

Efek Sitotoksik dan Antiproliferatif Ekstrak Propolis terhadap Kultur Sel HeLa Melalui Penghambatan Aktifitas NFκB

(Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Propolis Extract to HeLa Cells Culture Through Acitivity Inhibition of NFκB)

ZAUHANI KUSNUL

Akademi Keperawatan Bahrul Ulum, Jl. K.H. Wahab Hasbullah Gg. IV, Tambak Beras, Jombang, Jawa Timur.

Diterima 25 November 2011, Disetujui 28 Juli 2012

Abstrak: Prevalensi kanker menunjukkan kecenderungan meningkat setiap tahun. Propolis memiliki senyawa aktif yang bertindak sebagai agen pro-apoptosis dan antiproliferatif pada sel kanker, dimana sebagian besar sel kanker mengalami gangguan pada kedua proses tersebut. Namun, hingga saat ini efek sitotoksik propolis produk lokal belum banyak dieksplorasi dan diteliti. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi potensi propolis lokal sebagai agen sitotoksik terhadap sel kanker. Sel HeLa diinkubasi dengan berbagai konsentrasi ekstrak propolis (5, 10, 25, 50 dan 100 µg/mL), dengan variasi lama inkubasi selama 6, 24 dan 48 jam dan kemudian diamati efek sitotoksik dan antiproliferatifnya dengan pewarnaan tripan blue dan metode penghitungan langsung menggunakan hemositometer, aktivitas caspase-3 dan kadar NFκB dalam inti dianalisis menggunakan prosedur ELISA. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak propolis lokal memiliki aktivitas untuk menginduksi kematian, menghambat pertumbuhan sel HeLa, meningkatkan aktivitas caspase-3 dan menghambat translokasi NFκB ke inti.

Kata kunci: propolis, sel HeLa, sitotoksik, proliferasi, caspase-3, NFκB.

Abstract: The prevalence of cancer show a tendency of increase every year. Propolis has active compound that act as a pro-apoptotic and antiproliferative agent to cancer cells, which most of cancer cells are usually deffect on regulation of both processes. However, until now the cytotoxic effect of local propolis hasn't been explored and investigated. The aim of this study is to identify the potency of local propolis as a cytotoxic agent to cancer cells. By using several concentration of propolis extract (5, 10, 25, 50 and 100 µg/mL) to treat HeLa cell lines with serial incubation time (6, 24 and 48 hours) and then the cytotoxic and antiproliferative effects were observed by using tripan blue dye exclusion and direct counting using haemocytometer. The activity of caspase-3 and the level of NFκB in the nucleus were observed by using ELISA protocol. The result shows that local Propolis extract has activity to induce cell death, inhibit the proliferation of HeLa cells, increase caspase-3 activity and inhibit the translocation of NFκB to the nucleus.

Keywords: propolis, HeLa cell, cytotoxic, proliferation, caspase-3, NFκB.

PENDAHULUAN

SAAT ini kanker masih merupakan masalah kesehatan dunia, dimana prevalensi kanker dari tahun ke tahun menunjukkan kecenderungan peningkatan. Indonesia adalah salah satu negara yang memiliki kekayaan

alam yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen terapi kanker. Diantaranya adalah propolis, yang mengandung bahan aktif yang bersifat pro apoptosis dan anti proliferasi terhadap sel kanker, dimana sebagian besar sel kanker mengalami gangguan regulasi pada kedua proses ini. Efek antiproliferasi pada sel tumor diduga merupakan efek sinergis dari unsur-unsur dalam propolis, diantaranya *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE)⁽¹⁾. CAPE mampu menghambat proliferasi sel

* Penulis korespondensi, Hp. 081330897312
e-mail: zauhani.kusnul@gmail.com

kanker dan berperan dalam proses apoptosis dengan menekan/ menghambat aktivasi NF κ B⁽²⁾.

Aktivitas antitumor propolis juga terjadi melalui induksi apoptosis melalui jalur caspase 3⁽³⁾. Selain CAPE, bahan aktif lain yang memiliki aktifitas antitumor dalam propolis adalah flavonoid dan derivatnya yang juga merupakan komponen polifenol. Asupan makanan kaya polifenol khususnya flavonoid berkaitan dengan penurunan resiko terjadinya kanker. Flavonoid menghambat proliferasi berbagai sel kanker dan pertumbuhan tumor pada berbagai hewan model⁽⁴⁾. Beberapa komponen polifenol meregulasi gen penting yang mengontrol proliferasi, siklus sel, dan apoptosis pada sel kanker⁽²⁾.

