-Induced Liver Damage in Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 7 (2).
- Rosyidi, Djalal; Lilik Eka Radiati; Sri Minarti; Mustakim; Agus Susilo; Firman Jaya; Abdul Aziz. 2018. Perbandingan Sifat Antioksidan Propolis pada Dua Jenis Lebah (*Apis mellifera* dan *Trigon* sp.) di Mojokerto dan Batu Jawa Timur Indonesia. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak*. 13 (2).
- Sadiyah, Siti K. 2019. Pengaruh Cairan Rokok Elektrik Aroma Kayu Manis (*Cinnamomum* sp.) terhadap Viabilitas dan Konfluenitas Sel Paru-Paru Tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in Vitro* [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim
- Sawicka Diana, Halina Car, Mari Halina Borawska dan Jacek Niklinski. 2012. The Anticancer Activity of Propolis. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. 50 (1).
- Sforzin J M, Bankova V. 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *J Ethnopharmacol* 133: 253-260.
- Sawada, Norimasa; Gang-Hong Lee; Yohichi Mochizuki; Takatoshi Ishikawa. 1988. Active Proliferation of Mouse Hepatocytes in Primary Culture Under Defined Conditions as Compared to Rat Hepatocyte. *Jpn. J. Cancer Res*. 79 : 983-988.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati.
- Snezhkina, Anastasiya; Anna V.K.; Olga L.K.; Maria V.S.; Nataliya V.M.; George S.K.; Alexey A. D. 2019. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. DOI: 10.1155/2019/6175804
- Stan, Florin Gheorghe. 2018. Comparative Study of The Liver Anatomy in The Rat, Rabbit, Guinea Pig and Chinchilla. *Bulletin UASVM Medicine*. 75(1).
- Stiphanuk, M.H. 2000. *Biochemical and Physiological Aspect of Human Nutrition*. New York: 904-905.
- Suhartono, E Fachir H dan Setiawan B. 2007. *Kapita Sketsa Biokimia Stress Oksidatif Dasar dan Penyakit*. Banjarmasin: Pustaka Banua.
- Sumardi dan Mariati. 2007. *Biologi Sel*. Jogjakarta: Graha Ilmu.
- 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*. 8 (1).

- Syahidah, Hasna Nur dan Yuni Elsa Hadisaputri. 2016. Review Artikel: Media yang digunakan pada Kultur Sel. *Farmaka*. 14 (3).
- Takeuchi, Takashi. 2014. Cell Proliferation and Ddevelopment. *Development Growth and Differentiation*. 56(5).
- Tarahovsky, Yury S. 2008. Plant Polyphenol in Cell-Cell Interaction and Communication. *Plant Signaling and Behavior*. 3 (8).
- Tarahovsky, Yuri S., Yuri A. Kim, Elena A. Yagolnik dan Eugeny N. Muzafarov. 2014. Flavonoid-membrane interaction: involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1838 (1235-1246).
- Toreti, V. Cristina; Helia H. Sato; Glaucia M. Patore dan Yong Kun Park. 2013. Review Article Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. DOI: 10.1155.
- Tosh, David dan Alastai Strain. 2005. Liver Stem Cells-Prospect for Clinical Use. *Journal of Hepatology*. 42:75-84.
- Trenggono, B. S. 2009. *Metode Dasar Kultur Jaringan Hewan*. Jakarta: Universitas Trisakti.
- Tyastuti, Erma Musbita, Sutarno dan Kusmardi. 2006. Efek imunostimulator Propolis terhadap Proliferasi Sel Limfosit T dan Viabilitas Sel Tumor *Mammae* Mencit secara *In Vitro*. *Bioteknologi*. 3 (10).
- Uebi, Tatsuya; Makoto Umeda dan Takeshi Imai. 2015. Estrogen Induced Estrogen Receptor Alpha Expression and Hepatocyte Proliferation in The Livers of Male Mice. *Genes to Cells*. 20 (217-223).
- Verma, Anju; Megha Verma; Anchal Singh. 2020. *Animal Biotechnology (Second Edition) Models in Discovery and Translation Chapter 14 Animal Tissue Culture Principles and Applications*. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4.
- Wang, Xinyu; Salomon Stavchansky; Philip D. Bowman; Sean M. Kerwin. 2006. Cytoprotective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) and Catechol Ring-Fluorinated CAPE Derivates Against Menadione-Induced Oxidative Stress in Human Endothelial Cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 14 (4879-4887).
- Widayati, Eni. 2012. Oksidasi Biologi, Radikal Bebas dan Antioxi-dan. *Jurnal Unissula*. 50(128).
- Wulandari, W. 2013. *Perbedaan Konfluenitas dan Viabilitas Sel Kultur Primer Fibroblas dari Jaringan Daun Telinga Rusa Bawean (Axis kuhli) pada Medium TCM 199 dan MEM*. Surabaya: UNAIR.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan volume ekstrak propolis (masing-masing konsentrasi) yang harus ditambahkan pada media kultur

