

***Citotoxicity Test of Apis trigona Bees' Ethanol Extract of Propolis
on Fibroblast Culture Viability
(in vitro)***

Akhmad Faried Fauzi¹
Arya Adiningrat²

¹Dentistry Student, Faculty of Medicine and Health Science UMY

²Oral Science Department, Faculty of Medicine and Health Science UMY

ABSTRACT

Background : Propolis is a dark and sticky substance produced by bees. Propolis in the world of health was known to have benefits as anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, antiviral, antifungal, and antitumor. However, propolis has the potential of being toxic if used as herbal medicine. **Purpose** : This study aim is to tests the effect of cytotoxic ethanol extract of propolis (EEP) on viability of cultured fibroblast cells.. **Method** : The design of this study was pure laboratory experimental in vitro. Propolis used comes from Apis trigona bees and extracted using 40% ethanol. EEP is then used as a treatment on Human Dermal Fibroblast adult (HDFa) cells. The cytotoxic effects of EEP were analyzed based on viability of fibroblast cells calculated by the method of MTT assay. **Results** : EEP with a concentration of 500 µg / mL had the highest cytotoxic effect because it resulted in a culture of fibroblasts having viability of 8.44%. EEP-treated fibroblast cells show a morphological change observed under a microscope. Morphological changes show few cells become smaller and rounder. Statistical analysis was done by using Spearman correlation test. The coefficient of correlation shows ($r = -0,839$) which means there is a strong and opposite relationship between giving EEP various concentrations and viability of fibroblast cells. **Conclusion** : EEP showed the presence of dose-dependent cytotoxicity on fibroblasts' viability.

Keyword : Ethanol Extract of Propolis, Human Dermal Fibroblast adult, Cell Viability, MTT Assay.

**Uji Sitotoksisitas Ekstrak Etanol Propolis Lebah *Apis Trigona*
Terhadap Viabilitas Kultur Fibroblas
(*In Vitro*)**

Akhmad Faried Fauzi¹
Arya Adiningrat²

¹ Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter Gigi

² Dosen Program Studi Pendidikan Dokter Gigi

INTISARI

Latar Belakang : Propolis merupakan substansi berwarna gelap dan bersifat lengket yang dihasilkan oleh lebah. Propolis dalam dunia kesehatan diketahui memiliki manfaat sebagai antiinflamasi, antioksidan, antibakteri, antivirus, antifungal, dan antitumor. Disamping manfaatnya, propolis memiliki potensi bersifat toksik apabila digunakan sebagai obat herbal. **Tujuan :** Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek sitotoksik ekstrak etanol propolis (EEP) terhadap viabilitas kultur sel fibroblas. **Metode :** Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratoris murni secara *in vitro*. Propolis yang digunakan berasal dari lebah *Apis trigona* dan diekstrak menggunakan etanol 40%. EEP kemudian digunakan sebagai perlakuan pada sel *Human Dermal Fibroblast adult* (HDFa). Efek sitotoksik EEP dianalisa berdasarkan viabilitas sel fibroblas yang dihitung menggunakan metode *MTT assay*. **Hasil :** EEP dengan konsentrasi 500 µg/mL memiliki efek sitotoksik tertinggi karena menyebabkan kultur fibroblas mengalami viabilitas terendah sebesar 8,44%. Sel fibroblas yang diberi perlakuan EEP menunjukkan perubahan morfologi apabila diamati dibawah mikroskop. Perubahan morfologi menunjukkan beberapa sel menjadi lebih kecil dan berbentuk bulat. Analisa data secara statistik dilakukan menggunakan uji korelasi *Spearman*. Koefisien korelasi menunjukkan ($r = -0,839$) yang berarti terdapat hubungan kuat dan berlawanan arah antara pemberian EEP berbagai macam konsentrasi dan viabilitas sel fibroblas. **Kesimpulan :** EEP menunjukkan adanya *dose-dependent cytotoxicity* terhadap viabilitas sel fibroblas.

Kata kunci: Ekstrak Etanol Propolis, *Human Dermal Fibroblast adult*, Viabilitas Sel, *MTT Assay*.