Proses proliferasi maupun apoptosis sel dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya adalah *nuclear factor κ B* (NF κ B) yang secara umum dikenal sebagai regulator gen yang mengkode sitokin, chemokin, molekul adhesi penting dalam respon imun dan inflamasi⁽⁵⁾, juga terhadap gen penting dalam mengontrol proliferasi sel dan apoptosis⁽⁶⁾. Aktifasi NF κ B menyebabkan ekspresi berbagai target gen yang menyebabkan proliferasi sel, mencegah apoptosis, memicu invasi dan metastasis sel kanker, juga menyebabkan resistensi sel kanker terhadap radioterapi dan kemoterapi, sehingga NF κ B merupakan target penting dalam pengobatan kanker dimana hambatan terhadap aktifitas NF κ B diharapkan dapat menekan proliferasi, meningkatkan apoptosis, menekan invasi dan metastasis sel kanker, juga meningkatkan sensitifitas sel kanker terhadap radioterapi dan kemoterapi⁽⁷⁾.

Komposisi propolis sangat bervariasi antar wilayah, dipengaruhi musim dan perbedaan jenis tanaman disekitar lebah penghasil propolis. Namun faktanya ada banyak kemiripan aktifitas yang berasal dari komponen yang berbeda⁽⁸⁾. Hal ini memberi harapan pada upaya eksplorasi potensi antikanker propolis dari wilayah geografis yang lain, termasuk dari Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Ekstrak propolis. Sampel ekstrak propolis didapat dari peternakan lebah KUD Batu, Jawa Timur, yang diproses dengan cara: 100 g propolis ditumbuk dan direndam dalam etanol 96% selama 18 jam. Larutan ini disentrifus dengan 7000 rpm pada suhu 20°C selama 15 menit, lalu supernatan diambil dan disaring. Untuk mengetahui berat kering ekstrak propolis dilakukan pengeringan dengan evaporator kemudian diukur berat keringnya per mL (mg/mL). Untuk perlakuan, propolis dilarutkan pada media (MEM) hingga didapatkan beberapa konsentrasi berbeda (5, 10, 25, 50 dan 100 μ g/mL).

Kultur sel HeLa. Stok sel HeLa ditumbuhkan dalam medium MEM yang diberi penisilin (100 U/mL), streptomisin (100 U/mL), dan FBS 10%. Diinkubasi pada inkubator dengan CO₂ 5% dan suhu 37°C sampai konfluen⁽⁹⁾. Untuk menghitung jumlah sel perlakuan dilakukan tripsinisasi dan dilakukan penghitungan standar jumlah sel/mL dengan hemositometer.

Perlakuan. HeLa dengan konsentrasi 1 x 10⁶ sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 24 sumuran dan diinkubasi selama 24 jam untuk beradaptasi dan menempel di sumuran sampai 80% konfluen. Keesokannya media dibuang, kemudian diganti media yang mengandung ekstrak propolis dalam berbagai konsentrasi (5, 10, 25, 50 dan 100 μ g/mL) dan diinkubasi selama 6, 24 dan 48 jam.

Uji sitotoksik (IC₅₀). Pada akhir inkubasi, dilakukan tripsinisasi kemudian dilakukan pewarnaan/ uji *trypan blue* dan sel dihitung dengan hemositometer.

Uji doubling time. Dengan prosedur yang sama seperti uji sitotoksik diatas, jumlah total sel dihitung untuk menentukan waktu yang dibutuhkan sel untuk menjadi berjumlah dua kali lipat.

Aktifitas Caspase 3. Menggunakan caspase 3/ CPP32 *Colorimetric Assay Kit*, Biovision. Sel HeLa sebanyak 1 x 10⁶ diresuspensi dalam 50 μ L *cell lysis buffer*, dan sel diinkubasi dengan es selama 10 menit. Sel disentrifus 10.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dipindahkan (*cytosolic extract*) ke vialkon baru dan diletakkan di es. Selanjutnya dilakukan uji protein (dengan metode biuret). Sebanyak 5 sampai 200 μ g protein dilarutkan dengan 50 μ L *cell lysis buffer*, lalu 2x *reaction buffer* ditambahkan sebanyak 50 μ L, selanjutnya ditambahkan 50 μ L DEVD-pNA 4 mM dan diinkubasi selama 1-2 jam dalam suhu 37°C. Hasil dibaca dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 400-405 nm. Perbandingan absorbansi dari sampel perlakuan dengan kontrol menunjukkan tingkat peningkatan aktifitas CPP32.

Aktifitas NF κ B. Aktifitas NF κ B diukur dengan menggunakan prosedur pemeriksaan NF κ B/p65 active ELISA, IMGEX. Diawali dengan melakukan prosedur *nuclear extract*⁽¹⁰⁾. Selanjutnya dilakukan prosedur ELISA p65 aktif sebagai berikut:

Coating: sebanyak 100 μ L antibodi primer dilarutkan dalam 10 mL *coating buffer*, lalu sebanyak 100 μ L dari larutan diambil dengan pipet dan dimasukkan ke masing-masing sumuran, selanjutnya *plate* ditutup dan diinkubasi *over night* dengan suhu 4°C. Setelah inkubasi, sumuran dicuci dengan 300 μ L *wash buffer*. **Blocking:** sebanyak 200 μ L *blocking buffer* ditambahkan ke masing-masing sumuran untuk menghalangi permukaan reaktif, selanjutnya diinkubasi selama 30 menit sampai 1 jam pada suhu ruang. Standar p65

dipersiapkan dengan konsentrasi 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625 dan 0. Sebanyak 100 μ L sampel dimasukkan ke masing-masing sumuran yang sesuai, dan diinkubasi selama 4 jam pada suhu ruang.