Keterangan:

- $1\mu\text{g}/\text{mL} = 1 \text{ ppm} = 0.0001\%$
- Volume total media = $3000 \mu\text{L}$

1. Perlakuan kontrol : tanpa pemberian ekstrak propolis
2. Perlakuan 1 : $100 \mu\text{g}/\text{mL} = 0.01\%$
 Jadi , volume ekstrak propolis yang diberikan ke dalam media adalah $0.01\% \times 3000 \mu\text{L} = 0.3 \mu\text{L}$
3. Perlakuan 2 : $120 \mu\text{g}/\text{mL} = 0.012\%$
 Jadi , volume ekstrak propolis yang diberikan ke dalam media adalah $0.012\% \times 3000 \mu\text{L} = 0.36 \mu\text{L}$
4. Perlakuan 3 : $140 \mu\text{g}/\text{mL} = 0.014\%$
 Jadi , volume ekstrak propolis yang diberikan ke dalam media adalah $0.014\% \times 3000 \mu\text{L} = 0.42 \mu\text{L}$
5. Perlakuan 4 : $160 \mu\text{g}/\text{mL} = 0.016\%$
 Jadi , volume ekstrak propolis yang diberikan ke dalam media adalah $0.016\% \times 3000 \mu\text{L} = 0.48 \mu\text{L}$
6. Perlakuan 5 : $180 \mu\text{g}/\text{mL} = 0.018\%$
 Jadi , volume ekstrak propolis yang diberikan ke dalam media adalah $0.018\% \times 3000 \mu\text{L} = 0.52 \mu\text{L}$
7. Perlakuan 6 : $200 \mu\text{g}/\text{mL} = 0.02\%$
 Jadi , volume ekstrak propolis yang diberikan ke dalam media adalah $0.02\% \times 3000 \mu\text{L} = 0.6 \mu\text{L}$

Lampiran 2. Analisis Data Konfluenitas Sel Hepar Tikus (*Rattus novergicus*)

2.1 Data Hasil Penelitian

Perlakuan	Konfluenitas				Jumlah	Rata-rata (%)
	1	2	3	4		
P1 (kontrol)	15.34	16.42	15.34	14.17	61.27	15.31
P2 (100 µg/mL)	16.42	21.97	21.97	17.45	72.26	18.06
P3 (120 µg/mL)	18.43	17.45	17.45	14.17	70.31	17.57
P4 (140 µg/mL)	20.26	21.13	21.13	19.36	81.01	20.25
P5 (160 µg/mL)	17.45	22.78	22.78	16.42	76.01	19.00
P6 (180 µg/mL)	17.45	22.78	22.78	16.42	76.01	19.00
P7 (200 µg/mL)	19.36	16.42	16.42	14.17	68.38	17.09
Total					505.25	126.31

2.2 Hasil Uji Statistik dengan SPSS

a) Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Konfluenitas
N		28
Normal Parameters ^a	Mean	18.0446
	Std. Deviation	2.49916
Most Extreme Differences	Absolute	.135
	Positive	.135
	Negative	-.094
Kolmogorov-Smirnov Z		.715
Asymp. Sig. (2-tailed)		.687
a. Test distribution is Normal.		

b) Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Konfluenitas

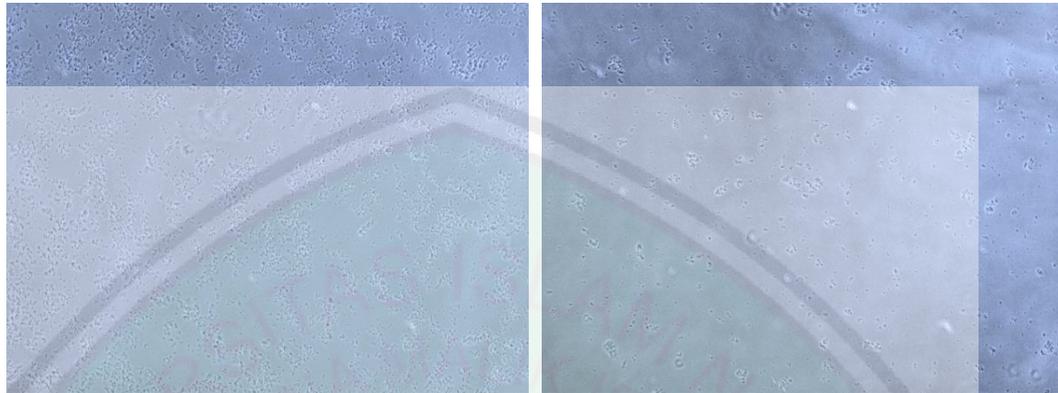
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.363	6	21	.275

