

Artikel Penelitian

Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis terhadap Ekspresi Bcl2 dan Apoptosis pada Sel Otak Tikus Model Cedera Otak Traumatik

Effect of Propolis Extract Administration on Bcl-2 Expression and Apoptosis in Rats' Brain Cells Model of Traumatic Brain Injury

Ully Husna¹, Hidayat Sujuti², Mochammad Dalhar¹

¹Laboratorium Ilmu Penyakit Saraf Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang

²Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRAK

Ekstrak propolis mempunyai efek neuroprotektan melalui berbagai macam cara kerja salah satunya sebagai antioksidan karena bahan kandungan utamanya adalah *flavonoid*. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek ekstrak propolis berbagai dosis dalam meningkatkan ekspresi Bcl-2 dan menurunkan apoptosis sel otak tikus model cedera otak traumatik. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu: kelompok normal, kelompok yang diberi perlakuan cedera otak traumatik, kelompok yang diberi perlakuan cedera otak traumatik dan ekstrak propolis masing-masing dosis 50mg/kgBB, 100mg/kgBB, dan 200mg/kgBB. Setiap kelompok diambil otaknya untuk diperiksa ekspresi Bcl-2 dan apoptosis sel otak pada hari ke-7. Berdasarkan hasil analisa statistik, didapatkan hubungan signifikan antara ekspresi Bcl-2 dan apoptosis sel otak tikus model cedera otak traumatik dengan berbagai dosis ekstrak propolis ($p < 0,05$). Dosis 200mg/kgbb merupakan dosis yang paling efektif dalam meningkatkan ekspresi Bcl2 otak tikus dan menurunkan apoptosis sel otak tikus. Penelitian ini telah membuktikan bahwa ekstrak propolis dapat meningkatkan ekspresi Bcl-2 dan menurunkan apoptosis sel otak tikus model cedera otak traumatik.

Kata Kunci: Apoptosis sel, cedera otak traumatik, ekspresi Bcl-2, ekstrak propolis

ABSTRACT

Propolis extract has a neuron-protectant effect through a variety of ways, one of which is as an antioxidant since its main ingredient is flavonoid. This study aimed to examine the effects of various doses of propolis extract in increasing Bcl-2 expression and decreasing apoptosis in rats' brain cells model of traumatic brain injury. Rats were divided into 5 groups, i.e. normal group, group treated with traumatic brain injury, and groups treated with traumatic brain injuries and given extracts of propolis dose of 50mg/kgBW, 100mg/kgBW, and 200mg/kgBW. Brains from each group were taken to examine the Bcl-2 expression and apoptosis of brain cells at day 7th. Based on the statistical analysis results, there was a significant correlation between the Bcl-2 expression and apoptosis of brain cells of rats models of traumatic brain injury with different doses of propolis extract ($p < 0,05$). Dose of 200mg/kgBW was the most effective in increasing rat brain Bcl-2 expression and decreasing apoptosis of rat brain cell. This study proved that propolis extract can increase Bcl-2 expression and decrease apoptosis of brain cell of rat model of traumatic brain injury.

Keywords: Bcl-2 expression, cells apoptosis, propolis extracts, traumatic brain injury

Korespondensi: Ully Husna. Laboratorium Ilmu Penyakit Saraf Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang, Jl. Jaksa Agung Suprpto 2 Malang Jawa Timur Tel. (0341) 321297 Email: ullyhusna@yahoo.com

DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jkb.2017.029.03.3>

PENDAHULUAN

Cedera otak traumatik masih merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas di dunia pada individu dengan umur dibawah 45 tahun. Regimen perawatan cedera kepala yang digunakan saat ini adalah stabilisasi pasien, pencegahan hipertensi intrakranial, pemeliharaan dan stabilisasi tekanan perfusi serebral (CPP), menghindari cedera otak sekunder, optimalisasi hemodinamik dan oksigenasi serebral. Perawatan tersebut memerlukan biaya yang tidak sedikit (1).