Washing: lisat sampel dan kontrol dibuang, dicuci sebanyak 4x dengan 300 μ L *wash buffer*, dan residu *wash buffer* dibuang dengan membaliknya.

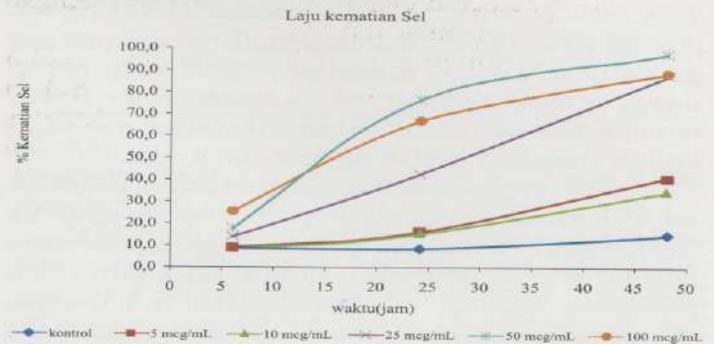
Antibodi sekunder: sebanyak 5 μ L konjugat antibodi sekunder dilarutkan dalam 10 mL *blocking buffer*. Lalu sebanyak 100 μ L larutan antibodi sekunder dimasukkan ke masing-masing sumuran, diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya antibodi sekunder dibuang dan dicuci sebanyak 5x dengan 300 μ L *wash buffer*, residu *wash buffer* dibuang, dan TMB disiapkan. Sebanyak 10 mg TMB dilarutkan pada 10 mL TMB substrat *buffer* dan dicampurkan, selanjutnya sebanyak 100 μ L substrat TMB ditambahkan ke tiap sumuran, diinkubasi 30 menit pada suhu ruang. Hasil dibaca dengan ELISA reader 450 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Efek sitotoksik ekstrak propolis terhadap sel HeLa.

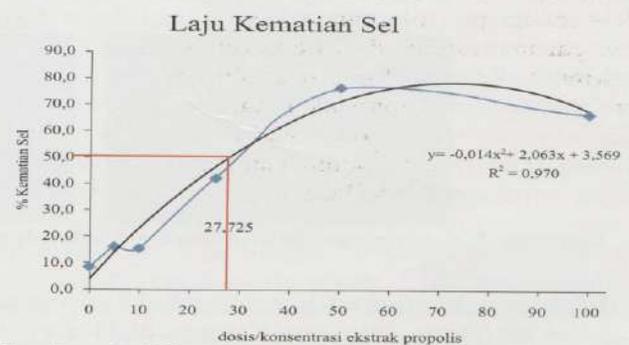
Terdapat kecenderungan peningkatan persentase kematian sel seiring dengan peningkatan konsentrasi propolis dan lama inkubasi sel dengan ekstrak propolis (gambar 1). Pada pengamatan jam ke 6 setelah inkubasi kematian sel belum terlalu tinggi, dimana persentase kematian sebesar 25,5 % terjadi pada sel dengan perlakuan 100 μ g/mL. Pada 24 jam setelah perlakuan, peningkatan persentase kematian sel tampak lebih nyata dimana pada konsentrasi 25 μ g/mL kematian sel mencapai 42,2%, kemudian meningkat menjadi 76,4 dan 66,8% pada konsentrasi 50 dan 100 μ g/mL. Kecenderungan peningkatan persentase kematian sel juga tampak pada pengamatan jam ke 48, dimana persentase kematian sel dengan dosis ekstrak propolis 25, 50, dan 100 μ g/mL terus meningkat mencapai angka 97,8%.

Data ini menunjukkan bahwa efek sitotoksik ekstrak propolis terhadap sel HeLa dipengaruhi oleh konsentrasi dan lama inkubasi dimana pada waktu pengamatan yang sama peningkatan konsentrasi ekstrak propolis menyebabkan peningkatan persentase kematian sel, juga pada konsentrasi perlakuan yang sama peningkatan lama inkubasi sel dengan ekstrak propolis menyebabkan peningkatan persentase kematian sel. Kematian sel sebesar 50% tampak dapat dicapai sebelum inkubasi 24 jam. Hasil ini senada dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Bufalo, *et al* tahun 2007, tentang efek sitotoksik *Brazilian Green Propolis* terhadap sel HEP-2 *in vitro*⁽¹¹⁾.



