

Artikel Penelitian

Pengaruh Ekstrak Propolis terhadap Apoptosis melalui Ekspresi *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) pada Sel Otak Tikus Model Cedera Otak Traumatik

The Effect of Propolis Extract Administration on Apoptosis through Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Expression in the Rats' Brain Tissue of Traumatic Brain Injury Model

Fathia Annis, Hari Purnomo, Farhad Balafif

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

ABSTRAK

Cedera otak merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada semua kelompok umur. Selama cedera kepala terjadi reaksi kaskade inflamasi yang nantinya akan menyebabkan apoptosis dan nekrosis. Propolis memiliki aktivitas antiinflamasi yang kuat melalui peningkatan ekspresi *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) yang akan berikatan dengan tyrosine kinase-B (trkB) yang akan menghambat apoptosis, sehingga propolis memiliki potensi sebagai alternatif terapi dalam menurunkan apoptosis melalui peningkatan ekspresi BDNF pada cedera otak traumatik. Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh pemberian propolis dalam berbagai dosis pada ekspresi BDNF dan apoptosis di sel otak tikus *Rattus norvegicus* model traumatik. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu: kelompok model trauma dan diberi perlakuan propolis masing-masing dosis 50mg, 100mg, dan 200mg, kontrol positif dan kontrol negatif. Pada akhir penelitian, tikus dikorbankan dan dibuat preparat otak untuk menilai ekspresi BDNF dan apoptosis. Berdasarkan hasil analisa statistik, didapatkan hubungan yang signifikan antara ekspresi BDNF dan apoptosis sel otak tikus model traumatik dengan berbagai dosis propolis ($p=0,001$, $r=0,955$; $p=0,000$, $r=0,904$, korelasi Pearson). Penelitian ini membuktikan bahwa propolis berpengaruh dalam peningkatan ekspresi BDNF dan penurunan apoptosis di sel otak tikus model traumatik.

Kata Kunci: Apoptosis, BDNF, cedera otak traumatik, propolis

ABSTRACT

*Brain injury is the leading cause of morbidity and mortality in all age groups. During Head injury, inflammatory cascade reaction occurs that eventually will lead to apoptosis and necrosis. Propolis has a strong anti-inflammatory activity by inhibiting apoptosis via increased expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) that binds to tyrosine kinase-B (TrkB) and will inhibit apoptosis, so propolis might act as a potential alternative therapy in reducing apoptosis through increasing BDNF expression in traumatic brain injury. This study aimed to examine the effect of propolis administration in different doses on BDNF expression and apoptosis in rat brain cells *Rattus norvegicus* traumatic models. The samples were divided into 5 groups, i.e. model groups of trauma and treated with propolis dose of 50mg, 100mg, and 200mg each, positive control group and negative control group. At the end of the study, the rats were sacrificed and made as brain preparations to assess BDNF expression and apoptosis. Based on statistical analysis, the results showed a significant correlation between BDNF expression and apoptosis of rat model of traumatic brain cells with different doses of propolis ($p=0,001$, $r=0,955$; $p=0,000$, $r=0,904$, Pearson Correlation). This study proved that propolis gives influences in increasing BDNF expression and reducing apoptosis in rat models of traumatic brain cells.*

Keywords: Apoptosis, BDNF, propolis, traumatic brain injury

Korespondensi: Fathia Annis. Laboratorium Ilmu Penyakit Saraf Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang, Jl. Jaksa Agung Suprato No. 2 Malang Tel. (0341) 362101 Email: zeenara06@yahoo.co.id

DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jkb.2017.029.03.5>

PENDAHULUAN

Cedera otak merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada semua kelompok umur. Cedera otak traumatik merupakan cedera kepala yang sering terjadi terutama pada dewasa muda. Terjadi pada sekitar 2% dari seluruh populasi di dunia setiap tahun. Di Indonesia berdasarkan data dari Rumah Sakit Umum Daerah dr. Soetomo Surabaya menunjukkan angka kejadian *traumatic brain injury* sebanyak 2000 kasus tiap tahun (1).