Perjalanan cedera otak merupakan proses yang berkelanjutan antara cedera otak primer dan cedera otak sekunder. Sebagian besar cedera otak berakhir dengan akibat fatal yang disebabkan oleh cedera sekunder pada otak. Cedera otak sekunder yang terjadi beberapa saat setelah cedera otak primer merupakan kondisi yang dapat dicegah dan peka terhadap terapi. Pada cedera sekunder terjadi serangkaian proses antara lain inflamasi, pembentukan radikal bebas, terjadinya edema vasogenik dan sitotoksik, peningkatan influks Ca^{++} dan eksitotoksitas glutamate yang dapat menyebabkan apoptosis (2).

Apoptosis adalah suatu bentuk kematian sel yang terprogram. Apoptosis mempunyai dua program utama jalur kematian yaitu jalur caspase dan disfungsi organel, dengan disfungsi mitokondria sebagai tanda utama. Kematian neuronal apoptosis dan nekrotik terjadi setelah percobaan cedera otak traumatis (TBI). Penelitian oleh Rink *et al* menunjukkan bahwa terdapat daerah tertentu yang rentan mengalami kematian apoptosis neuron setelah cedera traumatik. Daerah tersebut yaitu korteks, hippocampus CA3, dan gyrus dentatus (2).

Keluarga Bcl-2 adalah gen yang mengkode protein yang mendukung apoptosis sel (misalnya, Bax, Bcl-xS) atau yang menekan apoptosis sel (misalnya, Bcl-2, Bcl-xL). Dominasi anggota antiapoptotik seperti Bcl-2 dan Bcl-xL bisa meningkatkan *survival* sel. Dalam sistem saraf, Bcl-2 melindungi sel saraf dari berbagai rangsangan yang menyebabkan kematian apoptosis neuronal (2-4). Pada penelitian yang mempelajari ekspresi Bcl-2 pada percobaan cedera otak traumatik pada tikus menunjukkan bahwa pada 6 dan 24 jam, Bcl-2 diinduksi dalam ipsilateral peritrauma korteks, hipokampus, dan gyrus dentatus. Pada 72 jam peningkatan Bcl-2 terdeteksi hanya dalam korteks. Bcl-2 diinduksi pada 8, 24, 72, dan 168 jam dalam korteks ipsilateral dan hipokampus. Dari bukti biokimia DNA fragmentasi, baik apoptosis atau nekrosis jarang terlihat pada neuron yang mengekspresikan Bcl-2. Data ini menunjukkan bahwa Bcl-2 memainkan peran penting dalam regulasi kematian neuronal setelah cedera otak, dan mendukung peran Bcl-2 sebagai gen yang menginduksi efek neuroprotektif (2-4).

Propolis merupakan salah satu sumber zat gizi alami yang berasal dari substrat resin yang dikumpulkan lebah dari sari tunas daun dan kulit batang tanaman yang dicampur dengan enzim dan lilin dari sarang lebah. Kandungan aktif yang diketahui terkandung dalam propolis adalah polifenol (*flavonoid*, asam fenolat, dan esternya), terpenoid, steroid, dan asam amino. Propolis diketahui mempunyai kandungan *flavonoid* yang tinggi. *Flavonoid* merupakan zat yang diketahui banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan dan mempunyai efek antioksidan dalam melumpuhkan radikal bebas (5-7). *Flavonoid* mempunyai efek neuroprotektan seperti yang dilaporkan

pada penelitian tikus model *focal cerebral ischemia* (MCAO), yang hasilnya signifikan menurunkan Bax, meningkatkan Bcl-2 dan menurunkan *caspase 3* (8). Sebaliknya, penelitian lain dengan pemberian propolis pada model tikus dengan *spinal cord injury* menunjukkan tidak ada penurunan bermakna (9).

Penelitian propolis sebagai neuroprotektan dan untuk mencegah cedera otak sekunder belum pernah dilakukan. Berdasarkan potensi propolis sebagai neuroprotektan dan tingginya insiden cedera kepala, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan efek pemberian ekstrak propolis dalam meningkatkan ekspresi Bcl-2 dan menurunkan apoptosis pada sel otak tikus model cedera otak traumatik

METODE

Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan *randomized post test only controlled group design* pada hewan model tikus wistar (*Rattus novergicus* galur wistar).