Gambar 1. Grafik kematian sel HeLa setelah inkubasi dengan ekstrak propolis.

Dalam grafik persentase kematian sel terhadap konsentrasi (Gambar 2) dapat dilihat bahwa IC_{50} dapat dicapai pada perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 25 μ g/mL atau lebih, perlakuan dengan 5 dan 10 μ g/mL tidak mencapai kematian sel 50%. Dengan menggunakan rumus persamaan garis ($y = -0,014x^2 + 2,063x + 3,569$) dengan $R^2 = 0,970$ (R^2 makin mendekati 1 artinya kekuatan korelasi makin kuat), dapat ditentukan bahwa titik IC_{50} ekstrak propolis terhadap sel HeLa dalam penelitian ini berada pada konsentrasi $27,725 \pm 0,03$ μ g/mL, hal ini menunjukkan aktifitas sitotoksik yang cukup tinggi, sehingga bisa dikatakan bahwa propolis lokal cukup menjanjikan untuk dikembangkan menjadi bahan yang berpotensi tinggi dalam penanganan penyakit kanker.



Gambar 2. IC_{50} ekstrak propolis terhadap sel HeLa

Penelitian untuk menentukan konsentrasi IC_{50} ekstrak propolis sebelumnya juga pernah dilakukan oleh Chia pada tahun 2004 menggunakan propolis Taiwan terhadap sel human melanoma, pada penelitian ini didapatkan konsentrasi IC_{50} berkisar 20 μ g/mL⁽¹²⁾. Perbedaan ini mungkin disebabkan jenis dan karakteristik sel yang digunakan berbeda, namun pada prinsipnya keduanya memiliki potensi efek sitotoksik

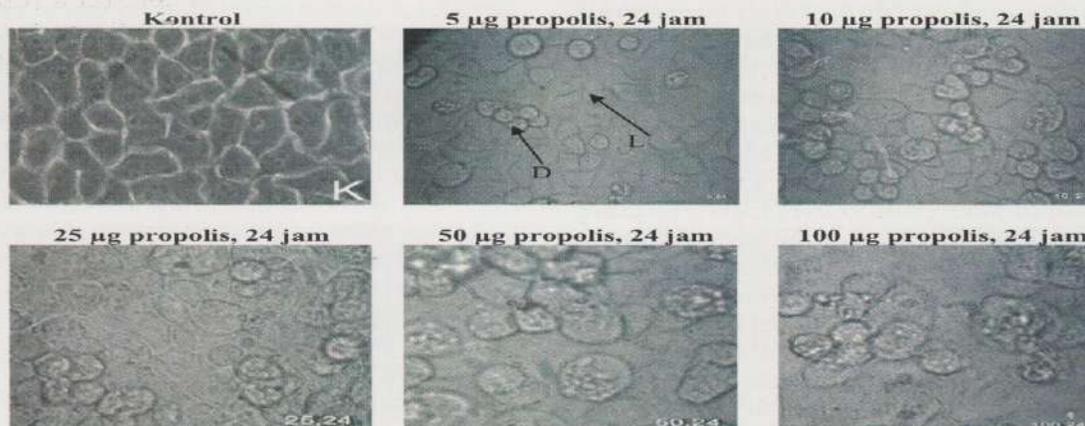
yang sama baiknya. Nilai IC_{50} sebesar $27,725 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan bahwa ekstrak propolis yang digunakan dalam penelitian ini memiliki potensi yang cukup tinggi sebagai agen sitotoksik terhadap sel HeLa, dimana batasan suatu bahan dikatakan memiliki ktifitas sitotoksik adalah sebesar $100 \mu\text{g/mL}$ ⁽¹³⁾.

Selain dengan menghitung persentase kematian sel, efek sitotoksik ekstrak propolis terhadap sel HeLa dapat juga dilihat dengan membandingkan perubahan gambaran/tampilan mikroskopis sel kontrol dan perlakuan (Gambar 3). Dari tampilan mikroskopis sel dapat dilihat jelas perubahan yang terjadi pada sel antar perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Sel dengan perlakuan $5 \mu\text{g/mL}$ menampakkan adanya sel yang mulai mengalami proses kerusakan/kematian, tampak dari bentuknya yang bulat dan terlepas dari tempat menempelnya di dasar sumuran. Pada kelompok sel dengan perlakuan 10, 25, 50 dan $100 \mu\text{g/mL}$ tampak sel yang mengalami proses kematian menjadi makin banyak.