Pendahuluan

Propolis atau yang biasa disebut *bee glue* merupakan salah satu produk yang dihasilkan oleh lebah. Propolis adalah substansi berwarna hitam dan bersifat lengket yang dikumpulkan oleh koloni lebah dari getah pohon dan dicampur dengan lilin lebah/*bees wax* dan enzim lebah itu sendiri¹¹. Lebah menggunakan propolis sebagai penutup lubang dan celah pada sarangnya, sebagai pelapis yang berfungsi melindungi bagian dalam sarang dari gangguan eksternal misalnya serangga, ngengat, tikus, cuaca, dan sebagai antibakteri⁶.

Umumnya propolis mengandung resin (50%), wax (30%), minyak esensial (10%), polen (5%), dan komponen organik lain (5%)^{8,13}. Kandungan senyawa dalam propolis dapat beragam tergantung dari : 1) Sumber makanan lebah penghasil propolis, 2) Iklim, 3) Kondisi lingkungan sekitar dimana lebah itu tinggal¹³. Senyawa kimia organik yang ditemukan terkandung dalam propolis adalah beberapa golongan senyawa polifenol seperti asam benzoat dan turunannya, alkohol sinamit, asam sinamit beserta turunannya, sesquiterpen dan hidrokarbon triterpen; benzaldehid dan turunannya; alkohol, keton, dan senyawa heteroaromatik; terpen, alkohol sesquiterpen dan turunannya; hidrokarbon alifatik; beberapa mineral; sterol dan hidrokarbon steroid; gula dan asam amino^{2,13,14}

Propolis diketahui memiliki potensi sebagai bahan obat herbal karena dapat berfungsi sebagai anti-inflamasi, antioksidan, antivirus, antibakteri, antifungal, antiprotozoa, antitumor dan antidiabetik^{13,14}. Efek terapi propolis diduga berasal dari kandungan senyawa flavonoid³.

Seperti yang diketahui, masyarakat Indonesia gemar mengonsumsi herbal sebagai upaya pengobatan dan menjaga kesehatan, dikarenakan mayoritas masyarakat menganggap bahan herbal tidak memiliki efek samping seperti obat buatan pabrik pada umumnya. Menurut beberapa studi, bahan herbal sekalipun dapat bersifat toksik apabila dikonsumsi dalam dosis yang berlebih⁷.

Oleh karena potensi toksik yang mungkin ditimbulkan oleh konsumsi bahan herbal, maka diperlukan uji toksisitas terhadap propolis. Uji toksisitas dimulai dari fase pre-klinik menggunakan sel⁴.

Metode

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris murni *in vitro*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) unit III Universitas Gadjah Mada. Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-April 2017. Subyek penelitian ini adalah propolis yang diekstrak dengan larutan etanol 40% kemudian diencerkan untuk mendapatkan 30 jenis konsentrasi. Konsentrasi tertinggi yang digunakan adalah 3000 µg/mL dan konsentrasi terendah adalah 0,19531 µg/mL.

Pada plate 96 well, menambahkan masing-masing sebanyak 100 µL suspensi sel dengan kepadatan 2×10^4 sel/*well* kemudian didiamkan selama 1-2 jam. Ekstrak dengan berbagai konsentrasi dosis ditambahkan sebanyak 100 µL.

Inkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam (kadar CO₂ 5%, suhu 37°C, kelembaban 98%), setelah 24 jam dilihat dibawah mikroskop dan difoto. Setelah itu medium yang ada dibuang dengan cara membalik 96 well plate pada kertas tissue. Menambahkan 100 µL MTT (5mg MTT + 9ml medium RPMI komplit/medium penumbuh) pada masing-masing well. Inkubasi selama 4-6 jam lalu menambahkan *stop solution* 100 µL pada masing-masing well. Inkubasi over night kemudian 96-well plate dibaca absorbansi setiap sumurannya pada ELISA reader panjang gelombang 550 nm. Pembacaan dengan ELISA Reader akan menghasilkan angka absorbansi tiap sumuran. Persamaan untuk menghitung viabilitas sel adalah sebagai berikut⁵ :

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\text{AER Kelompok Perlakuan}}{\text{AER Kontrol Sel}} \times 100\%$$

AER : Besar absorbansi menggunakan *ELISA Reader*

Data yang sudah diperoleh kemudian di olah menggunakan SPSS for windows dilakukan uji normalitas dengan Saphiro-Wilk dilanjutkan uji korelasi *Spearman* untuk melihat ada hubungan antara pemberian EEP berbagai macam konsentrasi dengan viabilitas sel fibroblas.