Pada cedera otak dapat terjadi kerusakan otak *irreversibel*, namun perubahan ultrastruktur, *Blood Brain Barrier* (BBB) dan fungsi neuronal yang berlangsung memberikan kemungkinan potensial untuk ditangani (2). Cedera otak traumatik menyebabkan kematian sel dan disfungsi neurologi melalui gangguan fisik terhadap jaringan secara langsung (cedera primer) yang dapat berupa gangguan kortikal langsung, cedera aksonal dan kerusakan vaskuler dan juga melalui mekanisme patofisiologi molekuler dan seluler *reversible* dan lambat (cedera sekunder) (3). Selama cedera kepala terjadi reaksi kaskade inflamasi yang nantinya akan memicu apoptosis sel. Beberapa cedera dengan jenis yang berbeda menyebabkan terbentuknya faktor neurotropik dan sitokin, yang dapat melindungi neuron terhadap adanya *excitotoxicity*. *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) sebagai salah satu neurotropik yang dominan dapat melindungi sel dari adanya apoptosis yang terjadi karena injuri neuron melalui penghambatan aktivasi *caspase 3*. *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) diketahui dapat meningkatkan *N-methyl D-aspartat* (NMDA) dan menginduksi terbentuknya glutamat melalui adanya kalsium, BDNF juga dapat meningkatkan aktivasi reseptor dan transmisi sinaptik (4). Mekanisme apoptosis dapat terjadi melalui dua jalur, yaitu *caspase-dependent* dan *caspase-independent*. *Caspase-dependent pathway* dapat melalui jalur intrinsik yang dipicu oleh kegagalan metabolik mitokondria atau jalur ekstrinsik yaitu kelompok reseptor *tumor necrosis factor* (TNF) (4).

Sampai saat ini, terapi cedera otak traumatik biasanya dengan terapi operatif dan suportif yang difokuskan pada pengendalian hipertensi intrakranial. Terapi yang berorientasi antiinflamasi telah menunjukkan adanya pengaruh neuroprotektif pada model hewan (4). *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) dapat mencegah terjadinya apoptosis dengan beberapa mekanisme yang berbeda, tetapi dapat meningkatkan kerentanan neuron terhadap nekrosis akibat dari *excitotoxicity*. *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) dapat melindungi neuron terhadap apoptosis karena adanya cedera kepala melalui penghambatan aktivasi *caspase 3*. Saat reseptor dari *nerve growth factor* (NGF) yaitu *tyrosine kinase-A* (trkA) diekspresikan pada sejumlah neuron sistem saraf pusat, mRNA dari BDNF dan protein seperti pada reseptor BDNF yaitu *tyrosine kinase-B* (trkB) juga diekspresikan di beberapa tipe dari neuron. Hal ini juga menunjukkan bahwa kadar trkB dan mRNA dari BDNF mengalami up-regulasi di area lesi mengikuti adanya cedera iskemik. Dengan adanya teori ini menjadi pertimbangan bahwa cedera sekunder dapat dicegah dengan meminimalisir apoptosis sehingga diharapkan penelitian ini dapat berguna untuk pengembangan terapi baru untuk menurunkan apoptosis melalui peningkatan BDNF sebagai agen neuroprotektif (5).

Propolis adalah produk lebah, yang mengandung bahan

aktif *flavonoid* yang tinggi berfungsi sebagai antioksidan. Propolis juga sebagai anti inflamasi mampu menurunkan reaksi inflamasi yang terjadi melalui hambatan terhadap aktifitas TNF dan NF- κ B (6,7). Propolis juga dilaporkan mempunyai komponen neuroprotektif yaitu *Caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) yang mempunyai afinitas ikatan yang selektif dengan *human estrogen receptor β* (hER β) dibanding dengan *human estrogen receptor α* (hER α). Estrogen sendiri dapat meningkatkan kadar BDNF pada korteks pre frontal dan hipokampus. Dari sebuah studi menyebutkan bahwa kedua hormon ini yaitu estradiol dan BDNF dapat menginduksi plastisitas dari tulang belakang melalui efek membran yang cepat dan regulasi transkripsional yang lebih lambat melalui jalur *c-AMP respon binding protein* (CREB) (8,9). Lebih dari itu, estradiol meningkatkan kadar *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) melalui aktivasi dari reseptor nuclear. Dengan adanya kandungan antioksidan, antiinflamasi, dan imunomodulator dari propolis diharapkan propolis dapat berperan dalam penatalaksanaan cedera otak traumatik yang belum pernah dilakukan penelitian sebelumnya (10,11).

Kajian tersebut menunjukkan bahwa propolis memiliki potensi sebagai terapi ajuvan dalam menurunkan apoptosis melalui peningkatan ekspresi BDNF pada cedera otak traumatik. Pemberian propolis diharapkan dapat membantu mencegah komplikasi cedera sekunder yang mungkin terjadi. Berdasarkan latar belakang diatas, dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian propolis pada tikus model cedera otak traumatik.

METODE

Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen sebenarnya (*true experimental design*) secara *in vivo* dengan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* pada hewan model tikus wistar (*Rattus norvegicus* galur wistar). Kriteria inklusi yang digunakan adalah tikus putih *Rattus norvegicus* jantan, usia 6-8 minggu, berat 150-200gram, sehat dan aktif, sedangkan kriteria *drop out* adalah tikus yang sakit dan mati pada saat penelitian berlangsung.