Adanya hubungan antara konsentrasi propolis dan kematian sel HeLa juga diperkuat dengan hasil uji korelasi Spearman SPSS 12 yang menampakkan hasil

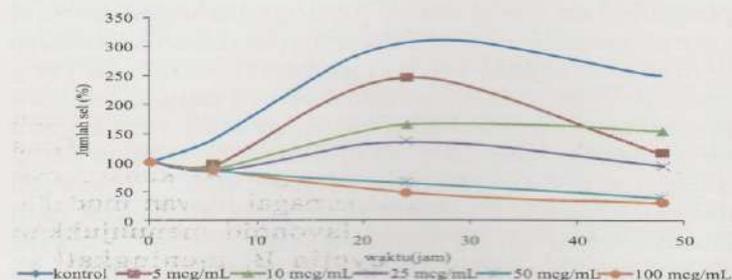
bahwa terdapat korelasi yang kuat antara konsentrasi perlakuan dengan kematian sel baik pada pengamatan jam ke 6, 24 maupun 48 jam setelah perlakuan dengan koefisien korelasi masing-masing 0,943, 0,886 dan 0,886 dan dengan taraf signifikansi 0,005, 0,019 dan 0,019. Artinya peningkatan konsentrasi ekstrak propolis secara bermakna berhubungan dengan peningkatan kematian sel HeLa.

Efek antiproliferatif ekstrak propolis terhadap sel HeLa. Pada pengamatan jam ke 6 setelah perlakuan, sel kontrol mengalami penambahan jumlah menjadi 139% dari jumlah sel semula, sedang sel dengan perlakuan mengalami penurunan jumlah sel namun dalam prosentase yang masih relatif kecil (4-18%). Pada 24 jam setelah perlakuan, sel kontrol meningkat pesat menjadi 306% dari sel semula, dan sel dengan perlakuan $5 \mu\text{g/mL}$ mencapai 245% jumlah semula. Sel dengan perlakuan 10 dan $25 \mu\text{g/mL}$ mengalami peningkatan jumlah namun keduanya tidak mencapai dua kali lipat jumlah sel semula (164% dan 136%), sedangkan sel dengan perlakuan 50 dan $100 \mu\text{g/mL}$ justru mengalami penurunan jumlah sel menjadi lebih rendah dari jumlah semula (64% dan 46%).



Gambar 3. Gambaran mikroskopis sel setelah perlakuan dibanding dengan kontrol (D: mati, L: hidup).

Efek penghambatan yang disebabkan ekstrak propolis terhadap laju proliferasi sel HeLa juga dapat diidentifikasi dengan menghitung waktu yang dibutuhkan kelompok sel untuk berkembang menjadi dua kali lipat jumlah semula (*doubling time*), dimana pada penelitian ini yang mengalami *doubling time* hanya kelompok sel tanpa propolis dan kelompok dengan $5 \mu\text{g/mL}$ propolis. Kelompok dengan $5 \mu\text{g/mL}$ propolis memiliki *doubling time* dua kali lipat dibanding kelompok tanpa ekstrak propolis, sedangkan sel dengan perlakuan ekstrak konsentrasi lebih tinggi (10, 25, 50 dan $100 \mu\text{g/mL}$)



Gambar 4. Grafik pertumbuhan sel HeLa.

Tabel 1. Doubling time sel HeLa tanpa propolis dan dengan 5 µg/mL propolis.

Konsentrasi Propolis	Persamaan Garis	R ²	Doubling Time (jam)
0 µg/ml	$y = -0,224x^2 + 14,17x + 84,93$	0,968	9,57±0,032
5 µg/ml	$y = -0,014x^3 + 0,812x^2 - 5,066x + 100$	1	18,9

tidak mengalami *doubling time*. Data ini jelas sekali menggambarkan aktifitas antiproliferatif ekstrak propolis terhadap sel HeLa.

Hasil uji korelasi Spearman SPSS 12, antara dosis perlakuan dengan proliferasi sel menampakkan hasil bahwa terdapat korelasi yang kuat dengan arah berlawanan antara konsentrasi perlakuan dengan proliferasi sel baik pada pengamatan jam ke 6, 24 maupun 48 jam setelah perlakuan dengan koefisien korelasi masing-masing -0,812, -1 dan -0,943 dan dengan taraf signifikansi 0,05, 0,0 dan 0,005. Artinya peningkatan konsentrasi ekstrak propolis secara bermakna berhubungan dengan penurunan proliferasi sel HeLa. Aktifitas sitotoksik dan antiproliferatif ekstrak propolis sangat mungkin merupakan hasil kerja sinergis dari bahan-bahan yang terkandung di dalamnya, beberapa bahan aktif telah diisolasi dan diteliti⁽¹⁾.