Kriteria inklusi untuk hewan coba pada penelitian ini yaitu tikus putih *Rattus novergicus* galur wistar jantan, usia 6-8 minggu, berat 250–300 gram, bulu putih bersih, dan dalam kondisi sehat dan aktif. Kriteria eksklusi adalah tikus yang sakit dan asupan makanan kurang pada saat penelitian, dan tikus yang mati pada saat penelitian berlangsung. Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus yang dibagi menjadi lima kelompok yaitu kelompok A (propolis 50mg/kgBB), kelompok B (propolis 100mg/kgBB), kelompok C (propolis 200mg/kgBB), kelompok D (kontrol positif) dan kelompok E (kontrol negatif).

Model Kontusio Serebri

Pembuatan tikus model kontusio serebri mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Marmarou *et al* (10). Tikus dianestesi dengan ketamin 44mg/kgBB im, kemudian bulu kepala dicukur dan dibersihkan dengan alkohol 70%. Selanjutnya kulit kepala dibuka. Silinder besi seberat 45gram (diameter 4mm) dijatuhkan dengan sudut 90° dari ketinggian 100cm sebanyak 1 kali. Tikus diberikan injeksi *Xylazine* 4mg/kgBB im selama 7 hari (10).



Gambar 1. Perlakuan cedera otak traumatik

Keterangan: Kepala tikus diletakkan pada *flatbed*. Silinder besi seberat 45gram (diameter 4mm) dijatuhkan dengan sudut 90° dari ketinggian 100cm sebanyak 1 kali dengan energi benturan 0,5joule

Ekstraksi Propolis

Teknik ekstraksi diawali dengan pembuatan rendaman

propolis dari propolis kasar. Langkah pertama adalah mengekstraksi propolis dengan etanol sebagai pelarut memakai perbandingan propolis: etanol adalah 1:10. Alat yang digunakan yaitu *Thermostirer* berkecepatan 150rpm selama 4 jam dan diputar dengan bantuan *Magnetic Stirrer* 5cm kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring sehingga didapat filtrat propolis. Filtrat dipisahkan dari pelarut dengan cara penguapan dalam *rotary evaporator* pada suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$ berkecepatan 2-3 rpm. Rendaman yang diperoleh tersebut kemudian diencerkan dengan *E-pure* dan *Tween* 80. Rendaman diencerkan dengan tujuan agar rendaman propolis yang bersifat lengket tersebut dapat lebih mudah diberikan pada hewan coba melalui metode oral. Ekstrak propolis diberikan peroral melalui sonde setiap hari selama 7 hari dengan dosis 50mg/kgBB, 100mg/kgBB, dan 200mg/kgBB.

Pemeriksaan Ekspresi Bcl-2 pada Sel Otak

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Dilakukan bloking *endogenous* peroksida menggunakan 3% H_2O_2 selama 20 menit, kemudian dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali selama 5 menit. Bloking *unspecific* protein dilakukan menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100 yang kemudian dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Dilakukan inkubasi menggunakan *rabbit* poliklonal anti Bcl-2 (Santacruz), selama 60 menit dan kemudian dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan inkubasi dengan anti *rabbit* HRP *conjugated* selama 40 menit dan dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit, kemudian ditetesi dengan DAB (Diamino Benzidine) dan inkubasi selama 10 menit. Dilakukan pencucian menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit dan dH_2O , selama 5 menit kemudian dilakukan *counter staining* menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit dan dicuci menggunakan *tap water*, dibilas menggunakan dH_2O dan dikering anginkan. Dilakukan *mounting* menggunakan entelan dan tutup dengan *cover glass* dan dilakukan pengamatan pada mikroskop cahaya.

Pengukuran ekspresi Bcl-2 menggunakan teknik imunohistokimia pada jaringan otak tikus. Cara menghitung ekspresi Bcl-2 pada jaringan otak tikus adalah dengan cara melihat di mikroskop pembesaran 100x kemudian naik sampai 400x lalu dihitung neuron dan glia yang mengekspresikan Bcl-2 di sitoplasma, sebanyak sepuluh lapangan pandang, kemudian dicari reratanya (metode *hot-spot*).