Dalam penelitian ini, terdapat tiga kelompok perlakuan dan dua kelompok kontrol, yaitu: kelompok A (model cedera otak traumatik dan diberikan ekstrak propolis 50mg/kgbb), kelompok B (model cedera otak traumatik dan diberikan ekstrak propolis 100mg/kgbb), kelompok C (model cedera otak traumatik dan diberikan ekstrak propolis 200mg/kgbb), kelompok D (kontrol positif, model cedera otak traumatik tanpa diberi ekstrak propolis), dan kelompok E(kontrol negatif, tanpa cedera otak traumatik dan tanpa diberi ekstrak propolis).

Model Cedera Otak Traumatik

Tikus dianestesi kemudian tikus diletakkan dibawah alat penjatuh beban dengan diikat keempat kakinya sehingga terfiksasi dengan alas/dasar yang keras. Silinder besi seberat 45ram (diameter 4mm) dijatuhkan dengan sudut 90° dari ketinggian 100cm sebanyak 1 kali. Benturan dengan energi 0,5 joule (12).

Ekstraksi Propolis

Teknik ekstraksi diawali dengan pembuatan rendemen 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. Hasilnya 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 2-3rpm. Rendemen yang diperoleh tersebut kemudian diencerkan dengan *E-pure* dan *Tween 80*. Terapi propolis diberikan secara oral setiap hari selama 7 hari dengan dosis 50, 100, dan 200mg/kgBB

Isolasi Jaringan Otak

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Anestesi diberikan dengan injeksi ketamine 1mg/kg bb secara intramuskular. Setelah tikus dipastikan tidak sadar (tidak menunjukkan gerakan spontan), tikus dikorbankan dan dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan otak tikus. Hemisfer otak sisi kiri diambil dan dimasukkan kedalam botol yang telah diisi larutan formalin 10%. Selanjutnya dilakukan pengirisan jaringan otak dan pembuatan slide dengan *paraffin block* (pengirisan preparat otak dan pembuatan *slide* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo).

Pemeriksaan BDNF dengan Teknik Imunohistokimia

Langkah pertama adalah deparafinisasi yaitu slide dipanaskan pada suhu 60°C selama 60 menit. Kemudian slide direndam dalam larutan-larutan berikut ini secara berurutan xilol (2 x 10 menit), etanol absolut (2 x 10 menit), etanol 90% (1 x 5 menit), etanol 80% (1 x 5 menit), etanol 70% (1 x 5 menit), akuades steril (3 x 5 menit) secara berurutan dilanjutkan dengan *Antigen Retrieval* dengan bufer sitrat, yaitu preparat direndam dalam *chamber* berisi bufer sitrat pH 6,0; kemudian dipanaskan dalam *waterbath* suhu 95° selama 20 menit. Selanjutnya preparat dikeluarkan dari *waterbath* dan dibiarkan pada suhu ruang selama ± 20 menit.

Pengecatan imunohistokimia dimulai dengan pencucian slide dengan PBS pH 7,4 (3 x 5 menit) dilanjutkan dengan *blocking endogenous peroxidase* 3% H_2O_2 selama 20 menit pada suhu ruang. Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 (3 x 5 menit), diikuti *blocking unspecific protein* menggunakan 3% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 (3 x 5 menit), kemudian slide diinkubasi dalam *rabbit polyclonal anti BDNF mature* (Santa Cruz), pada suhu 4°C selama semalam, lalu dicuci dalam PBS pH 7,4 (3 x 5 menit). Slide diinkubasi dalam antibodi sekunder berlabel biotin *conjugated* selama 60 menit, lalu slide dicuci dalam PBS pH 7,4 (3 x 5 menit). Kemudian dilanjutkan dengan inkubasi dalam SA-HRP selama 40 menit lalu dicuci dengan PBS 3 x 5 menit. Slide ditetesi dengan *Diamino Benzidine* (DAB) dan diinkubasi selama 10 menit, lalu dicuci menggunakan aquades 3 x 5 menit. *Counterstaining* dalam *Mayer Hematoxilen* yang diinkubasi selama 10 menit dan dicuci menggunakan dH_2O . Setelah kering, dilanjutkan dengan *mounting* menggunakan entelan dan ditutup dengan *cover glass*. Slide diamati di bawah mikroskop cahaya. Pemeriksaan dilakukan oleh peneliti dan peneliti yang lain (2 orang) sebanyak 2 kali pemeriksaan.