Hasil penelitian

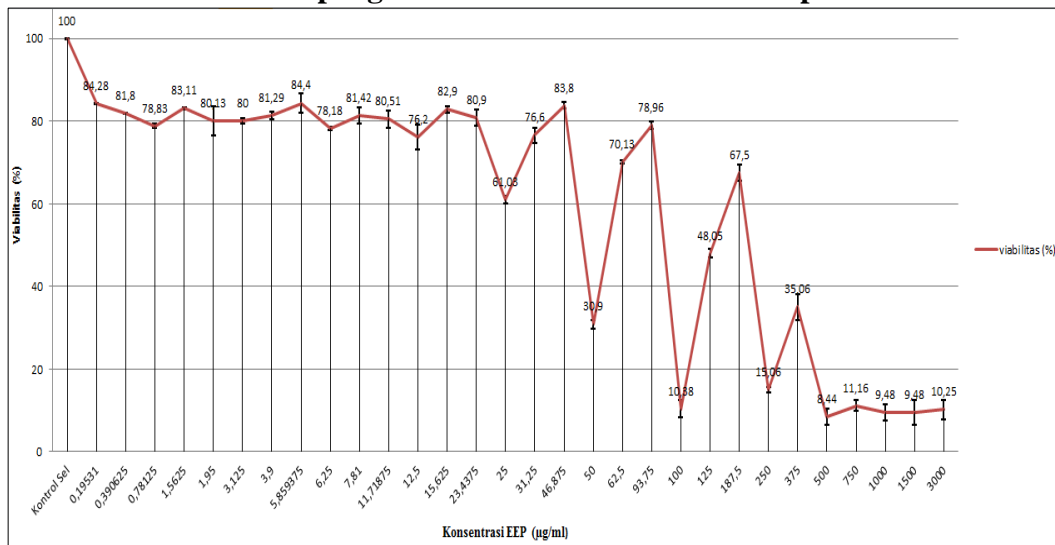
Berikut ini adalah data konsentrasi EEP dan viabilitas sel fibroblas. Viabilitas dinyatakan dalam satuan persen (%).

Tabel 1. Konsentrasi EEP dan Viabilitas Sel Fibroblas

| Konsentrasi EEP (µg/mL) | Viabilitas Sel Fibroblas (%) | Konsentrasi EEP (µg/mL) | Viabilitas Sel Fibroblas (%) |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Kontrol Sel | 100 | 25 | 61,03 |
| 3000 | 10,25 | 23,4375 | 80,9 |
| 1500 | 9,48 | 15,625 | 82,9 |
| 1000 | 9,48 | 12,5 | 76,2 |
| 750 | 11,16 | 11,71875 | 80,51 |
| 500 | 8,44 | 7,81 | 81,42 |
| 375 | 35,06 | 6,25 | 78,18 |
| 250 | 15,06 | 5,859 | 84,4 |
| 187,5 | 67,5 | 3,9 | 81,29 |
| 125 | 48,05 | 3,125 | 80 |
| 100 | 10,38 | 1,95 | 80,13 |
| 93,75 | 78,96 | 1,5625 | 83,11 |
| 62,5 | 70,13 | 0,78125 | 78,83 |
| 50 | 30,9 | 0,390625 | 81,8 |
| 46,875 | 83,8 | 0,19531 | 84,28 |
| 31,25 | 76,6 | | |

Tabel 1 menunjukkan viabilitas sel fibroblas setelah 30 jam diberi perlakuan EEP berbagai konsentrasi. EEP yang memiliki sitotoksitas tertinggi adalah EEP dengan konsentrasi 500 µg/mL karena menyebabkan viabilitas fibroblas terkecil yaitu 8,44% (toksik berat). EEP yang memiliki sitotoksitas terendah adalah EEP dengan konsentrasi 5,859 µg/mL dan menyebabkan viabilitas fibroblas 84,4% (toksik ringan)⁵.

Gambar 1. Grafik pengaruh konsentrasi EEP terhadap viabilitas sel



Analisa data secara statistik diawali dengan melakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Uji normalitas didapat bahwa nilai (p)=0,000. Nilai probabilitas dapat dikatakan terdistribusi normal apabila $p > 0,05$, sehingga data pada penelitian ini tidak terdistribusi normal.