CAPE merupakan salah satu kandungan bahan aktif dalam propolis yang banyak diteliti terkait aktifitas anti tumor, CAPE memiliki efek yang dipengaruhi oleh dosis terhadap sel glioma C6, menekan jumlah sel hidup 42% dibandingkan dengan kontrol dan meningkatkan proporsi *hypodiploid* DNA sebagai indikasi apoptosis⁽¹⁴⁾. CAPE juga mempengaruhi siklus sel, setelah inkubasi dengan CAPE selama 24 jam, jumlah persentase sel glioma C6 pada fase G0/G1 meningkat 85% melalui hambatan pada fosforilasi protein retinoblastoma (pRB). Fosforilasi pRB oleh *cyclin dependent kinase* (CDK) dipercaya sebagai kejadian penting dalam regulasi memasuki fase S, dan sebagai titik restriksi. Penghambatan pertumbuhan sel oleh CAPE terkait dengan efek pada proses oksidatif yang diinduksi oleh stimulus mitogen. Pengaturan proliferasi sel pada berbagai jenis tipe sel mamalia dimediasi oleh ikatan sitokin, *growth factor* dan hormon yang spesifik terhadap reseptor permukaan sel yang selanjutnya menggerakkan oksigen radikal dan H₂O₂. CAPE diketahui mampu menghambat proses oksidatif yang lebih luas atau sebanding dengan agen khemopreventif seperti tamoxifen⁽¹⁵⁾.

Flavonoid yang juga merupakan komponen penting dalam propolis menampakkan aktifitas menghambat proliferasi berbagai sel kanker dan pertumbuhan tumor pada berbagai hewan model⁽⁴⁾. Menurut Agarwal 2006, flavonoid menunjukkan aktifitas menghambat cyclin B, meningkatkan ekspresi p21 WAF (suatu inhibitor pertumbuhan), dan menginduksi apoptosis. Juga memicu pelepasan

sitokrom c ke sitosol, menginduksi procaspase 9, dan mengaktifkan caspase 3⁽²⁾.

Meskipun bahan aktif yang memiliki aktifitas antikanker dalam propolis lokal yang digunakan dalam penelitian ini belum diidentifikasi, hasil penelitian ini telah menampakkan sebuah harapan positif akan potensi antikanker yang terkandung dalam propolis lokal.

Efek ekstrak propolis terhadap kadar NFκB di inti. Hasil pengukuran kadar NFκB dalam inti sel kelompok sel tanpa propolis dan dengan ekstrak propolis menampakkan adanya penurunan yang nyata, dimana kelompok tanpa propolis menampakkan kadar NFκB yang paling tinggi, selanjutnya terus menurun pada tiap kelompok perlakuan.

Analisis korelasi Spearman SPSS 12 menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang kuat dengan arah berlawanan antara konsentrasi ekstrak propolis dan kadar NFκB dalam inti sel HeLa (koefisien korelasi = -1 dan taraf signifikansi 0,0 untuk $\alpha = 0,01$), artinya makin rendah konsentrasi ekstrak propolis makin tinggi kadar NFκB, atau sebaliknya makin tinggi konsentrasi ekstrak propolis makin rendah kadar NFκB. Dengan uji yang sama juga didapatkan bahwa kadar NFκB di inti memiliki korelasi kuat dengan laju proliferasi sel HeLa (koefisien korelasi = 1, signifikansi = 0,0, $\alpha = 0,01$), artinya semakin tinggi kadar NFκB di inti, makin tinggi tingkat proliferasi sel HeLa. Aktifitas NFκB secara konstitutif telah ditemukan pada berbagai jenis kanker dan menampakkan peran terhadap kelangsungan hidup sel dan melindungi sel dari apoptosis yang diinduksi oleh agen yang merusak DNA dan memungkinkan terputusnya jalur aktifitas berbagai gen yang terlibat dalam perkembangan sel tumor/kanker⁽¹⁷⁾. Sehingga, NFκB menjadi salah satu target terapi untuk meningkatkan efikasi pengobatan kanker, selain itu karena NFκB dalam keadaan fisiologis ada dalam keadaan inaktif di sitoplasma, maka secara teoritis terapi yang mengblok NFκB tidak akan menimbulkan bahaya/dampak negatif pada sel normal⁽⁷⁾. CAPE merupakan inhibitor spesifik dari NFκB yang memperlihatkan aktifitas penghambatan translokasi NFκB ke inti sel⁽¹⁷⁾.

Dalam penelitian ini didapatkan hasil yang sejalan dengan teori diatas, pada sel kontrol (sel kanker tanpa perlakuan) didapatkan kadar NFκB dalam inti yang tinggi, hal ini membuktikan bahwa sel HeLa mengalami aktifitas NFκB yang tinggi. Selanjutnya

kadar NFκB makin menurun dengan adanya perlakuan ekstrak propolis dan menampakkan adanya kadar yang makin menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak propolis. Dari hasil penelitian ini dapat dibuktikan adanya aktifitas penghambatan NFκB oleh ekstrak propolis, tampak dari makin besar konsentrasi propolis maka makin besar hambatan translokasi NFκB dari sitoplasma ke inti sehingga yang terukur di inti menjadi makin kecil. Hal ini selaras dengan yang diungkapkan oleh Natarajan 1996 bahwa CAPE merupakan inhibitor spesifik dari NFκB yang memperlihatkan aktifitas penghambatan translokasi NFκB ke inti sel⁽¹⁷⁾.