Pengamatan Apoptosis Sel Otak dengan Teknik DNA Terfragmentasi (TUNEL)

Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 dan dilakukan inkubasi menggunakan 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinase-K selama 15 menit pada 37°C dan dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada 3% H_2O_2 selama 15 menit dan dicuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Dilakukan inkubasi dengan *Tunel fragmented DNA labelling* selama 60 menit pada 37°C dan dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan inkubasi dengan eroksidase solution selama 40 menit pada 37°C dan dicuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit, kemudian ditetesi menggunakan substrat untuk Peroksidase (DAB–Diamino Benzidine) selama 20 menit pada suhu

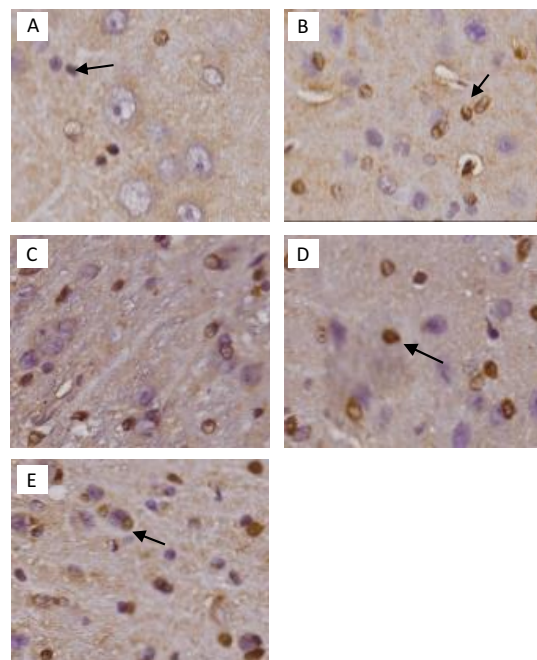
ruang. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 dan dilakukan *counter staining* dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit, kemudian dibilas dengan air kran dan dicuci dengan dH_2O . Setelah itu *slide* dikeringkan dan ditutup dengan *cover glass*, kemudian dilakukan pengamatan dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Sel-sel apoptosis ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel.

Analisis Statistik

Sebelum analisis data dilakukan uji normalitas (Shaphiro Wilks) dan uji varian (Levene *test*). Jika sebaran data normal dan varian data sama maka digunakan uji hipotesis *one way anova*, sedangkan, jika varian tidak sama digunakan uji Kruskal Wallis. Dilakukan uji *post hoc* sebagai lanjutan *one way ANOVA* dan Mann Whitney sebagai uji lanjutan Kruskal Wallis. Dilakukan juga uji korelasi dengan Spearman *rho* mengingat data bersifat ordinal dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

HASIL

Hubungan Ekstrak Propolis dan Ekspresi Bcl-2 Otak Tikus



Gambar 2. Ekspresi bcl-2 dengan immunohistokimia (panah hitam) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (pembesaran mikroskop 400x)

Keterangan: A. Kelompok kontrol negatif; B. Kelompok kontrol positif; C. Kelompok dosis ekstrak propolis 50 mg/kgBB; D. Kelompok dosis ekstrak propolis 100 mg/kgBB; E. Kelompok dosis ekstrak propolis 200 mg/kgBB.

Hasil uji normalitas (Shapiro-Wilk) didapatkan $p > 0,05$ ($p=0,792; 7,98; 0,405; 0,911; 0,577$) yang menunjukkan data terdistribusi normal, demikian juga hasil uji homogenitas (Levene *test*) didapatkan ragam data ekspresi Bcl-2 otak tikus masih relatif homogen ($p=0,649$) sehingga dapat dilakukan pengujian dengan ANOVA.

Dari hasil uji ANOVA didapatkan nilai rata-rata ekspresi Bcl-2 otak tikus pada kelima kelompok perlakuan pada hari ke-7 berbeda dan secara statistik signifikan ($p=0,000$). Hasil uji Tukey menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan

antar kelima kelompok ($p < 0,05$). Artinya pemberian ekstrak propolis dosis pertama belum didapatkan perbedaan ekspresi Bcl-2 bila dibandingkan dengan kondisi kontrol positif (cedera otak traumatis). Ekspresi Bcl-2 didapatkan lebih tinggi sesudah dosis 100 dan 200mg/kgBB dan secara statistik signifikan. Hal ini secara tidak langsung mengindikasikan bahwa peningkatan dosis ekstrak propolis memberikan peningkatan ekspresi Bcl-2. Indikasi tersebut ditunjang dengan hasil uji korelasi Spearman yang menunjukkan adanya korelasi positif sangat kuat ($r = 0,972$, $p < 0,0001$) dan signifikan secara statistik.