Penghitungan ekspresi BDNF dilakukan dengan "*host spot*

method." *Slide* diamati dengan pembesaran 400x dan dilakukan penghitungan sel glia yang positif pada 10 lapang pandang dan dicari reratanya. Sel positif ditunjukkan dengan sitoplasma yang terwarnai coklat (14). Hasil pengamatan dikonfirmasi oleh ahli patologi anatomi.

Pemeriksaan Apoptosis dengan Teknik DNA Terfragmentasi (Tunel)

Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 kemudian diinkubasi dalam 20ug/mL proteinase-K selama 15 menit pada suhu 37°C . Selanjutnya slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Slide diinkubasi dalam 3% H_2O_2 selama 15 menit dan selanjutnya dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Slide diinkubasi dengan *Tunel fragmented DNA labelling* selama 60 menit pada 37°C kemudian dicuci menggunakan PBS (3x5 menit), selanjutnya diinkubasi dengan cairan peroksidase selama 40 menit pada 37°C . Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 (3x5 menit), kemudian ditetesi (*DAB-Diamino Benzidine*) selama 20 menit pada suhu ruang. Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit) dan *Counterstain* dengan *Mayer hematoxilen* selama 10 menit, dibilas dengan air kran dan dicuci dengan H_2O . Kemudian dikeringkan dan ditutup *cover glass*. Slide diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, sel-sel apoptosis ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel. Pemeriksaan dilakukan oleh peneliti dan peneliti lain (2 orang) sebanyak 2 kali pemeriksaan.

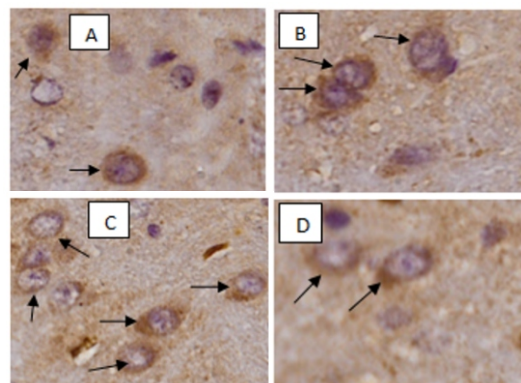
Analisis Statistik

Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *one-way ANOVA*, dilanjutkan dengan *LSD Post Hoc Test (Tukey HSD)*, uji korelasi Pearson, dan regresi linier. Hasil uji statistik dianggap bermakna secara statistik bila $p < 0,05$.

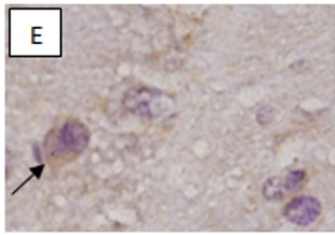
HASIL

Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis terhadap Ekspresi BDNF pada Tikus Wistar Model Cedera Otak Traumatik

Tujuan mengetahui ekspresi BDNF pada tikus wistar model cedera otak traumatik ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian propolis yang diduga dapat meningkatkan ekspresi BDNF yang secara fisiologis telah diproduksi oleh tubuh sebagai respon terhadap adanya cedera. Gambar 1 menunjukkan adanya peningkatan ekspresi BDNF seiring dengan peningkatan dosis propolis yang diberikan pada tikus model cedera otak traumatik.



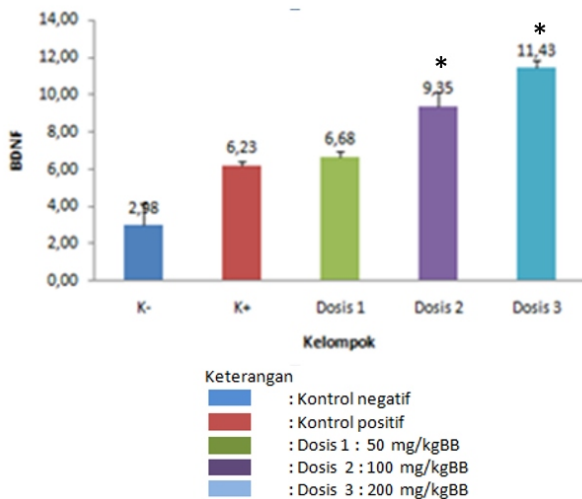
Gambar 1. Hasil pengecatan Imunohistokimia kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. (Mikroskop pembesaran 400x)



Gambar 1. Hasil pengecatan Imunohistokimia kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. (Mikroskop pembesaran 400x)(Lanjutan)

Keterangan: A. Perlakuan dosis ekstrak propolis 50 mg/kgbb. B. Perlakuan dosis ekstrak propolis 100 mg/kgbb. C. Perlakuan dosis ekstrak propolis 200 mg/kgbb. D. Kontrol (+). E. Kontrol (-).Tanda panah hitam menunjukkan sel yang mengekspresikan BDNF. Hasil pengecatan ini diperoleh dari 4 kali pengulangan dengan hasil yang relatif sama