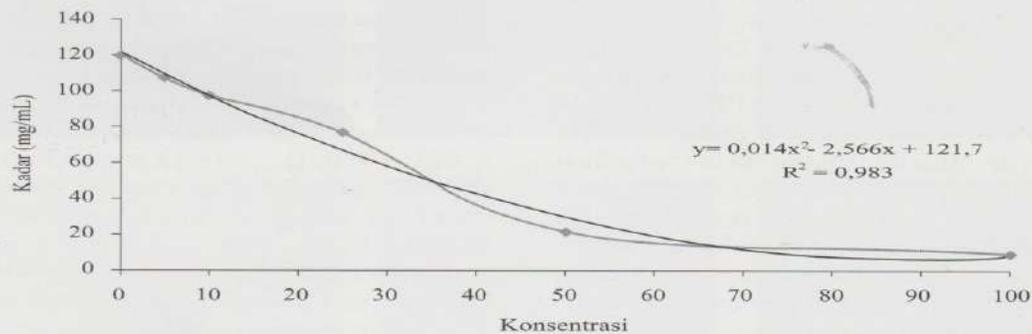
Kadar NFκB di inti memiliki korelasi yang kuat dengan laju proliferasi sel, dimana makin tinggi kadar NFκB makin tinggi laju proliferasi sel. Hal ini membuktikan bahwa NFκB merupakan faktor transkripsi yang meregulasi gen-gen terkait proliferasi sel diantaranya cyclin D1⁽¹⁸⁾. Cyclin D1 ditemukan secara umum tereksresi dan memainkan peran penting sebagai onkogen pada karsinoma kepala dan leher, juga pada kanker yang lain⁽¹⁹⁾.

Penurunan kadar NFκB dalam inti memiliki korelasi sangat kuat dengan peningkatan aktifitas caspase 3 (koefisien korelasi = -1, signifikansi = 0,0, $\alpha = 0,01$), dimana kadar NFκB yang tinggi didapatkan

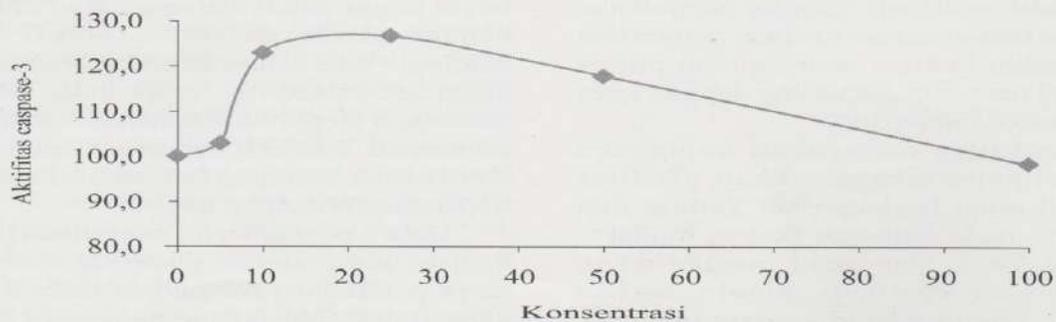
aktifitas caspase yang lebih rendah kemudian menurunnya kadar NFκB dalam inti diikuti dengan peningkatan aktifitas caspase 3. Data ini membuktikan bahwa NFκB merupakan faktor transkripsi yang meregulasi berbagai gen terkait proses apoptosis dan proliferasi sel yang menyebabkan meningkatnya ekspresi protein supresor apoptosis seperti Bcl-2, Bcl XL dan menurunnya protein proapoptosis seperti Bax⁽²⁰⁾. Protein Bcl-2 mengblok pelepasan sitokrom-c, dimana pada proses apoptosis sitokrom-c terlepas ke sitosol dan berinteraksi dengan Apaf-1, menyebabkan aktifasi procaspase 9 menjadi caspase 9. Caspase 9 yang aktif kemudian mengaktifasi caspase 3 yang berikatan dengan inti, memecah nukleus dan menyebabkan apoptosis⁽²¹⁾.

Efek ekstrak propolis terhadap aktifitas caspase 3. Terjadi peningkatan aktifitas caspase 3 pada sel dengan perlakuan ekstrak propolis dengan konsentrasi 5, 10 dan 25 $\mu\text{g/mL}$ dibandingkan dengan kontrol, kemudian sedikit menurun pada kelompok sel dengan perlakuan 50 dan 100 $\mu\text{g/mL}$.