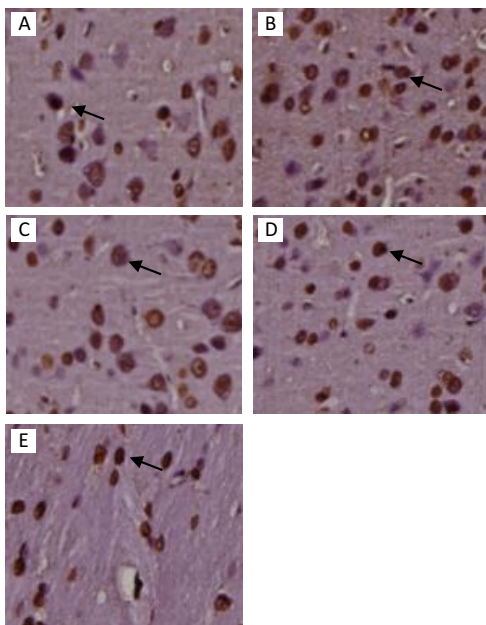
Tabel 1. Hasil notasi uji Tukey ANOVA pada Bcl-2

| Perlakuan | n | Rata-rata | SD (\pm) | Notasi |
|-------------|---|-----------|--------------|--------|
| Kontrol | 4 | 3,125 | 0,46458 | a |
| Kontrol+ | 4 | 5,225 | 0,22174 | b |
| 50 mg/kgBB | 4 | 5,700 | 0,35590 | b |
| 100 mg/kgBB | 4 | 10,325 | 0,25000 | c |
| 200 mg/kgBB | 4 | 15,300 | 0,21602 | d |

Keterangan:

- a : ekspresi Bcl-2 otak tikus antara K(-) berbeda secara signifikan dengan K(+), dosis 50mg/kgBB, dosis 100mg/kgBB, dan dosis 200mg/kgBB
- b : Ekspresi Bcl-2 otak tikus antara K(+) berbeda signifikan dengan K(-), dosis 100mg/kgBB, dan dosis 200mg/kgBB, tetapi tidak berbeda signifikan dengan dosis 50 mg/kgBB. Ekspresi Bcl-2 otak tikus antara dosis 50 mg/kgBB berbeda signifikan dengan K(-), dosis 100mg/kgBB, dan dosis 200mg/kgBB, tetapi tidak berbeda signifikan dengan K(+)
- c : Ekspresi Bcl-2 otak tikus antara dosis 100mg/kgBB berbeda signifikan dengan K(-), K(+), dosis 50mg/kgBB, dan dosis 200mg/kgBB
- d : Ekspresi Bcl-2 otak tikus antara dosis 200mg/kgBB berbeda signifikan dengan K(-), K(+), dosis 50mg/kgBB, dan dosis 100mg/kgBB

Apoptosis Sel Otak Tikus



Gambar 3. Ekspresi apoptosis dengan immunohistokimia Tunel Assay (panah hitam) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (pembesaran mikroskop 400x).

Keterangan: A. Kelompok kontrol negatif; B. Kelompok kontrol positif; C. Kelompok dosis ekstrak propolis 50mg/kgBB; D. Kelompok dosis ekstrak propolis 100mg/kgBB; E. Kelompok dosis ekstrak propolis 200mg/kgBB.

Hasil uji normalitas (Shapiro-Wilk) didapatkan $p > 0,05$ ($p = 0,850$; $0,240$; $0,850$; $0,683$; $0,714$) yang menunjukkan data terdistribusi normal, demikian juga hasil uji homogenitas (Levene test) didapatkan ragam data apoptosis sel otak tikus masih relatif homogen ($p = 0,579$) sehingga dapat dilakukan pengujian dengan ANOVA. Dari hasil uji ANOVA didapatkan nilai rata-rata apoptosis sel otak tikus pada kelima kelompok perlakuan pada hari ke-7 berbeda dan secara statistik signifikan ($p = 0,000$). Hasil uji Tukey menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelima kelompok ($p < 0,05$). Artinya pemberian ekstrak propolis dosis pertama sudah didapatkan perbedaan apoptosis sel otak bila dibandingkan dengan kondisi kontrol positif (cedera otak traumatis). Apoptosis sel otak didapatkan menurun setelah pemberian dosis 50, 100 dan 200mg/kgBB dan secara statistik signifikan. Hal ini secara tidak langsung mengindikasikan bahwa peningkatan dosis ekstrak propolis memberikan penurunan apoptosis sel otak tikus. Indikasi tersebut ditunjang dengan hasil uji korelasi Spearman yang menunjukkan adanya korelasi negatif sangat kuat ($r = -0,883$, $p < 0,001$) dan signifikan secara statistik.