c) Uji *one way* ANOVA**ANOVA**

Konfluenitas	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	61.070	6	10.178	1.987	.113
Within Groups	107.567	21	5.122		
Total	168.636	27			

Lampiran 3.

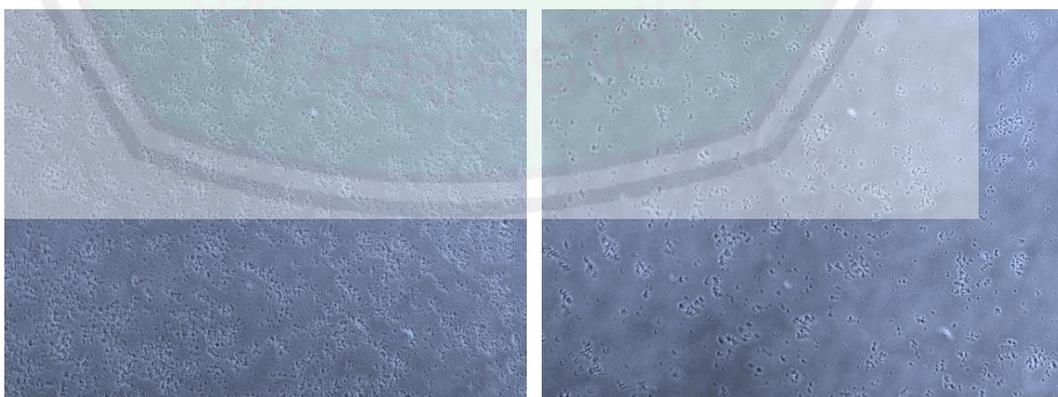
Gambar pengamatan konfluenitas sel hepar tikus pada hari ke-3 dan ke-6



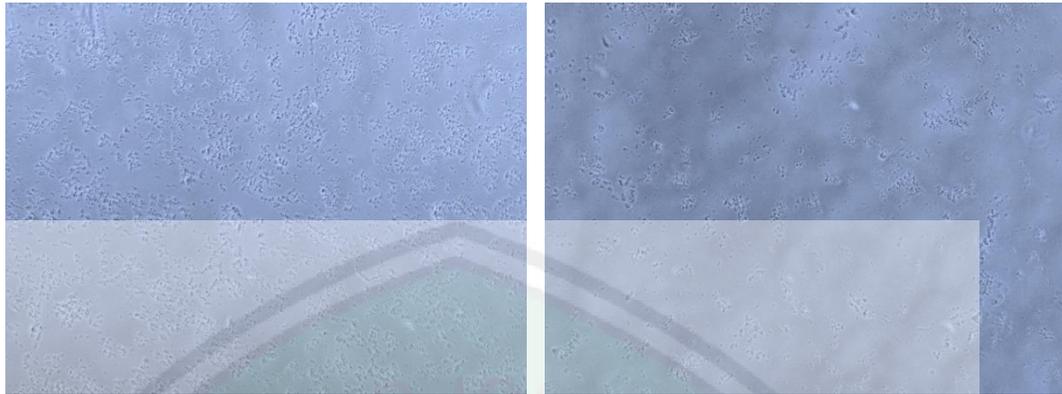
Perlakuan 1 (tanpa ekstrak propolis pada hari ke-3 dan ke-6)



Perlakuan 2 (konsentrasi ekstrak propolis 100 $\mu\text{g/ml}$ pada hari ke-3 dan ke-6)