Pada analisis statistik *oneway* Anova diperoleh *p value*<0.001, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata nilai BDNF pada masing-masing perlakuan. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut *Tukey HSD*. Diperoleh hasil bahwa antar perlakuan memberikan hasil yang saling berbeda kecuali untuk Kontrol+ dan dosis 1. Dengan demikian, perlakuan dosis 50mg/kgBB/hari (dosis 1) kurang efektif dalam meningkatkan ekspresi BDNF, karena hasilnya tidak berbeda nyata dengan kontrol+, sedangkan dosis propolis yang efektif dalam meningkatkan ekspresi BDNF adalah dosis 200 mg/kgBB/hari (dosis 3). Gambar 2 berikut menyajikan perbandingan rata-rata ekspresi BDNF antar perlakuan.



Gambar 2. Histogram rata-rata ekspresi BDNF kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

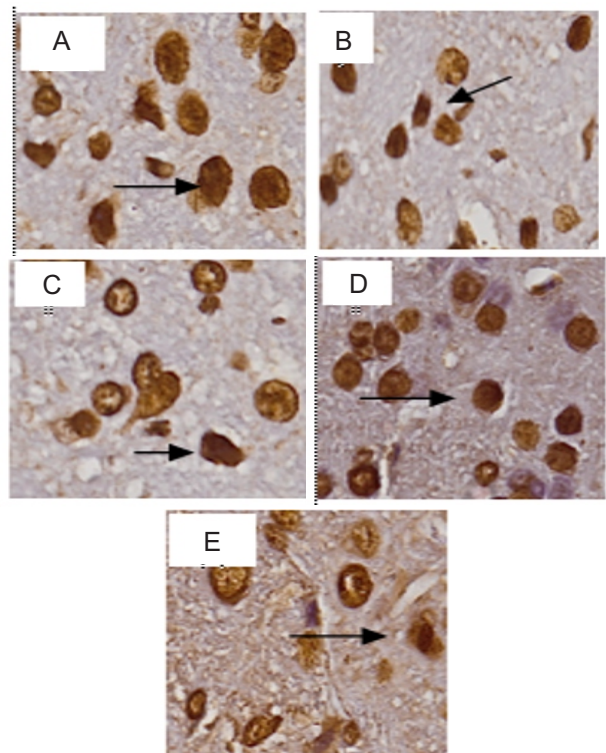
(*) menandakan angka signifikan dibandingkan dengan kontrol (+) (*p value* <0,005).

Untuk mengetahui hubungan yang signifikan antara besarnya dosis dengan nilai BDNF maka selanjutnya dilakukan analisis korelasi Pearson, diperoleh *p*=0,001 dengan nilai korelasi positif. Artinya semakin besar dosis ekstrak propolis, maka ekspresi BDNF akan semakin meningkat. Uji regresi mendapatkan nilai *R Square* (*R*²)

sebesar 0,912, yang artinya 91,2% nilai BDNF dipengaruhi oleh dosis ekstrak propolis sedangkan sisanya sebesar 8,8% dipengaruhi oleh faktor lain diluar ekstrak propolis yang diberikan.

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

Tujuan mengetahui jumlah sel yang mengalami apoptosis pada tikus wistar model cedera otak traumatik ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian propolis yang diduga dapat menurunkan apoptosis yang secara fisiologis akan terjadi saat ada maupun tidak adanya cedera. Pada penelitian ini diteliti sel yang mengalami apoptosis karena adanya cedera otak traumatik. Gambar 3 menunjukkan adanya penurunan jumlah sel yang mengalami apoptosis seiring dengan peningkatan dosis propolis yang diberikan pada tikus model cedera otak traumatik

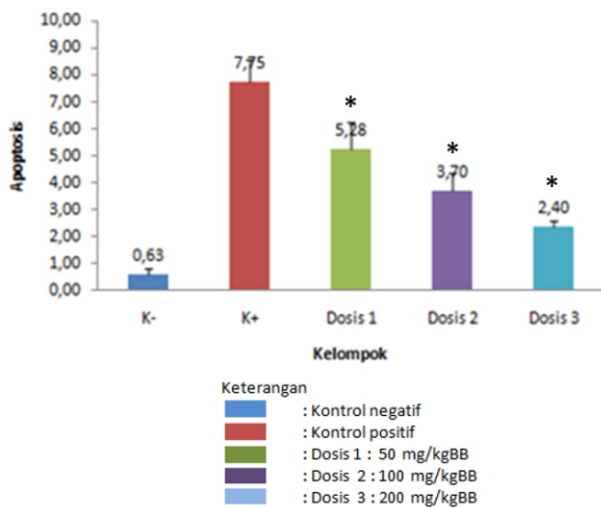


Gambar 3. Ekspresi apoptosis dengan imunohistokimia Tunel Assay pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (pembesaran 400x sebanyak 10 lapangan pandang)

Keterangan: Sel apoptosis ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel (panah hitam).