Tabel 2. Hasil uji Tukey ANOVA pada apoptosis sel otak tikus

| Perlakuan | n | Rata-rata | SD (\pm) | Notasi |
|-------------|---|-----------|--------------|--------|
| Kontrol - | 4 | 12,425 | 0,17078 | a |
| Kontrol+ | 4 | 25,450 | 0,31091 | b |
| 50 mg/kgBB | 4 | 10,125 | 0,17078 | c |
| 100 mg/kgBB | 4 | 8,100 | 0,16330 | d |
| 200 mg/kgBB | 4 | 6,400 | 0,18257 | e |

Keterangan:

- a : Apoptosis sel otak tikus antara K(-) berbeda secara signifikan dengan K(+), dosis 50mg/kgBB, dosis 100mg/kgBB, dan dosis 200mg/kgBB.
- b : Apoptosis sel otak tikus antara K (+) berbeda signifikan dengan K(-), dosis 50mg/kgBB, dosis 100mg/kgBB, dan dosis 200mg/kgBB.
- c : Apoptosis sel otak tikus antara dosis 50mg/kgBB berbeda signifikan dengan K(-), K(+), dosis 100mg/kgBB, dan dosis 200mg/kgBB
- d : Apoptosis sel otak tikus antara dosis 100mg/kgBB berbeda signifikan dengan K(-), K(+), dosis 50mg/kgBB, dan dosis 200mg/kgBB
- e : Apoptosis sel otak tikus antara dosis 200mg/kgBB berbeda signifikan dengan K(-), K(+), dosis 50mg/kgBB, dan dosis 100mg/kgBB

DISKUSI

Cedera otak traumatik adalah proses patologis jaringan otak yang bukan bersifat degeneratif ataupun kongenital, melainkan akibat kekuatan mekanis dari luar, yang menyebabkan gangguan fisik, fungsi kognitif, dan psikososial. Gangguan ini dapat bersifat menetap atau sementara dan disertai hilangnya atau berubahnya tingkat kesadaran. Berdasarkan mekanismenya cedera otak di bagi atas cedera otak tumpul dan cedera otak tembus/tajam (*penetrating head injury*) (11).

Patofisiologi cedera otak ditinjau dari saat kejadiannya terdiri atas cedera otak primer yaitu kerusakan jaringan otak langsung akibat trauma dan cedera otak sekunder yaitu akibat perluasan kerusakan pada jaringan otak melalui proses patologis yang berlanjut (12). Cedera otak sekunder harus dicegah karena dapat berlanjut pada kematian sel otak terutama melalui jalur apoptosis sel. Pengobatan cedera otak sampai saat ini kebanyakan masih bersifat simptomatis sehingga kurang efektif dalam menghambat proses apoptosis. Oleh karena itu perlu diupayakan penemuan obat baru yang mampu mencegah

dan menghambat kematian sel otak. Ekstrak propolis dapat dipertimbangkan sebagai obat baru yang memiliki efek neuroprotektif dan mencegah proses apoptosis sel. Dari penelitian sebelumnya didapatkan bahwa propolis mempunyai kandungan *flavonoid* yang tinggi (13). Marica dkk, telah melakukan penelitian terhadap absorpsi polifenol propolis melalui membran gastrointestinal tract, ikatan pada plasma protein dan penetrasi melalui blood brain barrier (BBB) dengan menggunakan liquid chromatography. Dari hasil penelitian tersebut didapatkan bahwa *flavone* dan *flavonone* pada propolis berikatan dengan protein plasma dan dapat menembus BBB. Penelitian sebelumnya pada tikus dengan perlakuan trauma medula spinalis yang diberikan ekstrak propolis dengan dosis 100mg/kgbb dan 200mg/kgbb pada 30 menit dan 4 jam setelah trauma menunjukkan bahwa ekstrak propolis dapat menurunkan apoptosis sel otak tikus melalui penurunan *caspase 3* sebagai penanda apoptosis sel.