Tabel 2. Uji Normalitas

| | Shapiro-Wilk | | |
|------------|--------------|----|------|
| | Statistic | df | Sig. |
| Viabilitas | ,775 | 31 | ,000 |

Analisa data selanjutnya adalah uji korelasi. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara dua variabel numerik. Uji korelasi yang digunakan adalah uji korelasi *Spearman* karena data berjenis non-parametrik. Hasil pengujian dinyatakan dalam koefisien korelasi (r).

Tabel 3. Uji Korelasi Spearman

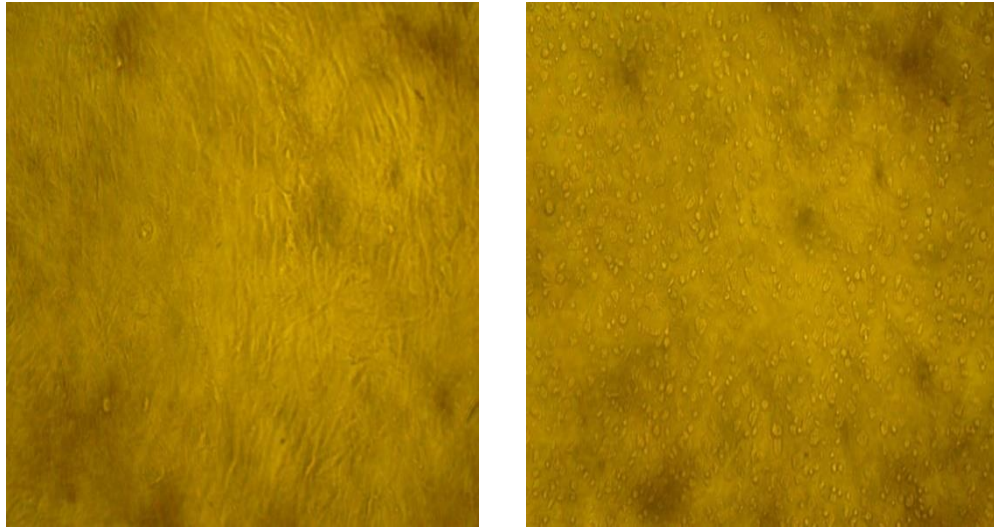
| | | Konsentrasi EEP | Viabilitas Fibroblast |
|-------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------|
| Konsentrasi EEP | Correlation Coefficient | 1,000 | -,839** |
| | Sig. (2-tailed) | . | ,000 |
| | N | 31 | 31 |
| | Viabilitas Fibroblast | -,839** | 1,000 |
| Correlation Coefficient | -,839** | 1,000 | |
| Sig. (2-tailed) | ,000 | . | |
| N | 31 | 31 | |

Hasil perhitungan menyatakan koefisien korelasi (r) sebesar $-0,839$ yang berarti terdapat hubungan kuat antara konsentrasi EEP dan viabilitas fibroblas. Tanda negatif (-) menunjukkan hubungan yang berlawanan arah, yang berarti semakin besar konsentrasi EEP maka semakin kecil viabilitas fibroblas *vice versa*¹².

Pembahasan

Data viabilitas sel pada tabel 1 menunjukkan seluruh konsentrasi EEP pada penelitian ini tidak ada yang memenuhi kriteria biokompatibel ($>90\%$ viabilitas)⁵. EEP dengan konsentrasi $5,859375 \mu\text{g/mL}$ diketahui memiliki efek sitotoksik paling rendah dibanding sampel lain dengan menunjukkan viabilitas sel $84,4\%$ (toksik ringan). Konsentrasi terkecil pada penelitian ini yaitu $0,19531 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan persentase viabilitas sebesar $84,28\%$ (toksik ringan). Dapat diasumsikan bahwa, konsentrasi EEP yang mungkin bersifat biokompatibel berada dibawah $0,19531 \mu\text{g/mL}$.

Efek sitotoksik EEP dapat menyebabkan perubahan morfologi pada sel ketika diamati dibawah mikroskop. Morfologi sel fibroblas normal adalah memanjang dengan batas tidak tegas. Pada sel yang mengalami stress akibat paparan EEP, morfologinya berubah menjadi membulat⁹.



Gambar 2. Morfologi sel fibroblas normal (kiri) Fibroblas yang diberi paparan EEP 3000 µg/mL menunjukkan morfologi membulat (kanan).