A. Kelompok dosis 1 (ekstrak propolis 50 mg/kgbb); B. Kelompok dosis 2 (ekstrak propolis 100 mg/kgbb); C. Kelompok dosis 3 (ekstrak propolis 200 mg/kgbb). D. Kelompok kontrol positif; E. Kelompok kontrol negatif. Hasil di atas diperoleh dengan 4 kali pengulangan dan didapatkan hasil yang relatif sama

Pada analisis statistik *oneway* ANOVA didapatkan *p value*=0,000, yang berarti terdapat perbedaan rata-rata nilai apoptosis pada tiap-tiap perlakuan. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut *Tukey HSD* dan diperoleh dosis antar perlakuan memberikan hasil yang saling berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian dosis perlakuan berupa perbedaan dosis memberikan hasil rata-rata apoptosis yang saling berbeda nyata.



Gambar 4. Histogram rata-rata nilai apoptosis kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Keterangan: Kelompok perlakuan dosis 2 memiliki efektivitas yang lebih baik dalam menurunkan apoptosis. (*) menandakan $p < 0,005$ bila dibandingkan dengan kontrol (+).

Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* didapatkan p value=0,000 ($< 0,05$) $r = -0,904$ yang berarti terdapat hubungan signifikan antara dosis perlakuan dengan nilai apoptosis. Hasil korelasi yang diperoleh bernilai negatif, yaitu terdapat hubungan yang tidak searah (terbalik). Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar dosis ekstrak propolis, maka ekspresi sel apoptosis akan semakin menurun. Hasil uji regresi didapatkan nilai *R Square* (R^2) sebesar 0,818, yang artinya 81,8% nilai apoptosis dipengaruhi oleh dosis ekstrak propolis sedangkan sisanya sebesar 18,2% dipengaruhi oleh faktor lain diluar ekstrak propolis yang diberikan.

Hubungan antara ekspresi BDNF dan Apoptosis

Pada analisis korelasi *Pearson* didapatkan p value 0,000 yang berarti terdapat hubungan signifikan antara ekspresi BDNF dengan apoptosis. Hubungan antara ekspresi BDNF dengan nilai apoptosis pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai *Pearson correlation* $p < 0,001$, $r = -0,840$. Hasil korelasi yang diperoleh bernilai negatif, yang berarti terdapat hubungan yang tidak searah. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi ekspresi BDNF maka sel apoptosis akan semakin rendah.

DISKUSI

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan kemampuan ekstrak propolis dalam meningkatkan ekspresi BDNF dan menurunkan sel apoptosis yang berlebihan pada sel otak tikus. Pembuatan model tikus wistar cedera otak traumatik dilakukan dengan melakukan penjatuhan beban silinder besi seberat 45gram (diameter 4mm) dengan sudut 90° dari ketinggian 100cm sebanyak 1 kali. Beban tersebut mengenai bagian tengah depan antara kedua hemisfer otak tikus, sehingga tikus akan mengalami kontusio serebri dan cedera otak ringan (14).

Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis terhadap Ekspresi BDNF

Hasil analisis *oneway ANOVA* didapatkan $p < 0,001$ yang berarti paling tidak terdapat 1 perbedaan rata-rata nilai

ekspresi BDNF di antara kelompok kontrol dan perlakuan. Hasil uji *Tukey HSD* menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan tikus model cedera otak traumatik yang diberikan ekstrak propolis dosis 2(100mg/kgbb), maupun dosis 3 (200mg/kgbb) menunjukkan peningkatan ekspresi BDNF yang signifikan dibandingkan kelompok tikus kontrol (+). Namun untuk dosis 1 (50mg/kgBB) tidak diperoleh perbedaan yang nyata dengan kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian propolis dengan dosis 1 kurang efektif dalam meningkatkan BDNF, sedangkan dosis propolis yang efektif dalam meningkatkan ekspresi BDNF adalah dosis 3 (200mg/kgBB).