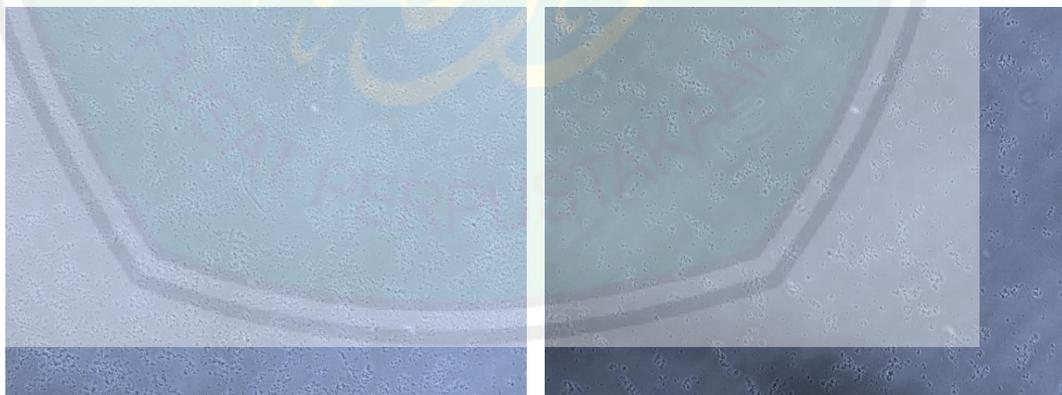
Perlakuan 3 (konsentrasi ekstrak propolis 120 $\mu\text{g/ml}$ pada hari ke-3 dan ke-6)



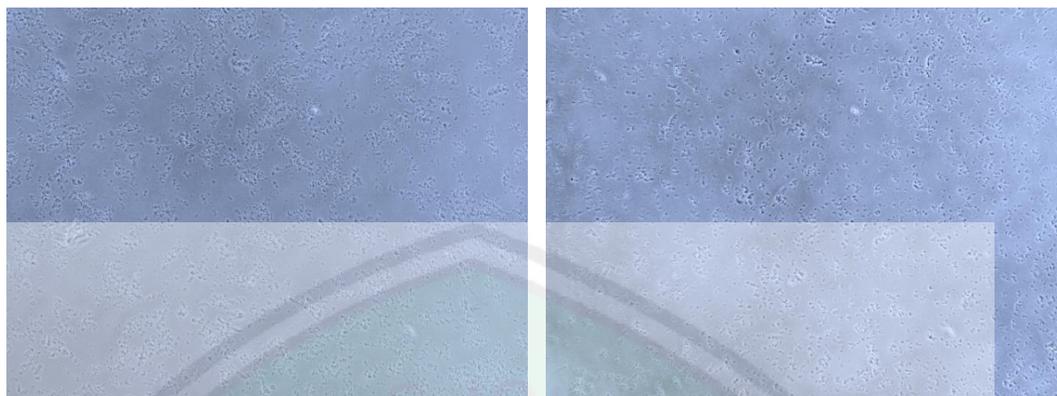
Perlakuan 4 (konsentrasi ekstrak propolis 140 $\mu\text{g/ml}$ pada hari ke-3 dan ke-6)



Perlakuan 5 (konsentrasi ekstrak propolis 160 $\mu\text{g/ml}$ pada hari ke-3 dan ke-6)



Perlakuan 6 (konsentrasi ekstrak propolis 180 $\mu\text{g/ml}$ pada hari ke-3 dan ke-6)



Perlakuan 7 (konsentrasi ekstrak propolis 200 $\mu\text{g/ml}$ pada hari ke-3 dan ke-6)



Lampiran 4. Analisis Data Viabilitas Sel Hepar Tikus (*Rattus novergicus*)

4.1 Data Hasil Penelitian

Perlakuan	Viabilitas				Jumlah	Rata-rata (%)
	1	2	3	4		
P1 (kontrol)	27	25	26	21	99	24.75
P2 (100 µg/mL)	81	49	36	36	202	50.50
P3 (120 µg/mL)	29	46	47	51	173	43.25
P4 (140 µg/mL)	50	64	42	40	196	49.00
P5 (160 µg/mL)	39	31	35	45	150	37.50
P6 (180 µg/mL)	28	37	47	42	154	38.50
P7 (200 µg/mL)	39	30	30	41	140	35.00
Total					1114	278.50

4.2 Hasil Uji Statistik dengan SPSS

a) Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		viabilitas
N		28
Normal Parameters ^a	Mean	39.79
	Std. Deviation	12.606
Most Extreme Differences	Absolute	.115
	Positive	.115
	Negative	-.085
Kolmogorov-Smirnov Z		.611
Asymp. Sig. (2-tailed)		.850
a. Test distribution is Normal.		

b) Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.152	6	21	.090

c) Uji *one way* ANOVA**ANOVA**

Viabilitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1870.214	6	311.702	2.704	.042
Within Groups	2420.500	21	115.262		
Total	4290.714	27			

d) Uji Duncan

Viabilitas

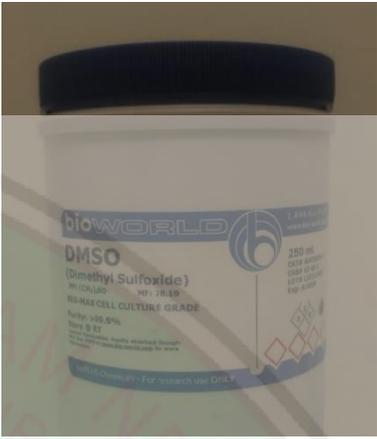
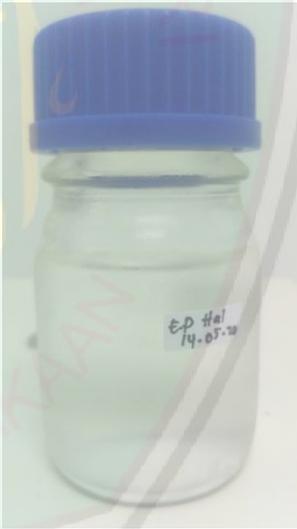
Duncan

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0	4	24.75	
200	4	35.00	35.00
160	4	37.50	37.50
180	4	38.50	38.50
120	4		43.25
140	4		49.00
100	4		50.50
Sig.		.110	.084

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian

1. Pembuatan Stok Ekstrak Propolis

	
Ekstrak propolis mentah	DMSO untuk melarutkan ekstrak propolis
	
Ekstrak propolis diencerkan dalam DMSO dan Aquades	Stok ekstrak propolis

2. Isolasi Organ Hepar (*Rattus novergicus*)

	
<p>Bagian abdomen tikus dibuka untuk mengisolasi organ hepar</p>	<p>Organ hepar yang sudah diisolasi dicuci dengan NaCl fisiologis</p>

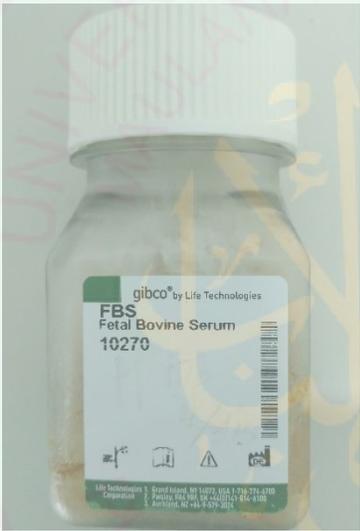
3. Penanaman dan Perhitungan Sel

	
<p>Hasil sentrifugasi sel hepar</p>	<p>Sel hepar ditanam pada media tanam</p>

	
<p>Sel dipanen dan dihitung viabilitasnya dengan <i>cell countess</i></p>	<p>Perhitungan viabilitas sel dengan <i>cell countess</i></p>

4. Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian

	
<p>Media DMEM</p>	<p>Phosphat Buffer Saline</p>

	
Trypan Blue	Trypsin EDTA
	
Fetal Bovine Serum	Cell Countess
	
Inkubator	Laminar Air Flow (LAF)

Lampiran 6. Bukti Hasil Konsultasi



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp/ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.um-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Khalimatus Sa'diyah
NIM : 14620025
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil / Genap TA. 2020/2021
Pembimbing : Kholifah Holil, M.Si
Judul Skripsi : **PENGARUH EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP PERTUMBUHAN SEL HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) SECARA *IN VITRO***

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	10 Oktober 2018	Konsultasi Pengajuan Judul Skripsi	/
2.	5 Desember 2018	Konsultasi Penulisan Latar Belakang	/
3.	14 Maret 2019	Konsultasi Penulisan Bab 1	/
4.	19 Juni 2019	Konsultasi Penulisan Bab 1	/
5.	12 Februari 2020	Konsultasi Penulisan Bab 3	/
6.	2 Maret 2020	Konsultasi Penulisan Bab 3	/
7.	27 April 2020	Konsultasi Penulisan Bab 2	/
8.	3 Juni 2020	Konsultasi Penulisan Bab 2	/
9.	8 September 2020	Konsultasi Hasil Penelitian	/
10.	15 September 2020	Konsultasi Hasil Analisis	/
11.	5 Oktober 2020	Konsultasi Penulisan Bab 4	/
12.	12 Oktober 2020	Konsultasi Penulisan Bab 4	/
13.	19 Oktober 2020	Konsultasi Penulisan Bab 4	/
14.	3 November 2020	Konsultasi Penulisan Bab 4	/
15.	8 November 2020	Konsultasi penulisan Bab 5	/
16.	1 Desember 2020	Konsultasi penulisan abstrak	/

Pembimbing Skripsi,

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



7 Desember 2020
Pembimbing Studi Biologi,

Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