Propolis dapat memicu aktivitas pro-apoptosis pada berbagai jenis sel neoplastik (kanker) maupun sel normal. Aktivitas pro-apoptosis disebabkan terutama oleh kandungan flavonoid (quersetin, apigenin, galangin, pinosembrin, dan pinostrobin). Efek sitotoksik propolis dapat menyebabkan kematian sel terjadi karena induksi apoptosis melalui *pathway* enzim *capcase-3*¹⁰.

Kesesuaian hasil penelitian ini terhadap hipotesa *dose-dependent cytotoxicity* dapat dilihat dari hasil uji korelasi pada gambar 1 dan tabel 3. Uji korelasi menyatakan hubungan kuat dan berlawanan arah antara konsentrasi EEP dan viabilitas sel fibroblas, Grafik pada gambar 1 menunjukkan adanya penurunan viabilitas seiring peningkatan konsentrasi EEP. Dari analisa data tersebut maka dapat disimpulkan bahwa EEP memiliki *dose-dependent cytotoxicity* terhadap viabilitas sel fibroblas.

Penelitian serupa meneliti efek sitotoksik galangin (salah satu senyawa derivat flavonoid yang terdapat dalam propolis) terhadap *cell line* V79 (fibroblas paru-paru *Cricetulus griceus*). Sel V79 diberi perlakuan pemberian galangin dengan konsentrasi 1µM, 5µM, 25µM, 50µM, 100 µM, 200µM, 500µM. Secara umum, galangin memiliki aktivitas *dose-dependent cytotoxicity* terhadap sel V79¹.

Kesimpulan

1. Ekstrak etanol propolis (EEP) menunjukkan adanya *dose-dependent cytotoxicity* terhadap viabilitas sel *Human Dermal Fibroblast adult* (HDFa).
2. Tidak ada konsentrasi EEP dalam penelitian ini yang bersifat biokompatibel (>90% viabilitas) terhadap sel HDFa.

Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi EEP *Apis trigona* yang bersifat biokompatibel terhadap sel fibroblas.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa apa saja yang terkandung dalam Ekstrak Etanol 40% Propolis *Apis trigona*.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek sitotoksik EEP *Apis trigona* yang diekstrak menggunakan etanol selain 40% terhadap viabilitas sel fibroblas.
4. Diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan formulasi propolis yang berbeda.

Daftar Pustaka

1. Bacanli, M., Basaran, A., Basaran, N., 2016. The antioxidant, cytotoxic, and antigenotoxic effects of galangin, puerarin, and ursolic acid in mammalian cells. *Drug and Chemical Toxicology* :1-7.
2. Bankova, V., 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2): 114–117.
3. Huang, S., Zhang, C.P., Wang, K., Li, G., Hu, F.L., 2014. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules Journal*, 19(12): 19610–19632.
4. Ifeoma, O., Oluwakanyinsola, S., 2013. Screening of Herbal Medicines for Potential Toxicities: 63–88.
5. Jahromi, M.Z., Ranjbarian, P., Shiravi, S., 2014. Cytotoxicity evaluation of Iranian propolis and calcium hydroxide on dental pulp fibroblasts. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 8(3): 130–133.
6. Kwapong, P., Aido, K., Combey, R., Karikari, A., 2010. *Stingless Bees Importance, Management, And Utilisation*, Accra: Unimax Macmillan: 8-21.
7. Lotfy, M., 2006. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7(1): 22–31.
8. Ramos, A.F.N., Miranda, J.L., 2007. Propolis: a Review of Its Anti-Inflammatory and Healing Actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease*, 13(4): 697–710.
9. Sarteshnizi, N.A., Zahri, S., Ghahfarokhi, H.J., Hafshejani, F.K., Teimori, H., 2014. Morphological Changes of Apoptosis and Cytotoxic Effects Induced by Caffeic Acid Phenethyl Ester in AGS Human Gastric Cancer Cell Line. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 3(2) : 77-82.
10. Sawicka, D., Car, H., Borawska, M.H., Niklinski, J., 2012. The Anticancer Activity of Propolis. *Via Medica*, 50 (1) : 25-37.

11. Sforcin, J., Bankova, V., 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 253–260.
12. Sostroasmoro, S., Ismael, S., 2009. Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis : 184-185.
13. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J.A., 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73(9): 117–124.
14. Wagh, V., 2013. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials: 1–11.