Hasil penelitian menunjukkan semakin tinggi dosis ekstrak propolis, maka akan diikuti oleh peningkatan ekspresi Bcl-2 otak tikus, demikian sebaliknya. Pada cedera otak sekunder terjadi serangkaian proses antara lain terjadinya proses inflamasi, pembentukan radikal bebas, terjadinya edema vasogenik dan sitotoksik, peningkatan influks Ca^{++} dan eksitotoksisitas glutamat. Radikal bebas, peningkatan kalsium intraselular dan peningkatan glutamat dapat mengganggu keseimbangan *Bcl-2 family* pro-apoptotik dan anti-apoptotik. Anggota *Bcl-2 family* yang mendukung program kematian sel misalnya Bax dan Bcl-xS, sedangkan yang menekan program kematian sel misalnya Bcl-2 dan Bcl-xL. Pada kondisi tersebut terjadi peningkatan anggota pro-apoptotik dan penurunan anggota anti-apoptotik.

Pada penelitian sebelumnya yang mempelajari ekspresi Bcl-2 pada percobaan TBI pada tikus, menunjukkan bahwa pada 6 dan 24 jam, Bcl-2 diinduksi dalam ipsilateral kortek peritrauma, hipokampus, dan gyrus dentatus. Pada 72 jam peningkatan Bcl-2 terdeteksi hanya dalam kortek. Bcl-2 diinduksi pada 8, 24, 72, dan 168 jam dalam kortek ipsilateral dan hippocampus. Dari bukti biokimia DNA fragmentasi, baik apoptosis atau nekrosis jarang terlihat pada neuron yang mengekspresikan Bcl-2. Data ini menunjukkan bahwa Bcl-2 memainkan peran penting dalam regulasi kematian neuronal setelah TBI, dan mendukung peran Bcl-2 sebagai gen yang menginduksi efek neuroprotektif (14,15).

Propolis merupakan salah satu sumber zat gizi alami yang berasal dari substrat resin yang dikumpulkan lebah dari sari tunas daun dan kulit batang tanaman yang dicampur dengan enzim dan lilin dari sarang lebah. Kandungan aktif yang diketahui terkandung dalam propolis adalah

polifenol (*flavonoid*, asam fenolat, dan esternya), terpenoid, steroid, dan asam amino. *Flavonoid* merupakan zat yang diketahui banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan dan mempunyai efek antioksidan dalam melumpuhkan radikal bebas. Propolis diketahui mempunyai kandungan *flavonoid* yang tinggi terutama *flavon* dan *flavonone* (5-7). *Flavonoid* mempunyai efek neuroprotektan seperti yang dilaporkan pada penelitian tikus model *focal cerebral ischemia* (MCAO), yang hasilnya signifikan menurunkan Bax, meningkatkan Bcl-2 dan menurunkan caspase 3 (16).

Pada penelitian ini ditemukan hubungan negatif kuat yang signifikan secara statistik antara apoptosis sel otak tikus dan dosis ekstrak propolis. Hal ini mengindikasikan bahwa semakin besar dosis propolis, maka terdapat kecenderungan bahwa akan semakin kecil sel apoptosis. Apoptosis adalah suatu bentuk kematian sel yang terprogram, yang memainkan penting peran dalam embryogenesis dan perkembangan normal dan pemeliharaan banyak jaringan dewasa. Apoptosis diatur ketat oleh ekspresi atau aktivasi beberapa gen dan protein. Berbagai sinyal kematian fisiologis, serta kondisi patologis seluler dapat memicu program apoptosis. Apoptosis mempunyai dua program utama jalur kematian yaitu jalur *caspase* dan disfungsi organel, dimana disfungsi mitokondria sebagai tanda utama. Gangguan pada membran mitokondria (pembukaan *pore* pada membran mitokondria), selanjutnya akan menyebabkan pelepasan *cytochrome-c*, *endonuclease-G* dan AIF. *Cytochrome-c* akan memicu jalur *caspase* yang selanjutnya menyebabkan apoptosis melalui DNA fragmentasi. *Endonuclease G* dan AIF dapat menyebabkan apoptosis tanpa melalui jalur *caspase* (3).