Uji korelasi Spearman SPSS.12 menunjukkan bahwa penurunan kadar NFκB dalam inti memiliki korelasi sangat kuat dengan aktifitas caspase-3 (koefisien korelasi = -1, signifikansi = 0,0, $\alpha = 0,01$), dimana kadar NFκB yang tinggi berhubungan



Gambar 5. Profil penurunan kadar NFκB terhadap perubahan konsentrasi.



Gambar 6. Profil aktifitas caspase 3 sel kontrol dan perlakuan.

dengan aktifitas caspase yang lebih rendah kemudian menurunnya kadar NF κ B dalam inti diikuti dengan peningkatan aktifitas caspase 3. Menurut beberapa laporan penelitian, aktifitas antitumor propolis juga terjadi melalui induksi apoptosis melalui jalur caspase 3. Pada penelitian ini dari hasil pengukuran aktifitas caspase 3 yang merupakan caspase eksekutor apoptosis didapatkan hasil bahwa terjadi peningkatan aktifitas caspase 3 pada sel dengan perlakuan ekstrak propolis mulai dari konsentrasi 5, 10 dan 25 μ g/mL dibandingkan dengan kontrol, dimana prosentase kematian sel pada kelompok tersebut juga mengalami peningkatan sehingga dalam penelitian ini dapat dilihat adanya keterkaitan antara peningkatan prosentase kematian sel dan peningkatan aktifitas caspase 3. Namun pada sel dengan perlakuan 50 dan 100 μ g/mL propolis terjadi penurunan aktifitas caspase 3, hal ini bisa dijelaskan karena sel pada kedua kelompok tersebut sudah mengalami kematian dengan prosentase yang sangat tinggi sehingga jumlah sel hidup yang mengalami fase awal apoptosis dan memproduksi caspase 3 sudah sedikit, hal ini menyebabkan aktifitas caspase 3 yang terukur lebih rendah dibanding kelompok dengan perlakuan 5, 10 dan 25 μ g/mL propolis yang masih memiliki jumlah sel hidup relatif banyak.

SIMPULAN

Ekstrak propolis lokal mampu memicu kematian dan menghambat pertumbuhan sel HeLa dengan menghambat translokasi NF κ B.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih sebesar-besarnya kepada Ibu Chairin (Laboratorium Namru II), atas bantuannya untuk mendapatkan sel HeLa yang digunakan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Jin UH, Chung TW, Kang SK, Suh SJ, Kim JK, Chung KH, et al. Caffeic acid phenethyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and Identification. *Clin Chim Acta*. 2005.3(2):57-64.
- Agarwal, Bharat B, Shishir S. Molecular targets of dietary agent for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2006. 1:1397-421.
- Aso K, Kanno S, Tadano T, Satoh S, Ishikawa M. Inhibitory effect of propolis of the growth of human leukemia U937. *Biomol Pharm Bull*. 2004.27:727-30.
- Ghosh S, May M, Kopp E. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev. Immunol*. 1998.16:225-60.
- Kanadaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*. 2005.19:895-909.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS. NF-kappa B antiapoptosis -induction of TRAF1 and TRAF 2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*.1998.281:1680-83.
- Wang W, Abbruzesse JL, Evans DB, et al. The nuclear factor kappaB RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *CLin Cancer Res*. 1999.5:119-27.
- Salatino Antonio, Erica Weinstein, et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *eCAM*. 2005.2(1):33-8.
- Szliszka E, Zenon P, Czuba, Katarzyna J, Wojciech K. Dietary flavonoids sensitize HeLa cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Int. J. Mol. Sci*. 2008.9:56-64.
- Frouin I. Cell cycle dependent dynamic association of cyclin/Cdk complexes with human DNA replication protein. *The EMBO Journal*. 2002.21(10):2485-95.
- Bu'falo MC, Joa MG, Candeias, Jose MS. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *eCAM Advance Access*; 2007.
- Chia N, Meng S, Chia L, Jen K. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evidenced-based Complementary and Alternative Medicine*. 2004.1(2).
- Meiyantio E, Ratna A, Handayani A, Rahmi F. Ekstrak etanolik biji buah pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2008.19(1).
- Lee YJ, Kuo HC, Chu CY, Wang CJ, Lin WC, Tseng TH. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochem Pharmacol*. 2003.66: 81-91.
- Bhimani.HR, Troll W, Grunberger D, Frenkel K. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res*.1993.53:4528-33.
- Rayet B, Ge'linas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*. 1999.18:6938-47.
- Natarajan K, Singh S, Burke Jr TR, Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear ranscription factor NF κ B. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996.93:9090-5.
- Gutridge DC, Albanese C, Reuther JY, et al. NF kappa B controls cells growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*. 1999.19:5785-99.
- Nakashima T, Clyman GL. Antisense inhibition of cyclin D-1 in human head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaringol Haed Neck Surg*. 2000. 126:957-61.

20. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2003.17(3):590–603.
21. Reed JC. Bcl-2 Family Proteins: Regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol*. 1997.34:9-19.