Terdapat hubungan positif yang signifikan antara dosis perlakuan dengan nilai BDNF. Hasil analisis regresi linier didapatkan 91,2% nilai BDNF dipengaruhi oleh dosis ekstrak propolis sedangkan sisanya sebesar 8,8% dipengaruhi oleh faktor lain diluar ekstrak propolis yang diberikan. Peningkatan ekspresi BDNF setelah perlakuan dosis propolis dapat dijelaskan seperti berikut. Propolis adalah produk lebah, yang mengandung *flavonoid* tinggi yang mempunyai efek antioksidan dan anti inflamasi yang kuat. Propolis mampu menurunkan reaksi inflamasi melalui hambatan terhadap aktifitas TNF dan NF-kB (15). Propolis juga mempunyai komponen neuroprotektif yaitu CAPE yang dapat menekan reperfusi iskemia akibat cedera otak dan melindungi medula spinalis dari cedera iskemia reperfusi (16,17). Selain itu CAPE merupakan bahan aktif yang terdapat pada propolis dengan struktur yang mirip dengan asam phenolic. Efek estrogenik dari propolis ditunjukkan melalui aktivasi estrogen reseptor. CAPE mempunyai afinitas ikatan yang selektif dengan *human estrogen receptor* β (hER β) dibanding dengan hER α . Estrogen sendiri dapat meningkatkan kadar BDNF pada korteks pre frontal dan hipokampus. Hormon estradiol dan BDNF dapat menginduksi plastisitas dari tulang belakang melalui efek membran yang cepat dan regulasi transkripsional yang lebih lambat melalui jalur CREB. Lebih dari itu, estradiol meningkatkan kadar BDNF melalui aktivasi dari reseptor nuclear (18). Peningkatan ekspresi BDNF pada penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh karena adanya komponen yang terkandung dalam ekstrak propolis yaitu *flavonoid* dan CAPE.

Pengaruh Pemberian Ekstrak Propolis terhadap Apoptosis

Hasil menunjukkan perlakuan dosis yang paling efektif adalah perlakuan dosis 3 (200mg/kgbb) karena memiliki rata-rata yang berbeda nyata dengan nilai perlakuan dosis 1 dan mendekati nilai kontrol negatif (K-). Terdapat hubungan negatif yang signifikan antara dosis perlakuan dengan nilai apoptosis. Penurunan sel apoptosis setelah pemberian perlakuan propolis dapat dijelaskan seperti berikut ini. Apoptosis adalah suatu bentuk kematian sel yang terprogram. Apoptosis diatur ketat oleh ekspresi atau aktivasi beberapa gendan 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, dengan disfungsi mitokondria sebagai tanda utama. Gangguan 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, sedangkan endonuclease G dan AIF dapat menyebabkan apoptosis tanpa melalui jalur *caspase* (19).

Propolis diketahui mempunyai kandungan *flavonoid* yang

tinggi. Penelitian sebelumnya didapatkan bahwa *flavonoid* pada propolis berikatan dengan protein plasma dan dapat menembus BBB. *Flavonoid* mempunyai efek neuroprotektan seperti yang dilaporkan pada penelitian tikus model *focal cerebral ischemia*, yang hasilnya signifikan menurunkan Bax, meningkatkan Bcl-2 dan menurunkan *caspase 3*. Penelitian 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 (20).

Beberapa penelitian juga telah melaporkan bahwa ekstrak propolis yang mengandung CAPE menunjukkan potensi yang besar dalam modulasi kaskade *arachidonic acid*. Juman *et al*, melaporkan bahwa CAPE menunjukkan pengaruh inhibisi pada produksi sitokin proinflamasi (interleukin (IL)-1 β , TNF- α , dan MCP-1. Propolis mempunyai komponen neuroprotektif melalui pengaruh antioksidan, anti inflamasi dan *immunomodulator*. *Oxygen-derived free radical* mempunyai implikasi terhadap patogenesis cedera otak setelah iskemia-reperfusi. CAPE memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Pemberian CAPE dan *alpha-tocopherol* menekan reperfusi iskemia akibat *cerebral lipid peroxidation* dan cedera otak. Penurunan sel apoptosis pada penelitian model tikus cedera otak traumatik ini

kemungkinan disebabkan oleh karena adanya kandungan *flavonoid* dan CAPE dari ekstrak propolis (21).

Hubungan Ekspresi BDNF dan Apoptosis

Hasil menunjukkan semakin meningkat ekspresi BDNF maka sel apoptosis semakin menurun. Penurunan apoptosis yang dikaitkan dengan peningkatan BDNF dapat dijelaskan sebagai berikut. Sebagai bagian dari *growth hormone*, BDNF menginduksi kemampuan bertahan hidup, diferensiasi dan pertumbuhan sel saraf. BDNF merangsang kemampuan bertahan hidup dari sel-sel saraf dengan mencegah kematian sel saraf yang terprogram (apoptosis). Ikatan neurotrophin dengan tyrosin kinase reseptor menstimulus reseptor *tyrosine phosphorylation* guna mengaktifkan jalur inhibisi dari apoptosis (22). Peran BDNF mencegah apoptosis dengan ikatan dengan Trk reseptor. CAPE dalam ekstrak propolis dapat meningkatkan ekspresi BDNF melalui ikatan dengan reseptor estrogen. Estrogen sendiri dapat meningkatkan kadar BDNF. Dengan pemberian ekstrak propolis, maka selain respon inflamasi dan mediator inflamasi yang berlebihan dapat dihambat, sehingga proses apoptosis pun dapat dihambat, juga dapat meningkatkan ekspresi BDNF melalui bahan aktifnya yaitu CAPE (23).

Dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak propolis pada tikus dengan cedera otak traumatik mampu meningkatkan ekspresi BDNF dan menurunkan apoptosis pada sel otak tikus model cedera otak traumatik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kasan U. *Cidera Kepala, Patofisiologi, Penanganan, dan Biomolekuler*. Surabaya: Bagian Ilmu Bedah Saraf RSUD Dr Soetomo; 2006.
2. Ahmad A, Crupi R, Campolo M, Genovese T, Esposito E, and Cuzzocrea S. *Absence of TLR4 Reduces Neurovascular Unit and Secondary Inflammatory Process after Traumatic Brain Injury in Mice*. Plos ONE. 2013; 8(3): 224-230 .
3. Alzheimer C. *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002.
4. Pittella JE and Gusmao SN. *Diffuse Vascular Injury In Fatal Road Traffic Accident Victims: Its Relationship to Diffuse Axonal Injury*. Journal of Forensic Sciences. 2003; 48(3): 626–630.
5. Namas R, Ghuma A, Hermus L, *et al*. *The Acute Inflammatory Response in Trauma/Hemorrhage and Traumatic Brain Injury: Current State and Emerging Prospects*. Libyan Journal of Medicine. 2010; 4(3): 97-103.
6. 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. Fialkow L, Wang Y, and Downey GP. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species as Signaling Molecules Regulating Neutrophil Function*. Free Radical Biology and Medicine. 2007; 42(2): 153-164.
8. Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, *et al*. *Preventive and Protective Effects of Turkish Propolis on H₂O₂ Induced DNA Damage in Foreskin Fibroblast Cell Lines*. Acta Biologica Hungarica. 2011. 62(4): 388–396.
9. Powers SK, Talbert EE, and Adhietty PJ. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species as Intracellular Signals in Skeletal Muscle*. Journal of Physiology. 2011; 589(9): 2129–2138.
10. Daleprane JB and Abdalla DS. *Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective and Antiangiogenic Actions*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 23(3): 1-8.
11. Kurek-Gorecka K, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M, and Świerczek-Zięba G. *Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis*. Molecules. 2014; 19(1): 78-101.
13. Marmarou A, Signoretti S, Fatouros PP, Portella G, Aygok GA, and Bullock MR. *Predominance of Cellular Edema in Traumatic Brain Swelling in Patients with Severe Head Injuries*. Journal of Neurosurgery. 2006; 104(5): 720–730.
14. 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.
15. Nortje J and Gupta AK. *The Role of Tissue Oxygen Monitoring in Patients with Acute Brain Injury*. British Journal of Anaesthesia. 2006; 97(1): 95-106.
16. Newairy A and Abdou HM. *Effect of Propolis Consumption on Hepatotoxicity and Brain Damage in Male Rats Exposed to Chlorpyrifos*. African Journal of Biotechnology. 2013; 12(33): 5232-5243.
17. 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
18. Zhang X, Chen Y, Jenkins LW, Kochanek PM, and Clark R S B. *Bench-To-Bedside Review: Apoptosis/Programmed Cell Death Triggered by Traumatic Brain Injury.* Critical Care. 2005; 9(1): 66-75.
 19. Hoh NZ. *BCL-2 Genotypes and Outcomes after Traumatic Brain Injury.* [Dissertation]. University of Pittsburgh, Pennsylvania. 2008.
 20. Berridge MJ. *Cell Stress, Inflammatory Responses and Cell Death.* Cell Signalling Biology. 2012; 11: 1-6.
 21. Lotfy M. *Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease.* The Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2006; 7: 22-31.
 22. 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: 10.
 23. Tolba MF, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Rahman SZ, and Abdel-Naim AB. *Caffeic Acid Phenethyl Ester, a Promising Component of Propolis with a Plethora of Biological Activities: A Review on its Anti-inflammatory, Neuroprotective, Hepatoprotective, and Cardioprotective Effects.* International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life. 2013; 65(8): 699-709.
 24. Ozdem TA, Sarmilmaz M, Kus I, et al. *Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Prevents Formaldehyde-Induced Neuronal Damage in Hippocampus of Rat.* Neuroanatomy. 2007; 6: 66-71.