Propolis diketahui mempunyai kandungan flavonoid yang tinggi (5-7). *Flavonoid* mempunyai efek neuroprotektan seperti yang dilaporkan pada penelitian tikus model *focal cerebral ischemia* (MCAO), yang hasilnya signifikan menurunkan Bax, meningkatkan Bcl-2 dan menurunkan *caspase 3* (8). Selain itu penelitian sebelumnya tentang efek pemberian propolis pada tikus model *spinal cord injury*, juga menunjukkan penurunan caspase 3 yang signifikan (9).

Penelitian ini telah membuktikan bahwa ekstrak propolis dapat meningkatkan ekspresi Bcl-2 serta menurunkan apoptosis sel otak tikus model cedera otak traumatik. Penelitian ini dapat menjadi sumber referensi bagi penelitian lanjutan mengenai pemanfaatan propolis sebagai terapi cedera otak traumatik. Perlu dilakukan penelitian uji toksisitas, untuk mengetahui dosis yang berbahaya pada manusia atau makhluk hidup lainnya, dan perlu dilanjutkan dengan penelitian klinis pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Haddad SH and Arabi YM. *Critical Care Management of Severe Traumatic Brain Injury in Adults*. Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation, and Emergency Medicine. 2012; 20: 12
- Hoh NZ, Wagner AK, and Alexander SA. *BCL2 Genotypes: Functional and Neurobehavioral Outcomes after Severe Traumatic Brain Injury*. Journal of Neurotrauma. 2010; 27(8): 1413-1427.
- Zhang X, Chen Y, Jenkins LW, Kochanek PM, and Clark RSB. *Bench-to-Bedside Review: Apoptosis/ Programmed Cell Death Triggered by Traumatic Brain Injury*. Critical Care. 2005; 9(1): 66-75
- Berridge MJ. *Cell Stress, Inflammatory Responses and Cell Death*. Cell Signalling Biology. 2012; 11: 1-29.
- Khalil ML. *Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2006; 7(1): 22-31.
- Halim E, Hardinsyah, Sutandyo N, Sulaeman A, Artika M, and Harahap Y. *Kajian Bioaktif dan Zat Gizi Propolis Indonesia dan Brasil*. Jurnal Gizi dan Pangan. 2012; 7(1): 1-6.

7. Wu Z, Zhu A, Takayama F, et al. *Brazilian Green Propolis Suppresses the Hypoxia Induced Neuroinflammatory Response by Inhibiting NF- κ B Activation in Microglia*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013; 2013: 906726
8. Li S, Wu C, Zhu L, et al. *By Improving Regional Cortical Blood Flow, Attenuating Mitochondrial Dysfunction and Sequential Apoptosis Galangin Acts as a Potential Neuroprotective Agent after Acute Ischemic Stroke*. *Molecules*. 2012; 17(11): 13403-13423.
9. Ozkara E, Durmaz R, Kanbak G, et al. *The Effect of Propolis Following Experimental Spinal Cord Injury*. *World Spinal Column Journal*. 2014; 5(1): 6-11.
10. Marmarou CR, Prieto R, Taya K, Young FH, and Marmarou A. *Marmarou Weight Drop Injury Model*. In: Chen J (Ed). *Animal Models of Acute Neurological Injuries*. New York: Springer; 2007; pp. 393-407.
11. Johnson VJ, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, and Stewart W. *Inflammation and White Matter Degeneration Persist for Years after a Single Traumatic Brain Injury*. *Brain*. 2013; 136(1): 28–42.
12. Werner C and Engelhard K. *Pathophysiology of Traumatic Brain Injury*. *British Journal of Anaesthesia*. 2007; 99(1): 4-9.
13. Syamsudin, Wiryowidagdo S, Simanjuntak P, and Heffen WL. *Chemical Composition of Propolis from Different Region in Java and their Cytotoxic Activity*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2009; 5(4): 180-183.
14. Brunelle JK and Letai A. *Control of Mitochondrial Apoptosis by the Bcl-2 Family*. *Journal of Cell Science*. 2009; 122(4): 437-441.
15. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, and Green DR. *The BCL-2 Family Reunion*. *Molecular Cell*. 2010; 37(3): 299-310.
16. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, and Andrews DW. *Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013; 5(4): a008714